



MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA
CURSO 2019-20
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

DISEÑO DE NANOPARTÍCULAS DE ALTA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE LIGANDOS: SINERGIA EN LA UNIÓN DE LIGANDO A POLIELECTROLITOS DE CARGA OPUESTA

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Autor: Ana Galindo Bernabéu

Tutores: Dra. Rocío Esquembré Tomé y Dr. Francisco Javier Gómez Pérez

D. FRANCISCO JAVIER GÓMEZ PÉREZ, Doctor y Catedrático del departamento de Química Física, Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDIBE) de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

CERTIFICA

Que el presente trabajo titulado:

**“DISEÑO DE NANOPARTÍCULAS DE ALTA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE LIGANDOS:
SINERGIA EN LA UNIÓN DE LIGANDO A POLIELECTROLITOS DE CARGA OPUESTA”**

y que constituye la Memoria del Trabajo Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta:

Dña. **ANA GALINDO BERNABÉU**

ha sido realizado bajo su supervisión en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDIBE), cumpliendo todos los requisitos necesarios.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado en Elche a 10 de julio de 2020

Fdo.: Prof. Dr. Francisco Javier Gómez Pérez

Índice

	Agradecimientos	V
	Dedicatoria	VI
	Abstract-Resumen palabras clave	VII-VIII
1.	Introducción y Antecedentes	1
1.1	Antecedentes	1-3
1.2	Nanopartículas	3-5
1.2.1	Nanopartículas de sílice. NP-SiO ₂	6-8
1.2.2	Nanopartículas de magnetita. NP-Fe ₃ O ₄	8-10
1.2.3	Síntesis de NP-Fe ₃ O ₄ por Co-precipitación	10-11
1.2.4	Síntesis de NP-Fe ₃ O ₄ por método Solvotérmico	11-12
1.3	Poliectrolitos	12-15
1.4	Proteínas	15
1.4.1	β-Lactoglobulina	15-16
1.4.2	Lisozima	16-18
1.4.3	Colorantes: Azul de tripano e Carmín de índigo	18-19
1.5	Adsorción de biomoléculas. Isoterma de Langmuir	19-20
2.	Objetivos	20
2.1	Objetivo general	21
2.2	Objetivos Específicos	21
3.	Material y Métodos	22
3.1	Métodos espectrofotométricos	22
3.2	Dispersión Dinámica de la Luz (DLS)	23
3.3	Potencial Zeta	24
3.4	Recubrimiento de Nanopartículas	24
3.4.1	Recubrimiento de NP-SiO ₂ con polielectrolito	24-25
3.4.2	Recubrimiento de nanopartículas de magnetita. NP-Fe ₃ O ₄	25-26
3.5	Cuantificación	26
3.5.1	Cuantificación por residuo seco de NP-SiO ₂	26
3.5.2	Cuantificación espectrofotométrica de NP-Fe ₃ O ₄	26-27
3.6	Determinación de la capacidad máxima de adsorción de NP@PE y sinergia de crecimiento de NP@PE con colorantes	28-31
3.7	Desarrollo previsto inacabado o no realizado	32
3.7.1	Sinergia de crecimiento entre NP@PE y Biomolécula	32-33

3.7.2	Influencia de la fuerza iónica en la sinergia de crecimiento entre NP@PE y Biomoléculas	33-34
4.	Resultados y Discusión	34
4.1	Recubrimiento de las NP-SiO ₂ con PEI	34
4.2	Sinergia de crecimiento con TB	35-39
4.3	Sinergia de crecimiento con IC	39-41
4.4	Sinergia de crecimiento con NP-Fe ₃ O ₄ @PE con proteínas modelo	41-45
4.5	Influencia de la fuerza iónica del medio	45-46
5.	Conclusión y Proyección Futura	47-48
6.	Bibliografía	49-52

Agradecimientos

Antes de nada quiero agradecer a todas las personas y entidades que me han apoyado para llevar a cabo la realización de este trabajo de investigación.

En primer lugar quiero agradece a mis tutores Dr. Francisco Javier Gómez Pérez y Dra. Rocío Esquembré Tomé por aceptarme en su grupo de investigación, por sus consejos, sugerencias, correcciones y por guiarme a lo largo de todo el trabajo, siendo su apoyo fundamental y más si cabe en lo momentos de incertidumbre que se han vivido este 2020.

Al mismo tiempo quiero agradecer a la Universidad Técnica Nacional de Costa Rica, por su apoyo laboral y económico. Demostrando la confianza que tiene en los empleados para conseguir con ellos una mejor Universidad.

A nivel personal, el apoyo incondicional de las personas que a uno le rodean puede cambiar el futuro de alguien, en mi mente estaba desde hacía tiempo realizar estudios de postgrado, pero su realización material se ha podido hacer gracias al apoyo incondicional de las personas que me rodean como mis padres, hermanos y amigos pero principalmente mi marido Giovanni Saénz-Arce, al que admiro, por su perseverancia, dedicación y amor que muestra a la ciencia.

Dedicado a
Claudio y Gian

Resumen

El uso de fármacos proteicos ha demostrado ser una aproximación terapéutica enormemente exitosa que ha revolucionado el tratamiento de diversas enfermedades, como el cáncer, el VIH y por supuesto, la diabetes. Sin embargo, sigue presentando retos por su baja estabilidad cuando estas biomoléculas se almacenan, a largo plazo, en disolución acuosa. Los fenómenos responsables de esta pérdida de su actividad biológica son tanto físicos (desnaturalización, agregación, adsorción a las superficies del contenedor de almacenamiento, etc.) como químicos (degradación, deaminación, etc.). Además de la pérdida su identidad biológica, los productos finales de los procesos de degradación pueden dar lugar a respuesta inmune cuando son dados al paciente con el consiguiente riesgo para su salud. Todo ello, reduce de forma drástica la utilización generalizada de fármacos proteicos cuyos resultados *in vivo* han demostrado ser excelente.

El presente trabajo presenta una nueva metodología en la síntesis de complejos proteína – nanopartícula que permite regular a discreción la cantidad de proteína por unidad de masa de nanopartícula. Para ello, se utilizan una serie de polímeros cargados (polielectrolitos) para estabilizar la superficie de la nanopartícula (de sílice, SiO₂, o magnetita, Fe₃O₄) y evitar su agregación. El polielectrolito utilizado es de signo opuesto a la proteína que se pretende adsorber. Ajustando las concentraciones relativas de nanopartícula (recubierta de polielectrolito, NP@PE), proteína y polielectrolito libre (en exceso) es posible ajustar la cantidad de biomolécula unida al complejo final. La cantidad de ligando finalmente unido al complejo nanopartícula – polielectrolito, NP@PE, es independiente de la cantidad de nanopartícula (sílice o magnetita) y depende exclusivamente de la relación de concentraciones de proteína y polielectrolito. En otras palabras, la cantidad final de biomolécula adsorbida por unidad de masa de nanopartícula aumenta linealmente con la cantidad de polielectrolito en exceso utilizado en la síntesis.

Las implicaciones de los resultados presentados en este Trabajo Fin de Máster en los procesos de transporte o captura de ligandos, así como en el almacenamiento de biomoléculas a largo plazo son evidentes. Por un lado, se pueden desarrollar estrategias que aumentan la eficiencia de las nanopartículas en procesos como el transporte de fármacos o la eliminación de contaminantes en aguas continentales y marinas. Por otro, la individualización de las moléculas de ligando una vez adsorbidas al recubrimiento de las nanopartículas minimiza la posibilidad del establecimiento de interacciones intermoleculares que son, en muchos casos, causantes de la desnaturalización de proteínas en procesos multimoleculares (agregación fibrilación, etc.).

Palabras clave: adsorción, nanopartículas, transporte, captura y almacenamiento de biomoléculas.

Abstract

The use of protein drugs has proven to be an enormously successful therapeutic approach that has revolutionized the treatment of various diseases, such as cancer, HIV, and of course, diabetes. However, it continues to present challenges due to their low stability upon long-term storage in aqueous solution. The phenomena responsible for this loss of their biological activity are both physical (denaturation, aggregation, adsorption to the surfaces of the storage container, etc.) and chemical (degradation, deamination, etc.). In addition to the loss of their biological identity, the end products of the degradation processes can give rise to an immune response when given to the patient with the consequent risk to their health. All this drastically reduces the widespread use of protein drugs that otherwise have shown excellent results in *in vivo* experiments.

The present work presents a new methodology in the synthesis of protein-nanoparticle complexes that allows the amount of protein per unit nanoparticle mass to be regulated at will. To do this, we use a series of charged polymers (polyelectrolytes) to stabilize the surface of the nanoparticle (silica, SiO₂, or magnetite, Fe₃O₄) and prevent their aggregation. The polyelectrolyte used is opposite in sign to the protein to be adsorbed. By adjusting the relative concentrations of nanoparticle (polyelectrolyte-coated, NP @ PE), protein, and free polyelectrolyte (in excess) it is possible to adjust the amount of biomolecule bound to the final complex. The amount of ligand finally bound to the nanoparticle-polyelectrolyte complex, NP @ PE, is independent of the amount of nanoparticle (silica or magnetite) and depends exclusively on the ratio of protein and polyelectrolyte concentrations. In other words, the final amount of biomolecule adsorbed per nanoparticle mass unit increases linearly with the amount of excess polyelectrolyte used in the synthesis.

The implications of the results presented in this Final Master's Project in the transport or capture of ligands, as well as in the storage of biomolecules in the long term are evident. On the one hand, strategies can be developed that increase the efficiency of nanoparticles in processes such as the transport of drugs or the elimination of contaminants in both inland and sea waters. On the other hand, the individualization of the ligand molecules once adsorbed to the nanoparticle coating minimizes the possibility of establishing intermolecular interactions that are, in many cases, the cause of protein denaturation in multimolecular processes (fibrillation aggregation, etc.).

Key words: adsorption, nanoparticles, transport, capture and storage of biomolecules

1. Introducción y antecedentes

1.1 Antecedentes

La nanotecnología es, sin duda, un área de investigación en auge en las últimas décadas. Durante los últimos años, el estudio de nanopartículas ha emergido como uno de los campos de investigación de mayor interés por sus aplicaciones en múltiples disciplinas como puede ser la biotecnología [7,8], la biomedicina [3,7,8,34] y la bioingeniería [54,56]. Aunque desde las primeras civilizaciones como las egipcias, griegas o romanas puede decirse que la nanotecnología estaba presente, en cierta forma, en la fabricación de materiales con unas prestaciones distintas y únicas. Los maestros y artesanos transmitían la técnica de preparación de dichos materiales, aunque sin ser conscientes de estar creando materiales nanotecnológicos. Estos materiales han llegado hasta hoy en formas como las vidrieras de las catedrales [11], herramientas de acero [51] o copas [11]. Pero fue en la conferencia de Richard Feynman en 1959, titulada *“There is plenty of room at the bottom”* cuando se introdujo por primera vez la semilla que daría lugar al concepto de la nanociencia y la nanotecnología. A partir de ese momento la nanotecnología ha ido teniendo una mayor repercusión social, científica y tecnológica año tras año y con ello la inversión que hacen los gobiernos en el desarrollo de la nanotecnología en proyectos de investigación y desarrollo.

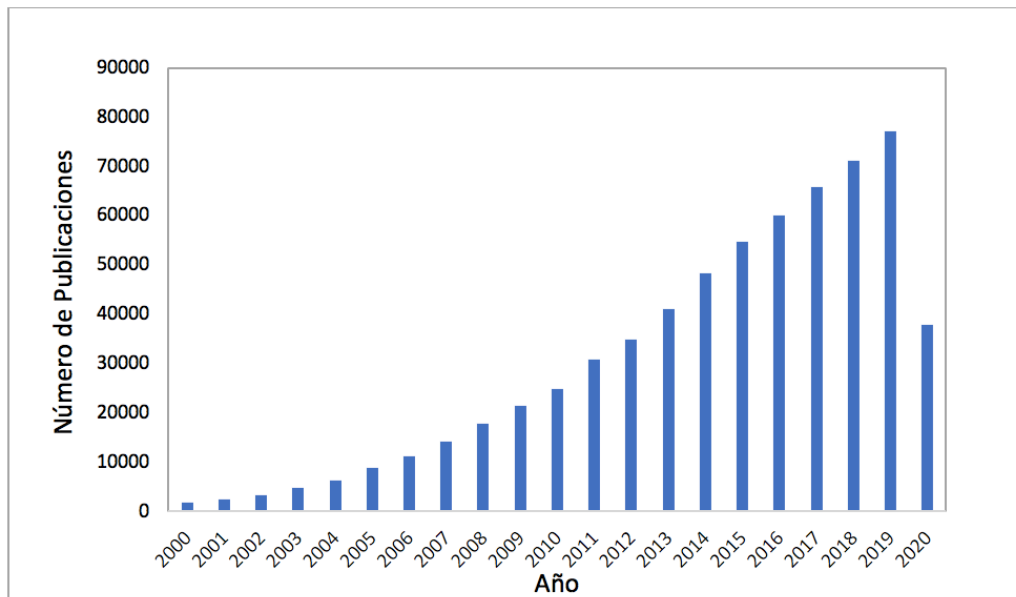


Ilustración 1. Artículos de nanopartículas publicados en WOS por año. Recogido en Junio 2020

Al hacer una búsqueda en la base de datos Web of Science (WOS) poniendo “nanoparticles” (en inglés nanopartículas) como tema, aparecen 10000 páginas con 10 artículos cada una. En esta misma base de datos se puede pedir al analizador que los represente en función de ciertos criterios como número de publicaciones por año recogido en la Ilustración 1 donde se aprecia que para el año 2019 se publicaron

más de 70000 artículos. El analizador de esta base también permite clasificar esta misma búsqueda por categorías de Web of Science, que se ha recogido en la Ilustración 2.

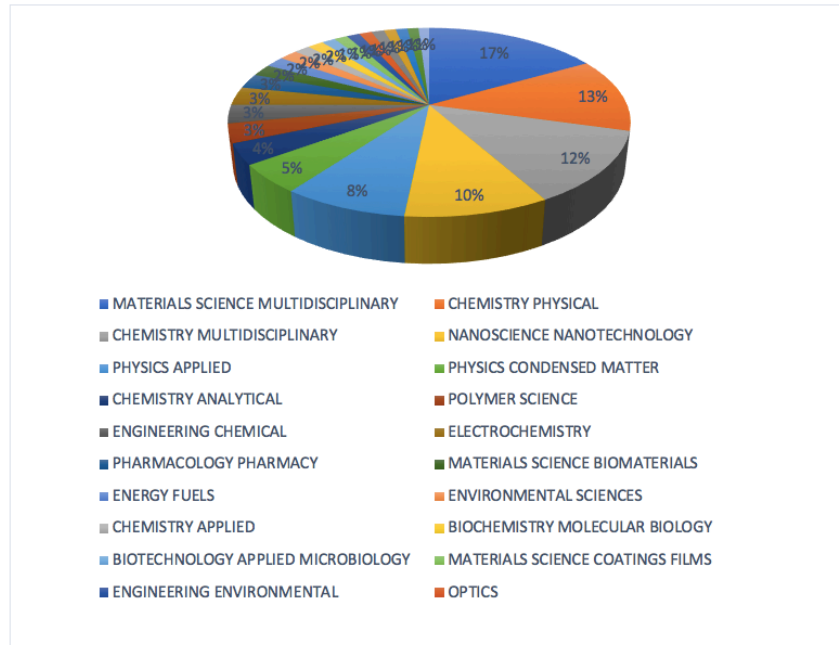


Ilustración 2. Artículos de nanopartículas de la base de datos WOS en función de las áreas de investigación

Como se puede ver en la Ilustración 2, las nanopartículas son de interés en diversas áreas como en ciencia de materiales, química-física, nanotecnología, polímeros, bioquímica, biología molecular o la biomedicina. En particular, en esta última disciplina, destacan estudios enfocados hacia el tratamiento de múltiples enfermedades como la diabetes [16,17,34,68], el cáncer [8,65,67], la psoriasis [63] y otras, utilizando principios activos proteicos. Los fármacos proteicos son muy prometedores, pero no consiguen alcanzar su máximo potencial debido, por un lado, a su escasa estabilidad funcional cuando son almacenadas en disolución acuosa y, por otro, en su dificultad para penetrar, entornos biológicos, través de membranas para alcanzar las dianas moleculares [67]. Dentro de la enorme variedad de las nanopartículas de las que se dispone en la actualidad, las de sílice (NP-SiO₂) y de magnetita (NP-Fe₃O₄) son de las más estudiadas, habiéndose encontrado múltiples aplicaciones como sistemas de almacenamiento y transporte de fármacos [41]. En este trabajo final de máster (TFM) se describen en el punto 1.2.1 las nanopartículas de sílice, NP-SiO₂, y en el punto 1.2.2 las de magnetita, NP-Fe₃O₄, dado que son una estrategia ampliamente utilizada en el almacenamiento [28] y administración [7,16,30] de fármacos, en diagnóstico o toma de imágenes [14]. Así mismo el recubrimiento de las nanopartículas con polielectrolitos (PE) es un punto clave en este trabajo ya que permite, en primer lugar, funcionalizar las nanopartículas y proteger los núcleos de la posible descomposición y agregación con otras nanopartículas presentes en el medio [17,68]. Además, el uso de polielectrolitos va a posibilitar la unión y protección de péptidos y

proteínas para su almacenaje y transporte. Las principales formas de poder almacenar y transportar estos péptidos y proteínas con polielectrolitos se dividen en dos grupos, según los métodos de síntesis. El primero, sería autoensamblado capa a capa (el más usado) y el segundo, por complejación con polielectrolitos [7]. Dado que péptidos y proteínas son susceptibles de degradación debido a variaciones de pH, presencia de enzimas hidrolíticas o procesos de desnaturalización asociados a la agregación, su adsorción a nanopartículas recubiertas por polielectrolitos los protegen de los procesos enumerado, permitiendo que lleguen a las dianas celulares con mayor eficacia [37,68].

1.2 Nanopartículas

La gran explosión en el desarrollo de las nanopartículas como transportadores de biomoléculas se inició en la década de 1960 cuando se consiguió la encapsulación de una biomolécula dentro de un liposoma como forma de administración controlada de un fármaco [55]. A partir de este hecho se han ido desarrollando distintos nanotransportadores tanto orgánicos como inorgánicos, entre los que cabe destacar los basados en sílice (SiO_2) y magnetita (Fe_3O_4). Esta evolución de las nanopartículas la recogen Shi J. y colaboradores en el esquema que aparece en la Ilustración 3, en el que se observa que inicialmente las nanopartículas eran más sencillas (simplemente encapsulando el fármaco) para pasar a ser nanopartículas más complejas capaces de dirigirlo y aportar diagnóstico [57].

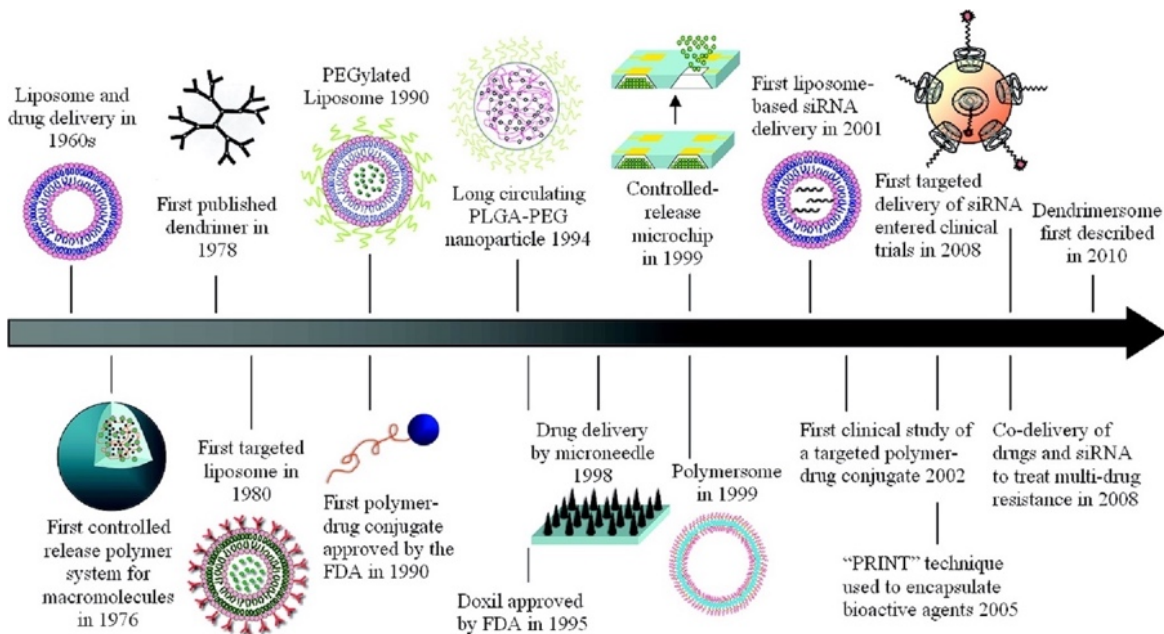


Ilustración 3. Evolución de las nanopartículas desde 1960 [57].

Cuando se quiere preparar nanopartículas, existen dos formas genéricas de sintetizarlas. La primera se conoce como “top-down” que quiere decir de arriba hacia abajo, que necesita técnicas de fabricación nanométrica muy precisas, siendo la nanolitografía la más usada. La segunda sería “bottom up” que quiere

decir de abajo hacia arriba, siendo reacciones químicas las que usan fuerzas de la naturaleza como los enlaces de hidrógeno, las interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals, entre otras, para llevar a cabo los enlaces específicos permitiendo un control de la forma y el tamaño de las nanopartículas. Estos métodos de síntesis hacen referencia, principalmente, al “core” o núcleo de la nanopartícula. Sin embargo, dada la complejidad y multifuncionalidad requerida en las distintas aplicaciones, la formación de la nanopartícula en su estado final suele requerir un ensamblaje/montaje (tipo “bottom up”) para incorporar recubrimientos, marcadores, ligandos direccionales, etc. El presente trabajo se ha desarrollado en el Laboratorio de Nanotecnología del Instituto de Investigación Biosanitaria de Elche (IDIBE), donde se realiza una aproximación bottom up para la síntesis de nanopartículas.

La estrategia del almacenamiento y transporte de péptidos y proteínas unidas a nanopartículas, capaces de tratar enfermedades se ha podido dar gracias a las investigaciones que permiten superar problemas como la estabilidad [50], la barrera reticuloendotelial [35,37], la acción del pH estomacal [35,37] o la eliminación por el filtrado renal [37,45], que se plantean al tratar de incorporar las proteínas al organismo en forma de principio activo.

El almacenamiento de péptidos y proteínas en disolución acuosa es importante para tener estos principios activos proteicos en forma de fármaco administrable. Los péptidos y proteínas presentan una alta inestabilidad debida a procesos físicos, como la desnaturalización que puede inducir otros como la agregación o fibrilación proteica. Por otra parte, existen una serie de procesos químicos que producen cambios en la identidad biológica de la proteína tales como la hidrólisis de enlaces peptídicos, la deaminación de glutaminas y asparaginas o la ruptura y formación de enlaces disulfuros [28, 50]. Todos estos procesos tienen como última consecuencia la pérdida de la función biológica de la proteína pudiendo, en muchos casos, la aparición de respuesta inmune del paciente cuando las estas proteínas son utilizadas como fármacos. Mientras que la degradación química de la proteína suele ser un proceso monomolecular y únicamente puede ser atenuado mediante el control de los parámetros externos (pH, temperatura, etc.), muchos de los procesos que involucran proteínas parcial o totalmente desplegadas son multimoleculares en los que la interacción atractiva entre moléculas individuales da lugar a la formación agregados proteicos incapaces de retomar la conformación nativa y activa de la proteína. En estos procesos, la atracción hidrofóbica juega un importante papel, aunque otras fuerzas intermoleculares están también involucradas [28, 50].

El transporte de proteínas o fármacos de origen proteico también presenta retos importantes debido a su elevado peso molecular y la hidrofilia de su estado nativo que dificultan la penetración y absorción a través de membranas biológicas sin inducir se desnaturalización. Además, su baja estabilidad frente a la hidrólisis

provocada por la presencia de enzimas hidrolíticos favorece la pérdida de su actividad antes de llegar a la diana molecular [56]. Cuando estos fármacos proteicos se administran de forma oral, las enzimas gástricas y el medio ácido, disminuyen su estabilidad conformacional y favorecen su digestión catalizada por proteasas aspárticas como la pepsina. Por suerte, ya existen sistemas basados en polímeros, lípidos y materiales inorgánicos de transporte capaces de mejorar la estabilidad de la proteína minimizando los procesos degradativos [68].

Los sistemas de entrega de biomoléculas corresponden al tercer obstáculo en la utilización de medicamentos proteicos debido a la corta vida media biológica, selectividad tisular, toxicidad potencial y riesgo de actividad cancerígena [21]. Es por ello, que existe un evidente interés en el desarrollo de sistemas transportadores capaces de preservar la actividad biológica de la proteína, evitar su rápida eliminación y liberarla de forma predecible. En la Ilustración 4, Du A. y colaboradores recogen posibles formas de transportar péptidos y proteínas. La sección (a) corresponde a la conjugación polímero-péptido/proteína y la (b) a su encapsulación física dentro de nanopartículas mediada por surfactantes, liposomas, polímeros, nanopartículas e hidrogeles [14]. De todas estas estrategias de transporte de péptidos y proteínas, los sistemas formados con polielectrolitos sintéticos son adecuados dado que aportan una mayor estabilidad, protección ante la degradación de enzimas y permeabilidad a través del sistema retículo endotelial, haciendo al fármaco proteico más biodisponible en el organismo [8].

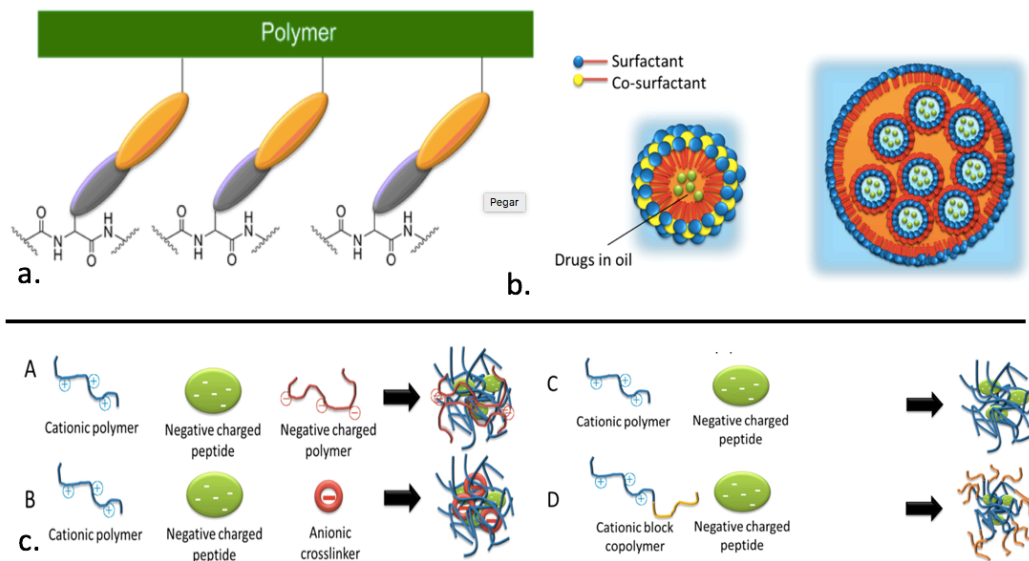


Ilustración 4. a. Esquema de transporte polímero-proteína, b. Esquema de transporte surfactantes-proteína c. Esquema de transporte polímero-proteína [14].

1.2.1 Nanopartículas de SiO₂

La sílice es el compuesto químico más abundante en la corteza terrestre [20], siendo sus propiedades superficiales las que explican las interacciones que es capaz de establecer que han sido utilizadas en campos como la cromatografía, la catálisis o la nanotecnología [69]. Una de las propiedades características de las nanopartículas es su elevada superficie específica, llegando a alcanzarse partículas capaces de exponer centenares de m² de superficie por grama de sustancia. Este aumento en el área superficial con respecto al material a granel es determinante para entender su excelente comportamiento como adsorbente de biomoléculas. Esta sílice en forma coloidal es funcionalizable, blanquecina y ópticamente incolora, lo que la hace ideal para su caracterización mediante técnicas espectrofotométricas, ya que al ser transparentes no interfieren con la radiación electromagnética en la zona del visible o del ultravioleta (UV) [69]. Las superficies de la sílice poseen exponen al medio acuoso grupos silanoles, -SiOH, capaces de ser ionizables mediante el aumento del pH del medio, siendo responsables de las reacciones que permiten tanto la adsorción de ligandos de carga opuesta como su funcionalización [69]. Si se representa una nanopartícula de sílice se observaría una estructura como la Ilustración 5. En contacto con un medio acuoso se produce la hidrólisis de grupos silano superficiales que daría lugar a la formación de silanoles que permiten establecer interacciones con otras moléculas presentes en el medio [69].

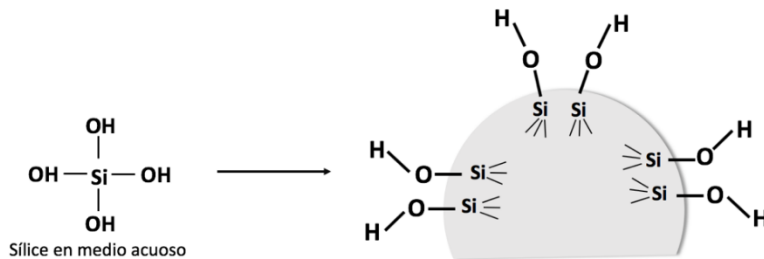
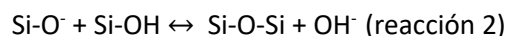
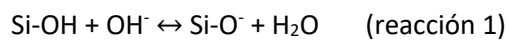


Ilustración 5. Nanopartículas de SiO₂ con la formación de los grupos silanoles en medio acuoso, siendo una molécula de silicio coordinada tetraédricamente a cuatro grupos hidroxilo.

La reacción 1 muestra un equilibrio de disociación protónica de los grupos silanoles en la superficie de las nanopartículas de sílice, SiOH/SiO⁻ (ácido/base), pudiendo ser desplazado en función del pH al que se encuentre la disolución. A partir de cierto pH las NP-SiO₂ poseerán carga negativa dado que el equilibrio se verá desplazado hacia la derecha, existe también el equilibrio de protonación Si-OH₂⁺ [36] pero únicamente es relevante a pHs extremadamente bajo (pH < 2) por lo que es poco importante en los pHs de interés.

Equilibrio de disociación:



Cabe decir que los sistemas básicos ($\text{pH} > 8$) podrían dar lugar al segundo equilibrio, que implicaría la reticularización de los silanoles [66].

Una forma de determinar la carga de la superficie de la NP-SiO_2 , es mediante las medidas de potencial Zeta que mide la intensidad del potencial eléctrico de la superficie de la nanopartícula a una distancia que incluye la primera esfera de solvatación de la nanopartícula. Por ello, el potencial Z es una medida directa de la densidad superficial de carga de la nanopartícula. Si se representa los valores del potencial Zeta a distintos valores de pH se obtiene una curva sigmoide y el valor al cual la nanopartícula presenta carga neta cero, o más conocido como punto isoeléctrico (PI) o punto de carga nula (PZC, por sus siglas en inglés).

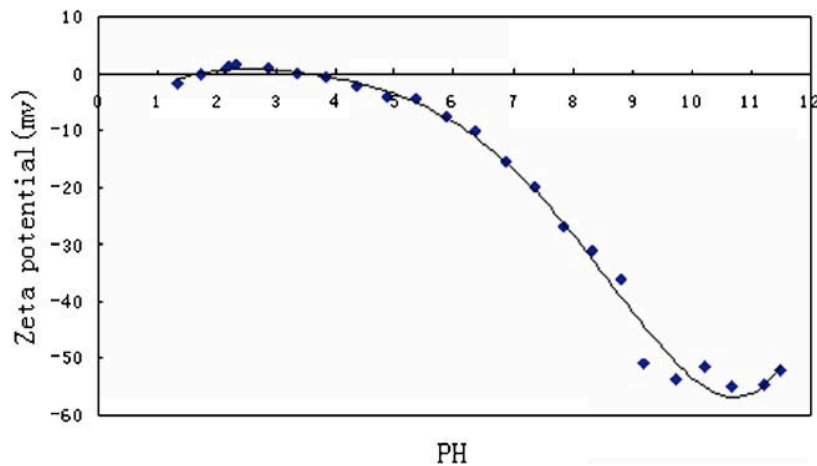


Ilustración 6. Variación del pH vs potencial Z de NP-SiO_2 [66].

La Ilustración 6 muestra la variación del potencial Z de la superficie de la sílice en función del pH. El punto isoeléctrico, es decir, donde las cargas positivas y negativas creadas por los grupos silanoles en la superficie de las nanopartículas de sílice son iguales, es alrededor de 3, por lo que en el rango de pH 4-12 las NP-SiO_2 poseen una carga superficial negativa creciente con el pH, teniendo afinidad por moléculas de carga opuesta. La molécula de carga opuesta interaccionaría con la NP-SiO_2 gracias a la atracción de cargas. Cuando NP-SiO_2 se pone en presencia de una molécula de carga opuesta se produce SU recubrimiento por parte de la molécula donde cada partícula tiene un solo núcleo de sílice, quedando un sistema híbrido individualizado [66], como el que muestra la Ilustración 7.

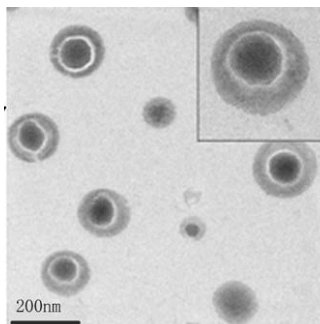


Ilustración 7. NP-SiO_2 híbrida tomada con TEM [66].

Debido a que las nanopartículas de SiO₂ a pH fisiológico tienen carga neta negativa y por tanto son sistemas coloidalmente estables (las partículas se repelen entre sí minimizando su tendencia a agregar), además de las propiedades de adsorción, las convierten en posibles transportadores de biomoléculas en el organismo [23, 41], que cuando son recubiertos de polielectrolitos aportan flexibilidad a la superficie del sistema híbrido resultante, mejorando la capacidad de transportar proteínas reduciendo los procesos de desplegamiento que inducirían a la agregación.

Al ser sustancias que han de estar en contacto directo con los seres humanos, se han llevado a cabo estudios de toxicidad y biocompatibilidad. Estos estudios muestran que las células expuestas a NP-SiO₂ no se ven alteradas, haciendo que no causen toxicidad, por lo que se consideran biocompatibles para la salud humana y el medio ambiente, estas características las hacen idóneas para la industria biomédica en la administración de fármacos proteicos [41]. Además, el hecho de que la FDA americana (Food and Drug Administration) apruebe, ya desde el siglo pasado, el uso de la sílice como aditivo alimentario, cosmético y medicinal, pone de manifiesto, aún más, la gran versatilidad y el gran potencial de las NPs de SiO₂.

La síntesis de las nanopartículas de sílice puede llevarse a cabo mediante diferentes métodos. Uno de los más habituales es a partir de silicatos en medio etanol y bajo condiciones básicas [8]. Otro de los métodos más extendidos para la obtención de partículas de sílice es el método pirogénico, en él mediante la combustión de tetracloruro de silicio en una llama de hidrógeno y oxígeno a alta temperatura se obtiene como resultado la formación de pequeñas partículas de sílice (sílice pirogénico) de tamaño nanométrico aproximado de unos 150 nm de radio hidrodinámico. En el caso del laboratorio de nanotecnología del IDIBE, se utilizaron nanopartículas de sílice pirogénico comerciales, CAB-O-SIL® M-5.

1.2.2 Nanopartículas de Fe₃O₄

Los óxidos de hierro son compuestos químicos que están formados a partir de hierro y oxígeno. La magnetita, Fe₃O₄, es un óxido mixto de hierro, donde el 27,6% de su masa corresponde al oxígeno y 72,4% al hierro, está formada por iones de Fe²⁺ y Fe³⁺, [Fe²⁺ (Fe³⁺)₂O₄], y es la forma más común utilizada en la síntesis de nanopartículas magnéticas. En este óxido las posiciones tetraédricas de su estructura cristalina están ocupadas por el ión Fe³⁺[47], mientras que los sitios octaédricos están ocupados por cantidades iguales de iones de Fe³⁺ y Fe²⁺[47]. Debido a esto, la magnetita es termodinámicamente inestable a presiones atmosféricas [47], tendiendo a oxidarse a formas más estables como la maghemita, γ-Fe₂O₃.

La estructura de la magnetita da lugar al comportamiento ferrimagnético, es decir, que se magnetiza en la misma dirección del campo magnético aplicado y como consecuencia de la presencia de dominios en el material, al retirar el campo magnético la sustancia quedaría magnetizada. Los dominios magnéticos de

un compuesto ferrimagnético y como se orientan en función del campo magnético se pueden ver en la Ilustración 8.

Los materiales magnéticos macroscópicos están formados por dominios que son zonas en las que los momentos magnéticos individuales de los átomos paramagnéticos se orientan una misma dirección y sentido (fig. 8.b). Al aplicar un campo magnético externo, los momentos magnéticos individuales de cada dominio se alinean con el campo externo. La susceptibilidad magnética de un material se define como su capacidad de interactuar con un campo magnético externo [47]. Si el tamaño de las partículas magnéticas se reduce por debajo del tamaño de los dominios magnéticos se obtienen nanopartículas con un solo dominio que tienen un comportamiento paramagnético. En cada una de estas partículas, los momentos magnéticos de sus átomos se orientan paralelamente lo que da lugar a un momento magnético fuerte para cada partícula. Una propiedad interesante de materiales paramagnéticos a nivel macroscópico es que los momentos magnéticos individuales (idénticos en módulo) se orientan al azar, por lo que su momento resultante es nulo ($M_{\text{total}} = 0$), no existiendo atracción magnética entre ellas. Al aplicar un campo magnético externo, se produce la orientación de todos los momentos magnéticos individuales generándose una intensa magnetización al interactuar el momento magnético de la muestra con el campo externo.

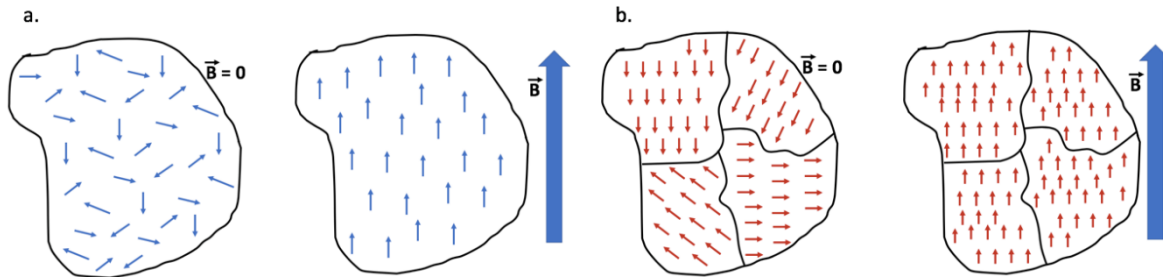


Ilustración 8.a. Material paramagnético antes y después de aplicar el campo magnético. b. Material ferromagnético antes y después de aplicar el campo magnético.

Las nanopartículas magnéticas se caracterizan por ser un sistema de transporte y entrega de biomoléculas adecuado debido a su tamaño, la posibilidad de funcionalización fácil y a la capacidad de respuesta a estímulos externos que permiten aplicar hipertermia y llevar a cabo liberación controlada [6, 33]. El hecho de tener aplicaciones directamente implicadas en la salud humana, crea inquietud sobre su toxicidad. Estos estudios según la bibliografía consultada no son concluyentes, considerándose de forma genérica a estas nanopartículas como poco dañinas para las células [40, 39]. Debido a estas discrepancias el recubrimiento con polielectrolitos supone en muchos casos una estrategia efectiva para su estabilización, biocompatibilidad y funcionalización [6].

Al igual que para las NP-SiO₂, a las NP-Fe₃O₄ en disolución acuosa también sufren especiación dando lugar a distintas especies con carga positiva, neutra o negativa. Es posible obtener los valores de la carga superficial con medidas de potencial Z. Al representar los valores del potencial Zeta frente al pH, se obtiene una curva sigmoideal [2] como la de la Ilustración 9. De esta gráfica se puede obtener el punto isoeléctrico que es aproximadamente 6.3 [2]. Como se observa en la gráfica, la partícula muestra una densidad de carga superficial positiva en el intervalo de pHs 1 - 6.3 y negativo en el rango de pHs de 6.3 - 14, de forma que a pH fisiológico se encontraría cargada negativamente. Cabe decir que esta carga negativa a pH 7 no es lo suficientemente alta (en valor absoluto) como para favorecer una elevada estabilidad coloidal, pero sí suficiente para establecer interacción con biomoléculas de carga opuesta, permitiendo que se produzca el recubrimiento con polielectrolitos de carga opuesta. Por tanto, un recubrimiento adecuado de las NP-Fe₃O₄ permite la funcionalización, haciéndolas biocompatibles y permitiendo la entrega en tejidos específicos [6].

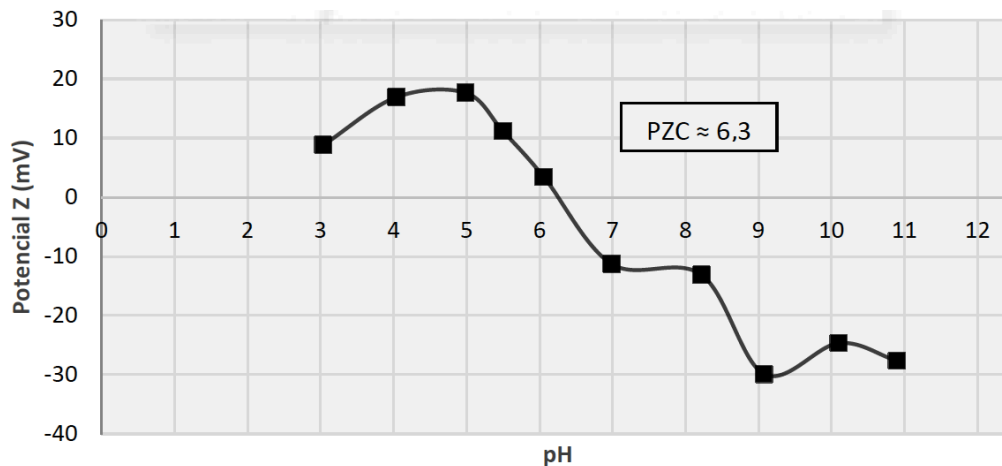


Ilustración 9. NP-Fe₃O₄ potencial Z vs pH. Imagen del laboratorio de nanotecnología del IDIBE.

1.2.3 Síntesis de NP-Fe₃O₄ por Co-precipitación

El método para obtener NP-Fe₃O₄ por co-precipitación es ampliamente conocido y sigue el esquema descrito por Massart R. en 1981, en el que a partir de FeCl₃ y FeCl₂ en medio amoniacal se obtiene un precipitado gelatinoso [44]. La Ilustración 10 representa la obtención de las nanopartículas de magnetita por el método de co-precipitación. Con los avances se ha ido observando que ciertas modificaciones como la desionización del agua, el ajuste del pH a 10 y trabajar bajo condiciones de atmósfera inerte (para evitar la oxidación de los iones Fe²⁺) mejoran la obtención de magnetita de forma instantánea [10, 24] y este producto se puede resuspender inmediatamente después en la disolución acuosa para sonificarlo, obteniendo las NP-Fe₃O₄ de tamaño próximo a los 10 nm, según medidas hechas con microscopías electrónicas de transmisión (TEM) o Barrido (SEM). Cuando se obtiene el diámetro hidrodinámico de las

nanopartículas con medidas de dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en ingles de dynamic light scattering), muestran un valor de 194 nm, esto es debido a que también incluye la esfera de solvatación y posibles agregaciones de nanopartículas en suspensión.

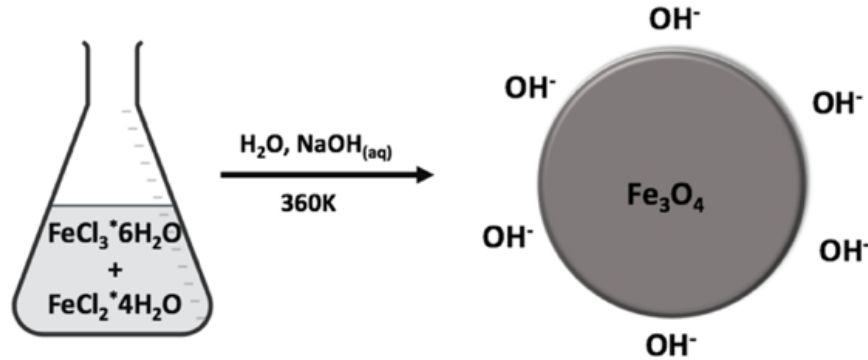


Ilustración 10. Esquema de la síntesis de NP- Fe_3O_4 por Co-precipitación

1.2.4 Síntesis de NP- Fe_3O_4 por método solvotérmico

En este caso se sigue la descripción hecha por Liu J. y colaboradores, en el que se adiciona cloruro férrico, citrato trisódico, Na_3Cit , y acetato de sodio (AcNa) utilizando etilenglicol (EG) como disolvente. Tras 30 minutos de agitación y posterior sellado en autoclave se incuba la mezcla a 200°C durante 10 h. El tamaño final de las partículas obtenidas depende de la relación de concentraciones citrato: FeCl_3 , obteniéndose partículas en el rango 150 – 350 nm con alta reproducibilidad [33]. Una de las principales ventajas de este tipo de NP- Fe_3O_4 corresponde a la gran facilidad de separación del medio acuoso en el que se encuentra, ya que, debido a su tamaño intermedio, muestran una rápida cinética de decantación magnética [33]. Esto disminuye drásticamente los tiempos de espera con respecto a las nanopartículas de magnetita obtenidas por co-precipitación (generalmente se un tamaño sensiblemente inferior) no requiriendo procesos de centrifugación para separar la fase sólida del sobrenadante como ocurre con las partículas de sílice [33].

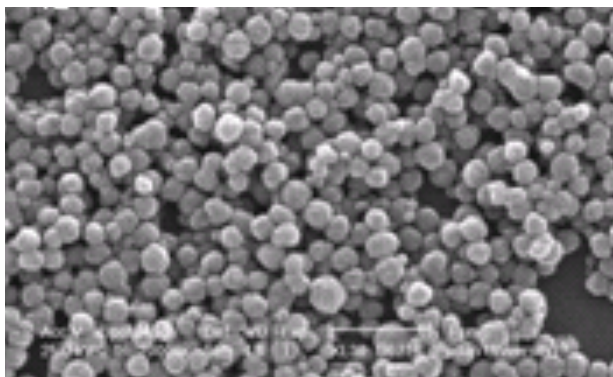


Ilustración 11. NP- Fe_3O_4 obtenidas por método solvotérmico, imagen de SEM [33].

En el laboratorio del nanotecnología del IDIBE, se sintetizan NP-Fe₃O₄ tanto por el método de coprecipitación como las de solvotérmico. En este trabajo se seleccionaron las preparadas por el método solvotérmico, dado que su mayor tamaño permite tener una relación entre la estabilidad coloidal y la capacidad de precipitarse con imanes más eficiente.

1.3 Polielectrolitos

Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), los polielectrolitos (PE) son macromoléculas, que poseen una parte con grupos ionizables, que pueden disociarse al disolverse en un disolvente polar, dejando que los contraiones se difundan en la solución sirviendo de carga opuesta a la estructura principal [7,27]. Los PEs son en su mayoría solubles en agua y muestran propiedades únicas atribuidas principalmente a sus interacciones electrostáticas y flexibilidad de su cadena [7]. Hay distintas clasificaciones de polielectrolitos (PE) y dependiendo de la bibliografía consultada hace referencia a una u otra. Bourgain V. y colaboradores elaboraron una tabla, que se ha recogido en la Ilustración 12 donde estructuran las posibles clasificaciones, siendo un total de seis clasificaciones distintas dependiendo del parámetro elegido, como naturaleza, procedencia o grupo ionizable.

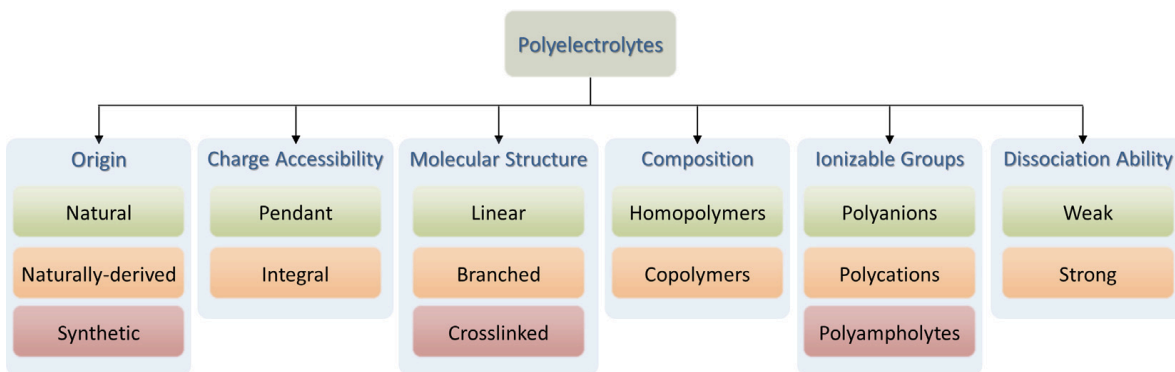


Ilustración 12. Clasificación de los polielectrolitos [7].

La primera y más frecuentemente usada, es en función de su procedencia pudiendo ser naturales, semisintéticos y sintéticos. La segunda clasificación corresponde a la accesibilidad de la carga, dependiendo si está en la cadena principal o en las ramificaciones. La tercera hace referencia a la estructura molecular, pudiendo ser lineal, ramificada o reticulada. La cuarta se basa en la composición obteniendo dos posibilidades, homopolímeros, cuando la unidad base de repetición (monómero) es siempre la misma y copolímeros cuando la unidad base de repetición puede ser de dos o más tipos diferentes. La quinta la clasifican en función del grupo ionizable, quedando tres posibilidades, polianiones, como el ADN, el PSS (poli estireno sulfonato de sodio), PAA (ácido poliacrílico), PGA (poly L-ácido glutámico), policationes como PAH (el hidroccloruro de polialilamina), PDADMACI (Polidialildimeltilamino

de cloro), quitosano, PLL (polilisina) y polianfolitos que muestran tanto cargas positivas como negativas, como las proteínas o los obtenidos por derivatización de policationes o polianiones. Y la sexta y última en función de la capacidad de disociación del grupo ionizable, pudiendo ser fuertes y débiles [7].

En este trabajo se usan polielectrolitos sintéticos comerciales como PEI (polietilenimina) siendo un polielectrolito catiónico ramificado que contiene aminas primarias, secundarias y terciarias en proporción 1:2:1. Además, en el laboratorio se sintetizó el PEI-COOH en el que los grupos amino fueron derivatizados utilizando ácido bromoacético según la descripción hecha por Ning W. y colaboradores [49]. La Ilustración 14 muestra la estructura de amos polielectrolitos ramificados.

El hecho de usar estos polielectrolitos sintéticos se debe a la combinación de varios factores, el principal es usarlos como transportadores de proteínas, siendo las proteínas polianfolitos débiles, que muestran baja densidad de carga y tienen grupos con carga negativa y positiva [7]. Además, hay que excluir el uso de tóxicos como disolventes orgánicos y que eviten la desnaturalización de las proteínas [7]. Hay estudios que demuestran que el uso de PE ejerce efectos de inhibición en las enzimas proteolíticas [15], teniendo como gran ventaja la capacidad de hacer que el fármaco proteico tenga una mayor biodisponibilidad.

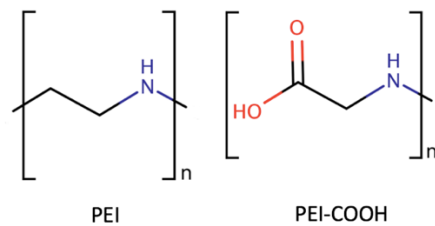


Ilustración 13. Monómeros de los polielectrolitos.

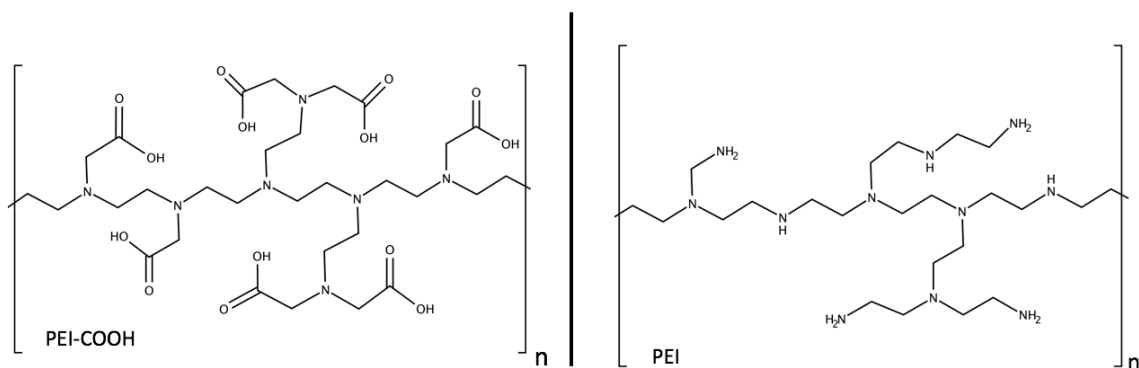


Ilustración 14. Posibles estructuras ramificadas de los PEs

Una de las aplicaciones clave que tienen los polielectrolitos es la capacidad de estabilizar coloidalmente a las nanopartículas inorgánicas [27]. Las nanopartículas de SiO₂ y de Fe₃O₄, exponen una carga neta en función del pH, haciendo que las fuerzas de interacción que se producen entre ellas mismas sean determinantes para evitar o no su aglomeración para formar estructuras más grandes. Para evitar este

comportamiento de agregación, es necesario maximizar las fuerzas de repulsión electrostáticas o estéricas con moléculas que queden adsorbidas a la superficie de las nanopartículas. Los polielectrolitos consiguen la estabilización tanto estérica como la electrostática, aumentando la estabilidad coloidal de la nanopartícula reduciendo así su tendencia a la aglomeración [27]. La Ilustración 15 muestra NP-SiO₂ y NP-Fe₃O₄, estabilizadas por el PE a pH 7, es decir, que las nanopartículas quedan rodeadas del polielectrolito haciendo que sea un sistema coloide estable (NP-SiO₂@PEI o NP-Fe₃O₄@PEI).

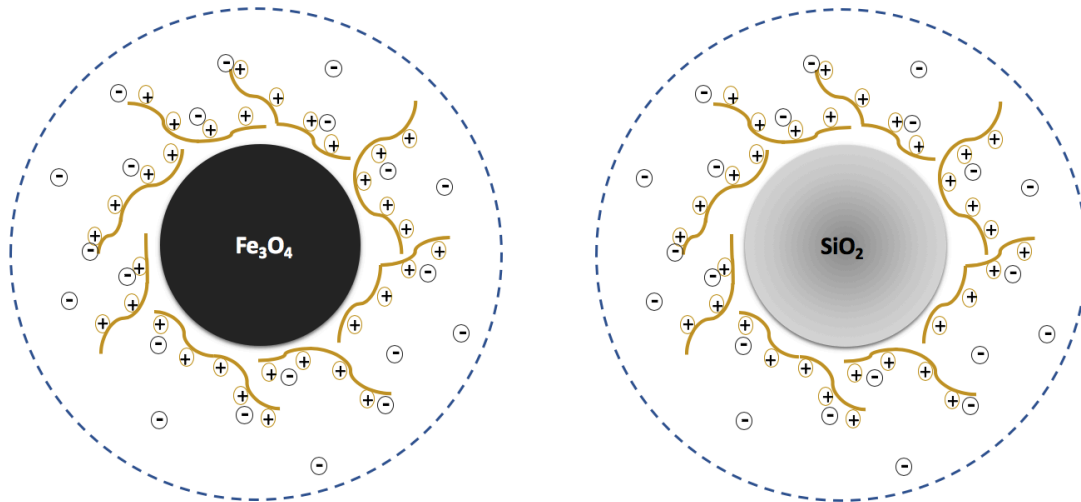


Ilustración 15. Estabilización de NP-SiO₂ y NP-Fe₃O₄ por polielectrolito de carga positiva a pH 7

La obtención de nanopartículas recubiertas de polielectrolito requiere un primer proceso de síntesis de la nanopartícula y su posterior recubrimiento con un polielectrolito de carga opuesta a la de la superficie sólida. Posteriormente, se pueden depositar sobre la superficie de la nanopartícula capas sucesivas de polielectrolitos de carga opuesta de forma secuencial. Este tipo de ensamblaje de multicapas secuenciales, se lleva a cabo con el mecanismo de autoensamblaje capa por capa o más conocido como recubrimiento capa-a-capo (o layer by layer, LbL, por sus siglas en inglés). De esta forma se puede variar la carga superficial de la partícula pudiendo ajustar tanto el grosor como la naturaleza de la esfera de recubrimiento [22, 56].

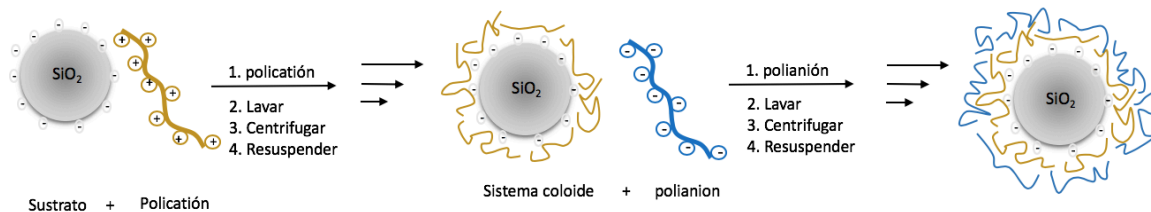


Ilustración 16. Un ciclo de recubrimiento de un sustrato por PEs de carga opuesta mediante la técnica del LbL.

Esta técnica fue descrita en 1966 por Iler, pero no fue hasta 1990 cuando realmente se empezó a utilizar. El esquema que sigue esta técnica está descrito en la Ilustración 16, en el que tras obtener las

nanopartículas estabilizadas se les añade una molécula de carga opuesta, pudiendo ser tanto polielectrolito como proteína u otro tipo de biomolécula, que hay que lavar, centrifugar y resuspender, así sucesivamente hasta obtener el espesor y la aplicación final deseada [56]. Hasta la fecha, no hay ninguna otra forma de llevar a cabo el crecimiento del recubrimiento de partículas de forma controlada para favorecer la adsorción de ligandos de naturaleza definida.

El recubrimiento capa-a-capas es una técnica ampliamente utilizada en los sistemas transporte y liberación de fármacos, un ejemplo de ello, es el estudiado para la insulina [17]. La insulina queda adsorbida a polielectrolitos consiguiendo formar agregados individualizados de 100-230 nm, donde permanece sin desnaturalizarse en condiciones de almacenamiento en disolución o liofilizada [17]. El procedimiento de formación de polielectrolito recubierto de insulina (PE@insulina) se hace mediante la técnica LbL. La obtención de la estructura final requiere de varios ciclos de adsorción y centrifugación repetidos, resultando un proceso largo y tedioso. Sin embargo, de esta forma es como hasta ahora se consigue una potencial preservación de la actividad proteica, dado que no lleva procedimientos preparativos severos ni se usan disolventes orgánicos, ofreciendo este método una alta capacidad de transporte de insulina en las nanopartículas [17].

1.4 Proteínas

En este trabajo se utiliza la β -Lactoglobulina como proteína modelo catiónica a pH neutro y la lisozima como proteína modelo aniónica a pH fisiológico. Igualmente, se utilizaron dos colorantes aniónicos de distinta densidad de carga: Azul de tripano y Carmín de índigo.

1.4.1 β -Lactoglobulina

La β -Lactoglobulina se puede ver en la Ilustración 17 en su forma dimérica. Se trata de una proteína de unos 18,4 kDa que se encuentra en altas concentraciones en la mayoría de la leche de los mamíferos, haciéndola especialmente accesible. Dicha proteína ha sido ampliamente estudiada por sus aplicaciones en la industria [50] y por la reacción alérgica que provoca en algunos humanos [9,45]. Posee dos enlaces disulfuro y existen dos variantes genéticas la forma A y B, que difieren en dos aminoácidos a largo de la cadena de los 162 aminoácidos. En la forma A, los aminoácidos Asp-64 y Val-118 son reemplazados por glicina y alanina respectivamente para dar la forma B, pudiendo estar en diferentes formas oligoméricas dependiendo del pH, temperatura, fuerza iónica y concentración [46]. A pH inferior a 3 y fuerza iónica baja (10 mM) presenta predominantemente su forma monomérica y de pH 3 a pH > 8 con fuerza iónica moderada (100 mM) corresponde la forma dimérica [46]. Al ser globular se adsorbe fuertemente a superficies hidrofílicas, especialmente las que presentan carga opuesta [45,46]. La β -Lactoglobulina posee

un punto isoeléctrico alrededor de 5, por lo que a partir de pH 5 la proteína tiene carga neta negativa, pudiendo ser atraída por superficies de carga positiva en el rango de pH de 5-14 [46], este rango se encuentra dentro del pH fisiológico. La adsorción de la proteína a las nanopartículas recubiertas de polielectrolito (NP@PE), pueden determinarse midiendo la concentración de proteína que queda sin adsorber en la disolución tras alcanzar el equilibrio con la superficie de la NP, por métodos espectrofotométricos haciendo uso de su capacidad para absorber luz ultravioleta debido a los dos residuos de triptófano presentes en la β -Lactoglobulina.

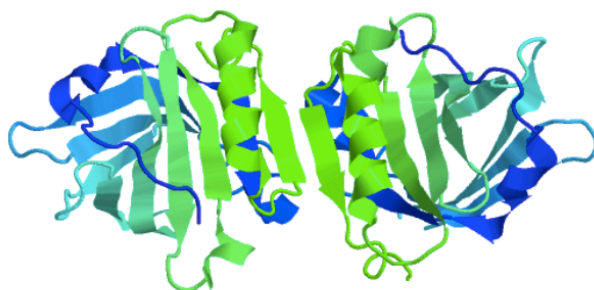


Ilustración 17. β -Lactoglobulina en forma dimérica obtenida de Protein Data Base.

Parámetros	β -Lactoglobulina
Peso molecular	18281 Da
Coefficiente de extinción	0,948 (mg/mL) ⁻¹ cm ⁻¹
Punto isoeléctrico (PI)	≈5
Radio hidrodinámico	2 nm
Triptófanos	2 residuos

Tabla 1. Características de la β -Lactoglobulina

1.4.2 Lisozima

La lisozima fue descubierta por primera vez en 1922 por Alexander Fleming debido a los goteos nasales que tuvo sobre un plato petri de cultivo bacteriano que en presencia de ese moco se lisiaron (Fleming A., 1922), llamando a esta nueva sustancia “Lisozima”. Fue para 1965 cuando Philips D. Ch. resolvió la estructura de la lisozima obtenida con rayos X con una resolución de 2 Å., en esta publicación recoge la secuencia primaria secuenciada por Canfield y Liu en 1965, Ilustración 18 a. La Ilustración 18 b muestra estructura de la lisozima obtenida de Protein Data Bank con una resolución de 1,7 Å.

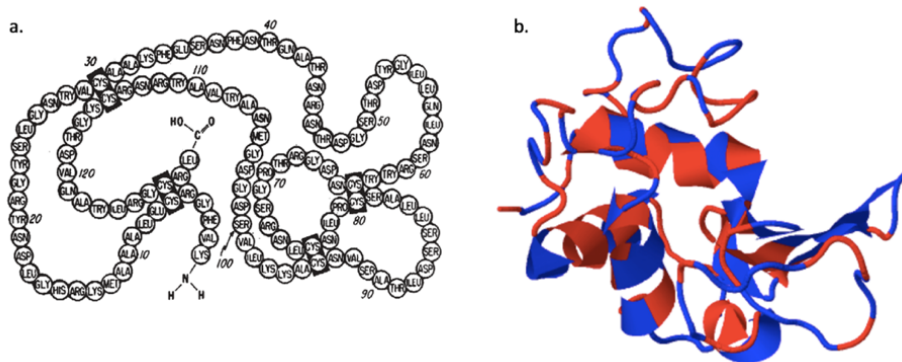


Ilustración 18. a. Secuencia primaria de la Lisozima descrita por Canfiel y Liu en 1966, [48]. b. Lysozyme de clara de huevo. Representación obtenida de PDB (3LYZ), donde los colores muestran la hidrofobicidad.

La lisozima de clara de huevo de gallina (HEWL) es una proteína ampliamente caracterizada por su fácil obtención a partir de la clara de huevo y se encuentra presente en secreciones humanas como saliva, moco, leche y lágrimas. En la industria alimentaria es de especial interés, por ser uno de los posibles alérgenos que contiene el huevo, dado que éste es utilizado como aditivo, conservante, espumante y por sus propiedades antibacterianas [12]. Posee un peso molecular de unos 14,7 kDa con una cadena polipeptídica sencilla de 129 aminoácidos. Sus ocho residuos de cisteína están involucrados en un total de cuatro puentes disulfuro que le confieren una alta estabilidad conformacional. Es especialmente soluble debido a la presencia de 11 argininas, que son responsables del elevado punto isoeléctrico cercano a 11 [Protein Data Base].

Esta enzima (EC 2.2.1.17) se caracteriza por la capacidad de hidrolizar los enlaces β -1,4 glicosídico entre el ácido N-acetil müramico y la N-acetil-D-glucosamina en peptidoglicano, afectando a la pared celular de las bacterias Gram positivas, siendo este el origen de su actividad antibacteriana. Esta actividad hidrolítica le ha hecho que tenga otros nombres, uno de ellos es 1,4-N-acetilmuramidasa [48].

En este trabajo se va a utilizar la cuantificación de la proteína por espectrofotometría con barridos de absorbancia de 250-400 nm, que se debe principalmente a los residuos de triptófanos, siendo responsables de la absorbancia a 280 nm, ver Ilustración 19. Se han recogido los datos característicos de esta proteína en la tabla 2.

Parámetros	Lisozima
Peso molecular	14700 Da
Coefficiente de extinción	2,653 (mg/mL) ⁻¹ cm ⁻¹
Punto isoeléctrico (PI)	≈11
Radio hidrodinámico	--
Triptófanos	6 residuos

Tabla 2. Características de la Lisozima

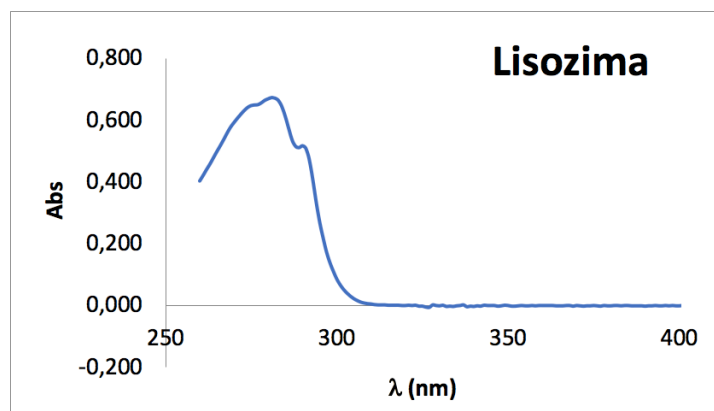


Ilustración 19. Espectro de absorción de la lisozima

1.4.3 Colorantes: azul de tripano y carmín de índigo

Como una aproximación preliminar, previa al estudio con proteínas, se pueden utilizar moléculas que posean varios grupos cargados. En este trabajo se han utilizado como primera aproximación el azul de tripano (TB por sus siglas en inglés, Azul de tripano) y el carmín de índigo (IC por sus siglas en inglés, Carmín de índigo). Ambos poseen grupos sulfonato (SO_3^-), ver Ilustración 20, que en disolución muestran una carga neta negativa. Para el caso del TB presentaría cuatro cargas negativas y para el IC serían dos. Estas dos moléculas han sido seleccionadas porque presentan además la ventaja de adsorber luz en la zona visible del espectro electromagnético, permitiendo cuantificar fácilmente la cantidad de biomolécula adsorbida al sistema coloide NP-SiO₂@PE, por técnicas espectrofotométricas, ver tabla 3.

Parámetros	Carmín de índigo	Azul de tripano
Peso molecular	466,35 g mol ⁻¹	960,8 g mol ⁻¹
Coefficiente de extinción	26050 M ⁻¹ cm ⁻¹	51700 M ⁻¹ cm ⁻¹
Tipo	aniónico	aniónico
Longitud de onda	608 nm	610 nm

Tabla 3. Características de Carmín de índigo y Azul de tripano

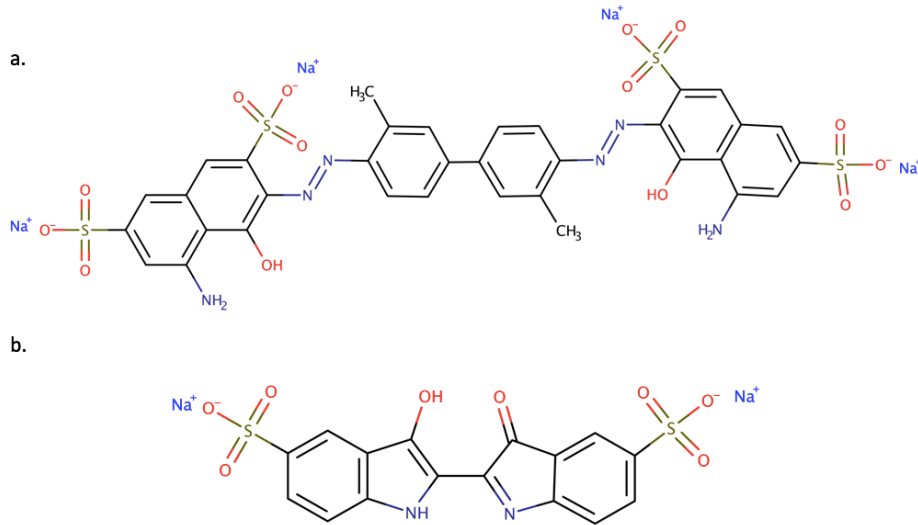


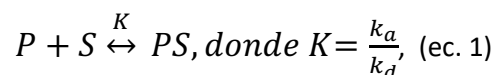
Ilustración 20. a) Estructura del Azul de tripano. b) Estructura del Carmín de índigo.

1.5 Adsorción de Biomoléculas. Isotherma de Langmuir.

Langmuir estableció tres postulados para describir la adsorción sobre una superficie:

- I. Formación de una monocapa de moléculas adsorbidas.
- II. Todos los sitios de la superficie tienen la misma probabilidad de ser ocupados.
- III. No hay interacción entre moléculas adsorbidas.

La adsorción de proteínas a superficies sólidas ha sido habitualmente modelizada asumiendo que se forma una única capa de adsorbato [29, 47]. En primera aproximación, el modelo de Langmuir [1,42] ha sido utilizado para analizar cuantitativamente la adsorción de proteína a superficies sólidas asumiendo el establecimiento del equilibrio siguiente:



donde P, S y PS representan el soluto, P (biomolécula) en disolución, los sitios de superficie, S (sistema coloidal) disponibles para la adsorción de soluto y en la parte de la derecha de la ecuación, representaría el soluto adsorbido en los sitios de superficie, PS, respectivamente. Por su parte, k_a y k_d representan las constantes de velocidad cinética de adsorción y desorción, respectivamente. Haciendo las correspondientes operaciones matemáticas, la adsorción de la proteína al sistema coloidal, permite expresar la conocida como isoterma de Langmuir [1,47,64]:

$$q = \frac{q_{max}K [P]}{1+K[P]} \text{ (ec. 2)}$$

q representa la cantidad de biomolécula adsorbida por gramo de sistema coloidal en equilibrio, $[P]$ la concentración de biomolécula libre no adsorbida durante el equilibrio con la superficie y q_{max} la cantidad máxima de ligando que puede ser adsorbida por unidad de masa de partícula sólida.

Cuando se trabaja con condiciones saturantes a elevada $[P]$, y se cumple la condición que $[P] \gg \gg K_d$ siendo $K_d = 1/K$, la ecuación se reduce a:

$$q = \frac{m_{proteína}}{m_{NP}} = q_{max} \quad (\text{ec. 3})$$

despejando, resulta:

$$m_{proteína} = q_{max} \cdot m_{NP} \quad (\text{ec. 4})$$

Por lo que al incubar una cantidad constante de nanopartícula, m_{NP} , con cantidades crecientes de proteína, la cantidad de proteína adsorbida, $m_{proteína}$, aumentará linealmente.

2. Objetivos

Estudios anteriores del grupo de investigación permitieron observar que al preparar nanopartículas de sílice o magnetita recubiertas de polielectrolitos de carga opuesta, se producía una correlación entre el exceso de polielectrolito utilizado en la síntesis del sistema coloide y la capacidad de recubrimiento de la nanopartícula resultante, así como en la capacidad de adsorción de las NP a ligandos de alta afinidad. El recubrimiento crecía de forma progresiva y no saturante con el exceso de polielectrolito añadido, dando lugar a lo que se denominaron superestructuras. Dichas superestructuras aparecían cuando el recubrimiento de la nanopartícula con un polielectrolito catiónico se obtenía en presencia de un exceso de aniones multivalentes, tales como $-SO_4^{2-}$ y $-PO_4^{3-}$.

Se determinó que la cantidad de polielectrolito que formaba parte del recubrimiento dependía de la concentración del anión multivalente. Estos estudios permitieron demostrar que los aniones multivalentes actuarían como nodos entre las distintas moléculas de polielectrolito lo que permitía un crecimiento en la cantidad de polielectrolito que formaba parte del recubrimiento.

En base a dichas observaciones se llevó a cabo la formulación de la hipótesis de trabajo y objetivo de mi trabajo final de máster.

2.1 Objetivo general e hipótesis de trabajo:

El objetivo general de este trabajo es desarrollar un método que permita utilizar ligandos multivalentes como las proteínas para aumentar el grosor del recubrimiento de nanopartículas utilizando un exceso de polielectrolito.

Hipótesis de partida

Al añadir a la nanopartícula recubierta con polielectrolito tanto proteína como polielectrolito en exceso se produciría el siguiente proceso (consideremos un polielectrolito catiónico (+) y una proteína aniónica (-):

- 1.- Moléculas de proteína (-) se adsorberían al recubrimiento de la nanopartícula formado por el polielectrolito catiónico (+). Como consecuencia, al recubrirse toda la superficie del polielectrolito la carga expuesta al medio será la de la superficie de la proteína (-).
- 2.- La presencia en el medio de moléculas de polielectrolito (+) libre, hará que éste se adsorbiese sobre la superficie de la nanopartícula (-), de carga negativa al exponerse al medio la última capa de proteína adsorbida,
- 3.- Las moléculas de proteína se adsorberían sobre la última capa de proteína y posteriormente las de polielectrolito, produciéndose un recubrimiento capa-a-capo en un solo paso.

2.2 Objetivos específicos:

- Recubrir de polielectrolitos sintéticos nanopartículas de SiO₂ y Fe₃O₄.
- Establecer la sinergia de crecimiento del recubrimiento de la nanopartícula por medio de polielectrolito positivo y una molécula orgánica negativa (colorante o proteína)
 - Cuantificar la capacidad de carga de las nanopartículas de sílice recubierta por PEI (NP-SiO₂-PEI) en ausencia y presencia de PEI libres utilizando azul de tripano (TB)
 - Determinar la influencia de la carga del ligando sobre el sistema NP-SiO₂-PEI / PEI-libre comparando los resultados obtenidos con el azul de tripano (4 cargas negativas) y el carmín de índigo (2 caras negativas).
- Comprobar la hipótesis de trabajo con β-lactoglobulina como proteína aniónica y PEI como polielectrolito catiónico.
- Comprobar la hipótesis de trabajo con lisozima como proteína catiónica y PEI-COOH como polielectrolito aniónico.
- Estudiar la influencia de la fuerza iónica del medio en la formación de las superestructuras formadas por nanopartículas y su recubrimiento de proteína y polielectrolito.

3. Material y Métodos

3.1 Métodos espectrofotométricos

La espectrofotometría es una técnica ampliamente utilizada en la identificación y cuantificación analitos por su sencillez, y aplicabilidad. Se basa en la capacidad que tienen las moléculas al absorber energía luminosa y almacenarla en forma de energía interna. La mecánica cuántica dice que la luz está compuesta por fotones y cada uno de ellos tiene una energía de acuerdo a la ecuación:

$$E_{foton} = h \nu = h c / \lambda, \text{ (ec. 5)}$$

Donde h es la constante de Planck, ν la frecuencia de la onda asociada, c la velocidad de la luz y λ su longitud de onda. Lo que muestra esta ecuación es que las moléculas absorben fotones de una determinada longitud de onda cuya energía es igual a la diferencia entre dos de los estados estacionarios del electrón. Como la diferencia entre el estado fundamental y el estado excitado ha de ser igual a la energía del fotón absorbido, se obtiene que la energía absorbida por una sustancia en función de la longitud de onda de la radiación incidente (espectro de absorción) es una propiedad característica de la sustancia.

La intensidad de la luz se atenúa al atravesar la celda que contiene la muestra debido a que se produce la absorción a una determinada λ , cuando la luz recorre una distancia d en una muestra con una concentración de moléculas se produce una atenuación de la intensidad, de acuerdo a la conocida ley de Lambert-Beer, que relaciona la absorbancia (A) de la muestra con la concentración (C):

$$A = d \varepsilon [C] \text{ (ec. 6)}$$

donde d es la distancia que recorre el haz de luz, que es 1cm y ε el coeficiente de extinción molar de la muestra.

Para las medidas espectrofotométricas el equipo utilizado es el SHIMADZU UV2600/2700 UV-VIS (Tokio, Japón) y cubetas de cuarzo supra sil con dos de sus caras opuestas pulidas, que permiten el paso de la luz a través de ellas, permitiendo trabajar tanto en el visible como en el UV.

3.2 Dispersión Dinámica de la Luz (Dynamic Light scattering, DLS)

Hay distintas técnicas que permiten la caracterización del tamaño de las nanopartículas, entre ellas se encuentra la dispersión dinámica de la luz (DLS), se trata de una técnica rápida, y no invasiva. Es considerada una técnica de elección para la caracterización físicoquímica de suspensiones coloidales [8], siendo capaz de medir tamaños submicrométricos de partículas en suspensión.

La medida consiste, básicamente, en hacer incidir un láser sobre las partículas en suspensión que se encuentran fluctuando en el fluido con un movimiento browniano, movimiento zigzagueante aleatorio de la partícula, por lo que el láser mide las fluctuaciones temporales de la luz dispersada, a partir de lo que se

determina el coeficiente de difusión translacional (D) y este lo correlaciona con el diámetro de la partícula con la ecuación [43]:

$$D = \frac{KT}{3\pi\eta d(h)} \text{ (ec. 7)}$$

D: coeficiente de difusión translacional

K: constante de Boltzman

d(h): diámetro hidrodinámico

T: temperatura

η : viscosidad

Las partículas de la dispersión se mueven más rápidamente cuanto más pequeñas son. Por otro lado, la intensidad de la luz dispersada aumenta con el tamaño de las partículas. Por tanto, midiendo la variación temporal la intensidad de la luz dispersada, la técnica de DLS permite obtener la distribución de tamaños de la dispersión analizada.

El diámetro de las partículas que se obtiene utilizando esta técnica es el diámetro hidrodinámico, a diferencia de otras técnicas como podría ser la microscopía electrónica de transmisión, debido a la realización de las medidas en disolución la partícula incluye la esfera de solvatación, que la acompaña en el movimiento, ver Ilustración 21. El equipo elabora una correlación de la intensidad de la señal en un determinado tiempo (t) y lo compara con la intensidad a una diferencia de tiempo (Δt), con esta correlación, que es clave, dado que cuando la correlación se pierde rápidamente significa que las fluctuaciones son rápidas, indicando elevada difusión y por lo tanto partículas de pequeño tamaño. El tratamiento matemático de la señal detectada en función del tiempo permite calcular la distribución de tamaño de la muestra analizada [43].

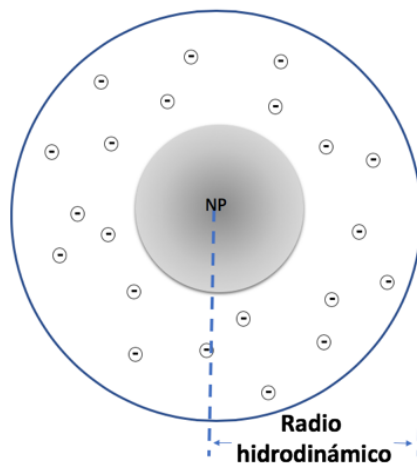


Ilustración 21. Radio hidrodinámico de una nanopartícula en suspensión coloidal.

3.3 Potencial Zeta

Con este mismo DLS se puede obtener medidas del potencial Zeta que es una medida de la densidad superficial de carga de la nanopartícula [24, 43]. El valor del potencial Z se deduce a partir de la movilidad electroforética de las nanopartículas en un campo eléctrico [43]. Las nanopartículas cargadas al aplicar un campo eléctrico se dirigen hacia el electrodo de carga opuesta. Cuando las fuerzas atractivas se compensan con la viscosidad del medio, las partículas se moverán a velocidad constante, este valor de velocidad se conoce como movilidad electroforética (μ_e); $\mu_e = \frac{v}{E}$ donde v es la velocidad de las partículas y E el campo eléctrico. A partir de este valor y con la función de Henry se obtiene el potencial Zeta. La función de Henry que relaciona movilidad electroforética con el potencial Zeta sería [43]:

$$f(k_a) = \frac{\mu_e^3 \eta}{2 \varepsilon Z} \text{ (ec. 8)}$$

η : viscosidad del medio

ε : constante dieléctrica

Z: potencial Zeta.

El potencial Zeta es un parámetro clave para conocer que el sistema coloidal es estable, dado que la presencia de carga indica que se producen repulsiones electrostáticas entre las partículas dispersas, por lo que a mayores valores de potencial Zeta (en valor absoluto) mayor estabilidad del sistema coloidal, por el contrario cuando el potencial Zeta es próximo a cero, el sistema coloidal tiende a coagular y formar precipitados en el fondo de la disolución.

El uso del DLS es una técnica de fácil manejo y de rápidos resultados, pudiendo permitir la identificación de los recubrimientos efectuados sobre la nanopartícula.

3.4 Recubrimiento de Nanopartículas

3.4.1 Recubrimiento de NP-SiO₂ con polielectrolito

La preparación de NP-SiO₂ recubiertas con PEI (NP-SiO₂@PEI) se llevó a cabo a partir de nanopartículas de sílice comercial CAB-O-Sil, como muestra la Ilustración 22, según el protocolo descrito a continuación: Se prepara una disolución [NP-SiO₂] = 5 mg/mL y otra de [PEI] = 50 mg/mL. Antes de usar el PEI se ajusta a pH a 7 y se adiciona tampón HEPES, permitiendo mantener la disolución alrededor de pH 7.

Una vez preparadas ambas disoluciones se ponen a agitar cada una de forma individual y para recubrir las NP-SiO₂ del PEI, se hace en condiciones de exceso de PEI. Se adicionan la dispersión de sílice (de 100 μ L en 100 μ L con micropipeta automática) sobre la disolución de polielectrolito bajo condiciones de agitación vigorosa. La dispersión resultante se deja incubar 24 horas con agitación, tiempo suficiente para que se produzca el recubrimiento. Tras este periodo, la dispersión se centrifuga 30 minutos a 13000 rpm y se lava

el pelet con agua, repitiendo este proceso por triplicado. En cada lavado la muestra se somete a sonicación en baño por un periodo de 15 minutos, para favorecer la desagregación de las NP formadas. Finalmente, se resuspenden en 40 mL de H₂O y sonican por un periodo de 45 minutos, obteniendo el tamaño de partícula deseado. El llevar a cabo este proceso de lavado junto al sonicado permite favorecer la obtención de partículas individuales recubiertas de PEI. Durante el proceso de recubrimiento y resuspensión de las nanopartículas se sigue la evolución del tamaño de las NP-SiO₂@PEI mediante DLS y la carga de la NP antes y después de su recubrimiento.

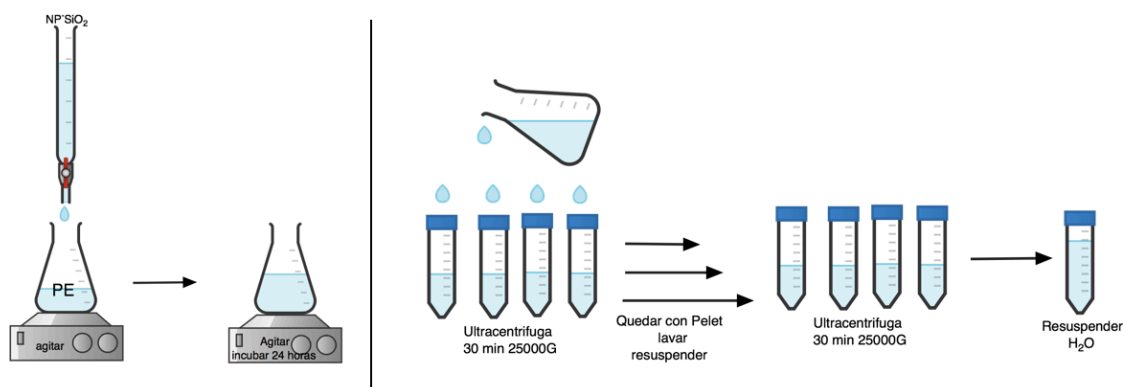


Ilustración 22. Preparación y recubrimiento de NP-SiO₂ a partir de CAB-O-SIL[®] M-5 y un polielectrolito ambos comerciales.

3.4.2 Recubrimiento de Nanopartículas de magnetita. NP-Fe₃O₄

Las NP-Fe₃O₄ seleccionadas para la realización de los experimentos habían sido previamente sintetizadas en el laboratorio. Se trabajó con NP-Fe₃O₄ recubiertas con el PEI o PEI-COOH. La síntesis del núcleo magnético se realizó utilizando el método solvotérmico. El recubrimiento se realizó incubando el PE con las NP-Fe₃O₄ por un periodo de 16 horas. Posteriormente, se procedía al lavado con agua milliQ y decantación magnética de las NPs para eliminar el exceso de polielectrolito. Una vez obtenidas las nanopartículas se caracterizaban en base a su tamaño y potencial Z mediante DLS.

También estaba prevista la realización de experimentos con NP de magnetita recubiertas de sílice. La metodología de síntesis de NP-Fe₃O₄/SiO₂ se estaba poniendo a punto en el laboratorio, ver Ilustración 23, partiendo de NP-Fe₃O₄ coloidales obtenidas por el método de co-precipitación y utilizando metodologías sol-gel, basadas en el proceso Stöber [60,13].

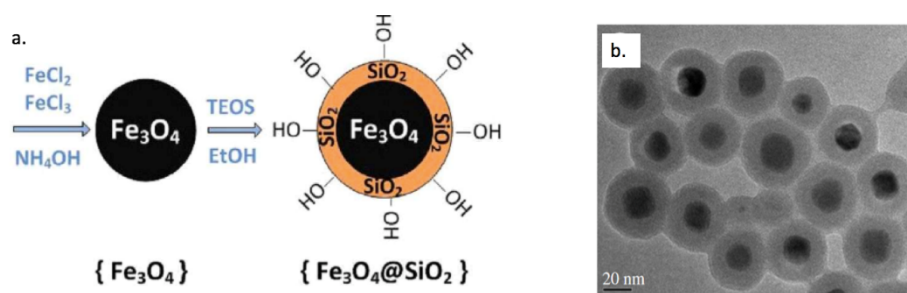


Ilustración 23 .a) Ilustración esquemática del procesos de síntesis de NP- Fe_3O_4 recubiertas de sílice [13]. B) Imagen de TEM de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ [31]

Estas nanopartículas híbridas NP- $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ serían recubiertas posteriormente por polielectrolitos de carga positiva el PEI o PDADMA para obtener NP con carga positiva a pH fisiológico. Para la obtención de NP de carga negativa se optaría por la realización de un recubrimiento múltiple (con la técnica LbL) de PEI-COOH en la capa más externa sobre NP- $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2@\text{PEI}$.

3.5 Cuantificación de las nanopartículas

3.5.1 Cuantificación por residuo seco de NP- SiO_2

La cuantificación de las nanopartículas de sílice recubierta con polielectrolito, NP- $\text{SiO}_2@\text{PEI}$, se realizó determinando la cantidad de residuo seco de muestras de volumen conocido sometidas a desecación a 120 °C. Se toman tres muestras de 1 mL de la disolución final (NP- $\text{SiO}_2@\text{PEI}$) en un eppendorf de 2mL, que ha sido perforado y pesado previamente. El termobloque se pone inicialmente a 80°C durante 16 horas y pasado este tiempo se aumenta a 120°C por un periodo de 3 horas más, tras este tratamiento térmico se enfría y pesa, hasta obtener pesada constante, en balanza analítica.

3.5.2 Cuantificación espectrofotométrica de NP- Fe_3O_4

La cuantificación de las nanopartículas de magnetita recubierta de PEI, NP- $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$, se realiza disolviendo la partícula en medio ácido y determinando la cantidad total de hierro utilizando la 1,10-fenantrolina como indicador, que es una adaptación del método de Stucki y Anderson [61]. Esta reacción (reacción 3) se basa en la formación de un complejo de coordinación entre la 1,10-fenantrolina y el Fe^{2+} , de forma que se necesita la acción de un agente reductor, en nuestro caso es la hidroxilamina que transforma el Fe^{3+} en Fe^{2+} , dando un compuesto orgánico heterocíclico, con el ion Fe^{2+} , ver Ilustración 24. El complejo formado es altamente estable y presenta una fuerte absorción en el espectro visible con un máximo a 512 nm, lo que permite la cuantificación del ión Fe^{2+} por comparación con una recta de calibrado preparada en condiciones semejantes. De forma que el hierro total se cuantifica como Fe^{2+} , no Fe_3O_4 , para

ello se ha disolver la partícula en medio fuertemente ácido y transformar previamente todo el hierro a Fe^{2+} .

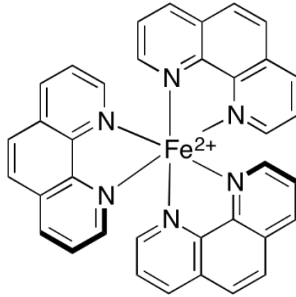
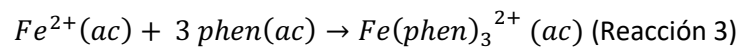


Ilustración 24. Complejo de coordinación del Fe^{2+} con la fenantrolina

La reacción entre el hierro y la fenantrolina tiene una estequiometría 1:3 y es la siguiente:



El procedimiento experimental corresponde al siguiente:

Previo a la cuantificación, se sonicán las muestras para disgregarlas.

- a. Disolver las NP- $Fe_3O_4@PEI$ en HCl. En un eppendorf de 2 ml se adiciona:

1400 μ L de HCl 5 M + 100 μ L NP- Fe_3O_4 + termobloque 60°C 3 horas (tapados) \rightarrow Disolución A

- b. Si se dejan en medio ácido no se produciría el equilibrio con la fenantrolina, para ello se prepara la disolución siguiente justo antes de medir espectrofotométricamente.

100 μ L Disolución A + 500 μ L Hidroxialmina + 1400 μ L AcO^- 1M (pH 5) \rightarrow Disolución B

- c. Con esta disolución B se preparan distintas muestras en la que se adicionan volúmenes crecientes de Disolución B y 200 μ L de Fenantrolina, completando con agua hasta un volumen de 1500 μ L. Se determina la absorbancia a 512 nm de cada muestra y con el coeficiente de extinción molar ($\epsilon = 16284 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) se obtiene la concentración de Fe en cada muestra. Se representa concentración frente a V_o/V_{total} y se obtiene la pendiente del ajuste a una recta que pasa por el origen. A partir del valor de la pendiente obtenida tras la corrección por todas las diluciones hechas y la estequiometría se obtiene la concentración de la muestra de NP- $Fe_3O_4@PEI$ como mg/mL de Fe_3O_4 .

$$[Fe_3O_4] \left(\frac{mg}{mL} \right) = \frac{\text{pendiente} \cdot \text{factor de dilución total} \cdot PM \text{ (magnetita)}}{1000 \cdot 3}$$

3.6 Determinación de la capacidad máxima de adsorción y sinergia del crecimiento de NP@PE con colorantes

Como primera aproximación al estudio con biomoléculas de carácter proteico, que permite establecer la sinergia de crecimiento entre nanopartícula (NP@PE), biomolécula y polielectrolito, se trabaja con dos colorantes el Azul de tripano y el Carmín de índigo. Como parámetro fundamental indicador de la existencia de sinergia se seguirá la capacidad de adsorción o capacidad de carga de los sistemas formados por NP o NP/PE libre.

Como no se tiene valores de referencia de la capacidad de carga del sistema coloidal formado por NP-SiO₂@PEI, se ha de obtener de forma experimental. Para ello, se preparan varias muestras a valores crecientes de concentración de nanopartícula recubierta de PEI (NP-SiO₂@PEI) y se adiciona un valor constante de [TB], se dejan incubar por un periodo de 3 horas, tiempo suficiente para que se produzca la adsorción del colorante. Posteriormente, se centrifugan las muestras (30 minutos a 12000 rpm, rotor F44-12-11) para separar el pelet del sobrenadante, quedando en el sobrenadante el colorante que no se ha adsorbido y se mide la absorbancia a 610 nm. La absorbancia obtenida permite, a través de la ley de Lambert-Beer, determinar la concentración de TB no adsorbida y así elaborar una gráfica como la de la Ilustración 25, en la que se representa la cantidad de colorante en el sobrenadante (colorante no adsorbido) en función de la cantidad de nanopartícula añadida. Tal y como se observa en la Ilustración 25, para una concentración dada de TB al ir aumentando las concentraciones de NP-SiO₂@PEI disminuye la concentración de TB que queda en el sobrenadante. Este comportamiento refleja que a mayores cantidades de NP-SiO₂@PEI mayor es la cantidad de TB que es adsorbida, hasta llegar a un punto donde la cantidad de TB resultante en el sobrenadante es cero debido a la adsorción completa del TB sobre las NP-SiO₂@PEI.

A partir de la pendiente de la recta de la zona inicial se obtiene el parámetro q_{\max} , que como indica la ecuación 4 corresponde a

$$m_{\text{proteína}} = q_{\max} \cdot m_{\text{NP}}$$

A esta forma de obtener el valor de q_{\max} directamente de la pendiente de la recta obtenida por la representación de los valores experimentales la denominamos método 1.

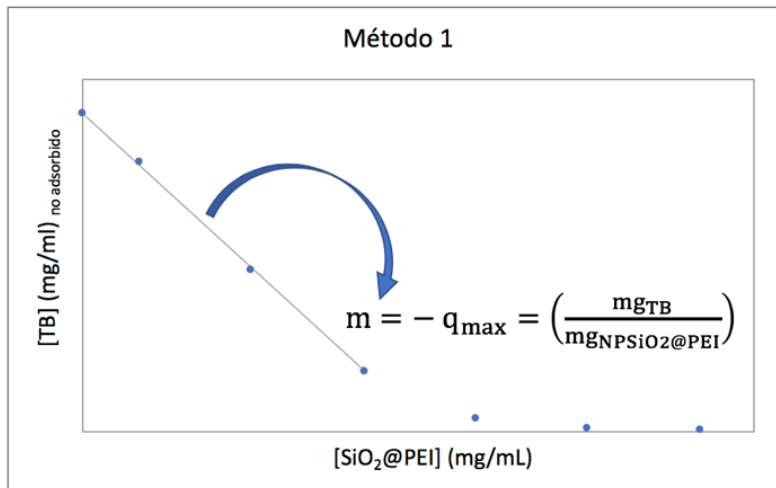


Ilustración 25. Obtención de la q_{\max} por el método 1

En el presente trabajo la hipótesis de partida es la formación de una superestructura que implica el crecimiento del recubrimiento de la nanopartícula mediante la interacción sinérgica de proteína y polielectrolito. Las moléculas de ligando deberían actuar como nodos entre las capas del PE, creando la superestructura que se puede ver en la Ilustración 26.

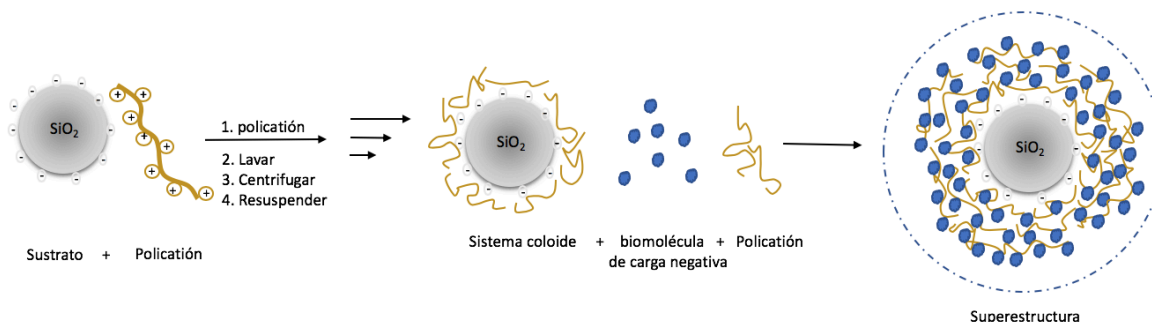


Ilustración 26. Formación de la superestructura a partir de una nanopartícula recubierta de polielectrolito, biomolécula y exceso de polielectrolito en la disolución.

Para probar que es mecanismo del crecimiento del recubrimiento es el planteado en la Ilustración 26, se pretende determinar la cantidad máxima de ligando (colorante o proteína) adsorbido por unidad de masa de nanopartícula, q_{\max} . Sin embargo, el proceso tiene tres variables de las que dependerá: las cantidades individuales de nanopartícula, proteína y polielectrolito. Con objeto de realizar un estudio sistemático, se decidió mantener constante el cociente de concentraciones de ligando (colorante o proteína) y polielectrolito y variar la cantidad de nanopartícula, NP@PE..

$$\text{cociente} = \frac{m(\text{ligando})}{m(\text{PE})} \quad (\text{ec. 9})$$

En el caso del azul de tripano, TB, y PEI (polielectrolito) se prepararon muestras en las que se mantuvo constante el cociente TP/PEI, y se varió la cantidad de nanopartícula ($SiO_2@PEI$) presente en la dispersión.

Tras un periodo de incubación de 3 horas en agitación, y posterior centrifugación por un periodo de 30 minutos a 12000 rpm se mide la absorbancia del sobrenadante. Al representar la cantidad de colorante presente en el sobrenadante (no unida a la nanopartícula) frente a la cantidad total de nanopartícula presente en la dispersión, se obtiene el valor de q_{max} (masa de TB que adsorbe la unidad de masa de NP, ver Ilustración 25 y ec. 5). El experimento se repitió para distintos cocientes TP/PEI 0.0; 0.1; 0.25; 0.5; 0.75 y 1.0. Al analizar los resultados obtenidos por este método 1 y debido a la variación simultánea de relación entre biomolécula/nanopartícula y biomolécula/PE libre, se produce un error sistemático, reflejado en la Ilustración 27. Como se observa en la representación, la esperada “zona lineal” tienen tendencia a curvarse hacia abajo. Esto hace replantear la metodología utilizada en la determinación del valor de q_{max} .

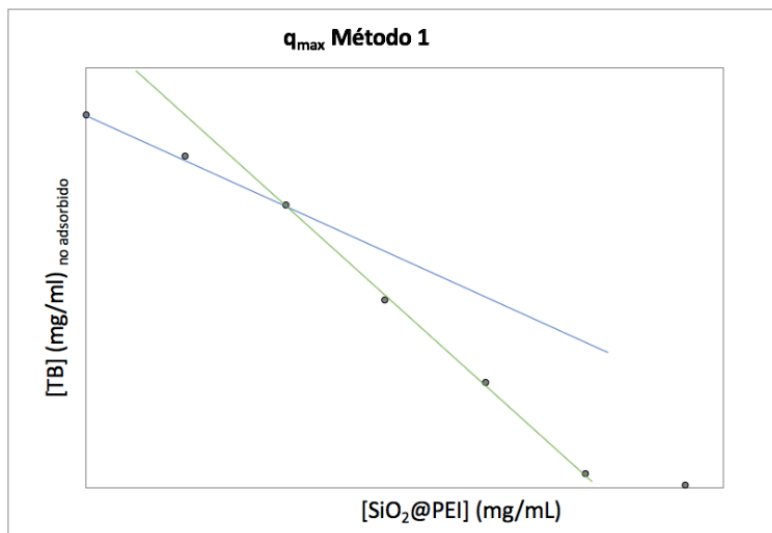


Ilustración 27. Obtención del valor de q_{max} en presencia de exceso de PE libre por el método 1

El cambio de metodología experimental para la determinación del valor de q_{max} se basó en determinar el “punto de equivalencia” o de “saturación” de la nanopartícula. Para ello, se mantiene constante la cantidad de nanopartícula y polielectrolito y a la se añaden cantidades crecientes de colorante (TB).

Como muestra la Ilustración 28, al comienzo (en presencia de un exceso de nanopartícula y polielectrolito) todo el ligando queda adsorbido por lo que no se detecta en el sobrenadante.

Una vez que la superficie de nanopartícula se satura con ligando, el exceso de colorante permanece en el sobrenadante, cuya concentración aumenta linealmente.

El punto de equivalencia se determina como el punto de corte de la línea recta definida por el aumento de la cantidad de colorante en el sobrenadante en función de la cantidad total inicialmente añadida y el eje X.

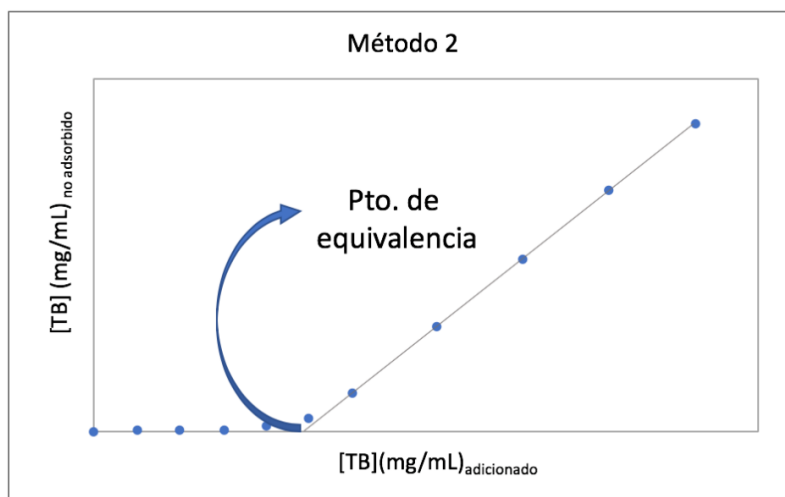


Ilustración 28. Obtención de q_{max} por el método 2.

A partir del punto de equivalencia, correspondiente al valor de TB máximo adsorbido, se divide por la cantidad de NP-SiO₂@PEI utilizada en el experimento y se obtiene el valor de q_{max} . Esta forma de calcular el valor de q_{max} a partir del punto de equivalencia se le llama método 2.

Una vez calculados los valores de q_{max} para distintos cocientes PEI/TB: 0.0; 0.1; 0.25; 0.5; 0.75 y 1.0; se elabora una gráfica representando el cociente vs q_{max} . Esta gráfica permite estudiar el tipo de tendencia que sigue el nuevo método de crecimiento sinérgico, que según la hipótesis propuesta se esperaba que fuese lineal.

Una vez establecida la metodología de crecimiento, se verificó con otra molécula distinta también de carga neta negativa a pH 7, el carmín de índigo (IC). El carmín de índigo, representa una disminución del 50% de la carga que expone con respecto al TB, lo que permite determinar la influencia de la carga del ligando en la formación de la superestructura. Nuevamente se estudia la capacidad del sistema formado por NP-SiO₂@PEI al ponerlo en contacto con un determinado exceso de PEI libre y concentraciones crecientes de IC, para formar una superestructura con mayor capacidad de carga que se compara con la obtenida en ausencia del exceso de PEI libre. Con esta otra molécula se aplicó directamente el método 2 para la obtención de los valores de q_{max} para cocientes IC/PEI de 0; 0,1; 0,25; 0,5, que permiten ver la relación de q_{max} al aumentar el cociente de concentraciones.

3.7 Desarrollo previsto inacabado o no realizado

3.7.1 Sinergia de crecimiento entre NP@PE y Biomoléculas

Una vez obtenidos los resultados con los colorantes TB e IC, ambos con carga negativa, y establecida la metodología de cuantificación de q_{\max} , se planificó el estudio con proteínas modelo.

Las proteínas modelo seleccionadas fueron la β -Lactoglobulina (β -LG), como modelo de proteína cargada negativamente a pH fisiológico, y la lisozima (LZM), como proteína de carga positiva. Los recubrimientos de las nanopartículas estarían formados por polielectrolitos de carga opuesta a la proteína a adsorber, PEI para β -LG y PEI-COOH para LZM.

Se decidió cambiar el tipo de núcleo de la nanopartícula, en lugar de NP-SiO₂ las partículas utilizadas serían de magnetita (NP-Fe₃O₄). La razón fue puramente metodológica ya que la separación magnética de las nanopartículas (en contraposición a su centrifugación) hace más sencillo el trabajo experimental, especialmente cuando los polielectrolitos forman complejos insolubles con las proteínas utilizadas.

A partir de NP suministradas en el laboratorio (NP-Fe₃O₄@PEI y NP-Fe₃O₄@PEI-COOH) sintetizadas por el método solvotérmico y ya recubiertas, tras su cuantificación, se planificaron los experimentos a realizar para establecer la sinergia del crecimiento. Se disponía de dos sistemas: el formado por β -LG, NP-Fe₃O₄@PEI y PEI libre ; y el de LZM, NP-Fe₃O₄@PEI-COOH y PEI-COOH libre.

Los experimentos serían análogos a los descritos para las NP-SiO₂@PEI y colorantes, con la diferencia de cambiar la centrifugación por decantación magnética. Se determinaría un primer valor de q_{\max} en ausencia de polielectrolito libre y luego q_{\max} a distintos cocientes proteína/polielectrolito utilizando el método 2 (manteniendo constante la concentración de NP-Fe₃O₄@PE y con concentraciones crecientes de proteína). Nuevamente, la concentración de molécula no adsorbida, en este caso proteína, se determinaría por métodos espectrofotométricos a partir de la absorbancia a 280 nm del sobrenadante. En estas medidas espectrofotométricas se haría siempre un barrido de 260-400 nm para tener el espectro completo, verificando la estabilidad y homogeneidad de la disolución de proteína. En caso de apreciarse valores de absorbancia no despreciables entre 350-400 nm se realizaría un tratamiento de las disoluciones, presumiblemente un cambio de pH, para evitar errores en la determinación debido a la presencia en el sobrenadante de partículas en suspensión (probablemente complejos proteína-polielectrolito).

Únicamente se pudieron realizar medidas preliminares con NP-Fe₃O₄@PEI-COOH y LZM. Se trató de determinar la q_{\max} en ausencia de PEI-COOH libre por el método 1 y se realizó un primer intento de crecimiento sinérgico con polielectrolito libre. Sin embargo, los experimentos revelaron cierta inestabilidad de las NP-Fe₃O₄@PEI-COOH, por lo que se decidió variar ligeramente el abordaje utilizado para obtener las nanopartículas magnéticas. En lugar de partículas NP-Fe₃O₄ directamente recubiertas de

polielectrolito, se trabajaría con NP-Fe₃O₄ recubiertas de sílice, que crearía una capa “estabilizadora” alrededor del núcleo magnético.

La metodología de obtención y recubrimiento estaba siendo puesta a punto por personal del laboratorio, ver Ilustración 23. Tal y como se ha descrito previamente, a partir de nanopartículas magnéticas sintetizadas por co-precipitación, se hace crecer una capa de sílice mediante el proceso Stöber. La superficie expuesta es, por tanto, SiO₂ que se recubriría directamente de PEI o de PEI-COOH mediante LbL sobre un primer recubrimiento de PEI.

Con estas nuevas partículas suministradas por el personal del laboratorio (NP-Fe₃O₄/SiO₂@PEI y NP-Fe₃O₄/SiO₂@PEI@PEI-COOH) se pretendía estudiar la sinergia de crecimiento. β-LG y LZM serían las proteínas modelo y se utilizaría la metodología anteriormente descrita para NP-Fe₃O₄@PEI y NP-Fe₃O₄@PEI-COOH.

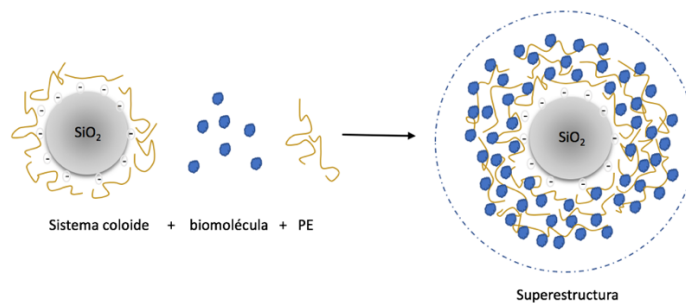


Ilustración 29. Sinergia de crecimiento en un único paso a partir de una NP-SiO₂@PE al ponerla en una misma solución que contiene PE y biomolécula.

3.7.2 Influencia de la fuerza iónica en la sinergia de crecimiento entre NP@PE y biomoléculas

Finalmente, con el objetivo de determinar la influencia de la fuerza iónica sobre la formación y estabilidad de las superestructuras, se llevarían a cabo experimentos en presencia de NaCl variable. La presencia de sales en el medio debe influir en la adsorción de la biomolécula al polielectrolito, ya que las interacciones son principalmente electrostáticas. La presencia creciente de sal puede disminuir la adsorción observada en los experimentos anteriores, debido al apantallamiento que sufren las cargas por los iones presentes en el medio. En medio fisiológico la fuerza iónica suele ser aproximadamente de 100-150 mM. Se realizarían experimentos en ausencia de PE libre y con un exceso de PE determinado $q_{\text{máx}}$ en función de la concentración salina: 0; 50; 100; 150; 200 y 250 mM de NaCl.

Además, si la disminución en $q_{\text{máx}}$ resultase ser elevada, por la presencia de NaCl en el medio, se estudiaría la posibilidad de producir la desestabilización de superestructuras ya formadas por adición de NaCl como método de liberación de la biomolécula. Para ello, se formaría la superestructura en ausencia de fuerza iónica a una determinada concentración de NP, proteína y PE libre, tras decantación magnética y

eliminación del sobrenadante se procedería a resuspender las nanopartículas en presencia de NaCl. Tras una segunda decantación magnética se cuantificaría la presencia de proteína en el sobrenadante para determinar su liberación. Podría caracterizarse la estabilidad de la proteína liberada por dicroísmo circular, fluorescencia o calorimetría y compararse con la proteína nativa intacta.

4. Resultados y discusión

4.1 Recubrimiento de las NP-SiO₂ con PEI

A partir de NP-SiO₂ comerciales para obtener NP-SiO₂@PEI, se preparó una disolución de NP-SiO₂ sonicada. Se caracterizó el tamaño y la carga de las nanopartículas antes del recubrimiento siendo su diámetro hidrodinámico ≈160 nm y presentando carga neta negativa a pH 7 (pZ= -24 mV). Después del tratamiento con PEI (incubación en agitación, sonicación, lavado y resuspensión) se volvió a determinar el diámetro hidrodinámico y potencial Z obtenido, para determinar el correcto recubrimeinto, mediante DLS. El tamaño de las NP-SiO₂@PEI resultantes fue de 146 nm con una polidispersidad de 0,136 y un potencial Z de +25 a pH 5,83. Los valores determinados reflejan que el sistema coloidal formado tiene el tamaño óptimo, homogeneidad en la población, estabilidad coloidal y que el recubrimiento ha sido efectivo. Los datos de caracterización de tamaño y potencial Zeta están recogidos en la tabla 4, donde se incluyen además los valores de tamaño durante el recubrimiento. La necesidad de disgregación de las nanopartículas por ultrasonido durante el recubrimiento y tras las recuperaciones se muestra imprescindible para la obtención de NP “individualizadas”.

	Tratamiento	Tamaño (nm)	Polidispersidad	Potencial Z (mV)
NP-SiO ₂	Disolución pH 7	161 ± 3	0,195	-24 ± 1
NP-SiO ₂ @PEI	Exceso PEI	799 ± 3	0,473	
NP-SiO ₂ @PEI	Exceso PEI, sonicación.	213 ± 3	0,214	
NP-SiO ₂ @PEI	centrifugación, lavado y sonicación	146 ± 3	0,136	+ 25 ± 1 (pH 5,83)

Tabla 4. Caracterización diámetro y potencial Zeta de NP-SiO₂@PEI por DLS.

La cuantificación de NP-SiO₂@PEI se realizó por residuo seco en termobloque hasta pesada constante, obteniendo un valor de 30,1 mg/mL de NP-SiO₂@PEI.

La elección del PEI para el recubrimiento se debe a su peso molecular y ramificación, dado que incrementa la probabilidad de formar estructuras complejas. Además, es ampliamente utilizado en la bibliografía y por lo tanto está bien caracterizado. Preliminarmente, también se llevó a cabo el recubrimiento con PDADMACI de alto peso molecular (400-500 kDa), que presenta como ventaja la independencia de su carga con el pH. Sin embargo, finalmente se optó por el PEI ya que permite su derivatización para formar PEI-COOH. De esta forma, con una misma base estructural se dispone de un polielectrolito con carga positiva y otro con carga negativa.

4.2 Sinergia de crecimiento con TB

Como primera aproximación para establecer la sinergia de crecimiento entre una biomolécula y el polielectrolito, se trabaja con el colorante Azul de tripano.

Se procedió a obtener los valores de q_{max} , para el sistema formado por NP-SiO₂@PEI con el método 1 en ausencia de polielectrolito libre. En el método 1, tal y como se ha descrito previamente, se adicionan concentraciones de NP-SiO₂@PEI creciente y constante de TB, las muestras se dejan incubar por 3 horas para que se produzca la adsorción. Se centrifuga y separa el pelet, donde se encuentran las nanopartículas con el colorante adsorbido, del sobrenadante. Este sobrenadante, que es donde queda el colorante sin adsorber, se mide a 610 nm. A partir de la absorbancia del sobrenadante se determina la cantidad de TB no adsorbido y se representa frente a la concentración de NP-SiO₂@PEI añadida, pudiendo así elaborar la gráfica de la Ilustración 30. A partir de la pendiente de la zona lineal inicial se puede obtener directamente el parámetro q_{max} (pendiente = $-q_{max}$), que tiene un valor de 0,190 mg TB/mg NP. La gráfica, además de proporcionar de forma directa el valor de q_{max} , permite hacer una aproximación inicial más intuitiva de los valores de concentración de NP-SiO₂@PEI y de TB requeridos en el método 2.

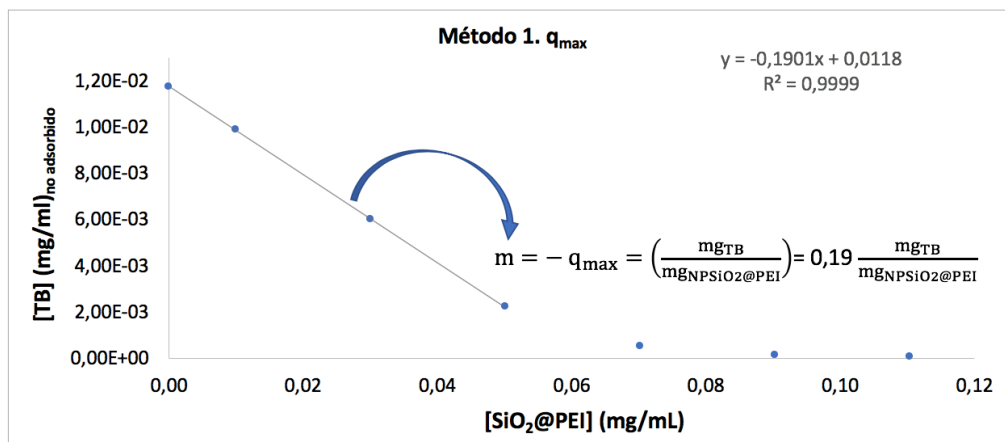


Ilustración 30. Obtención de q_{max} por método 1.

Para determinar la sinergia del crecimiento y posible formación de superestructuras por la presencia de PEI libre, se llevaron a cabo una segunda tanda de experimentos en presencia de polielectrolito en exceso. Para una cantidad de TB constante se añaden concentraciones crecientes de NP-SiO₂@PEI, además, a las muestras se les adiciona PEI libre. La cantidad de PEI adicionado con respecto a la cantidad de NP-SiO₂@PEI se mantiene constante, y es lo que hemos definido como Ratio. Se realizaron experimentos a Ratios 0,1 y 0,5 mg/mg.

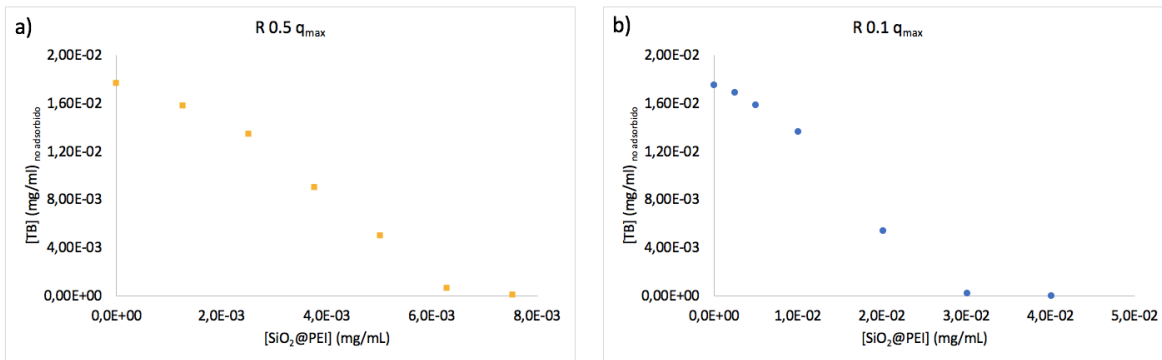


Ilustración 31. Determinación de q_{max} por el método 1 para Ratio 0.1 y 0.5

Las gráficas obtenidas, Ilustración 31, a partir de la representación de los datos experimentales, muestran cierta curvatura. Según la tendencia observada parecería que a bajas concentraciones de NP la adsorción fuese menor que a concentraciones moderadas, próximas a la zona de adsorción total. Este comportamiento, no lineal y complejo, se atribuye a la variación relativa de la cantidad de ligando (azul de tripano) con respecto al exceso de polielectrolito libre. En la zona inicial el exceso de ligando es muy grande y, por tanto, no se produce prácticamente unión de un mismo ligando a varias cadenas de polielectrolito. No se favorece la unión simultánea del TB al polielectrolito del recubrimiento y el polielectrolito libre en disolución para formar la superestructura. Seguramente, tampoco se produce unión entre varias cadenas en disolución, ya que todo el polielectrolito tanto libre como en la nanopartícula puede “saturarse” con el exceso de TB. Al aproximarnos a la zona donde la concentración de ligando no es tan elevada con respecto a NP-SiO₂@PEI y PEI libre, se favorece el anclaje del ligando (TB) a varias cadenas de PE (alguna de ellas formando parte del recubrimiento). Esta función de “puente” del TB entre cadenas de polielectrolito es fundamental para la formación de la superestructura. El comportamiento observado, aunque parece corroborar la posibilidad de formación de superestructuras bajo ciertas condiciones, no permite cuantificar de forma adecuada el valor de q_{max} . El valor parecería más próximo al que se obtendría de la pendiente del segundo tramo de la curva, concentraciones moderadas de NP. Sin embargo, la aproximación realizada para determinar q_{max} ($q = q_{max}$) era válida cuando $[L] \gg K_d$. Como alternativa se propone la obtención de q_{max} por el método 2. En primer lugar, se determina la q_{max} en ausencia de PEI libre. Todas las muestras contienen cantidades idénticas de NP-SiO₂@PEI (0.0502 mg/mL), y se aumenta la concentración de TB en cada muestra. Las muestras se incuban durante 3 horas, pasado este tiempo se centrifugan, quedando en el sobrenadante el TB no adsorbido por la NP-SiO₂@PEI, que se cuantifica por espectrofotometría a 610 nm. El punto de equivalencia al cual todo el TB queda adsorbido se determina a partir de la intersección de la recta con el eje de abscisas, como muestra la Ilustración 32.

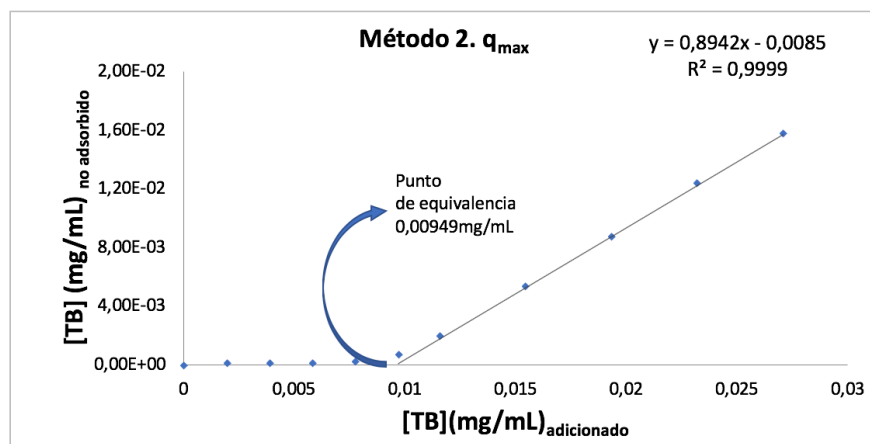


Ilustración 32. Obtención de q_{max} por el método

Como el punto de equivalencia determinado es 0,00949 mg/mL de TB y la [NP-SiO₂@PEI] utilizada 0,0502 mg/mL, el valor obtenido de:

$$q_{max} = \left(\frac{\text{mgTB}}{\text{mg}_{NP-SiO_2@PEI}} \right) = \frac{0,00949 \text{ mg/mL}}{0,0502 \text{ mg/mL}} = 0,189 \text{ mgTB/mg NP.}$$

Valor que se tomará como referencia para compararlo con los valores de q_{max} en presencia de exceso de polielectrolito en el medio.

Tanto por el método 1 como por el método 2 se obtiene el mismo valor de q_{max} , cuando no hay presencia de exceso de polielectrolito en el medio, lo que corrobora que ambas aproximaciones son válidas para la determinación de q_{max} . La aplicación del método 2, va a permitir obtener el valor de q_{max} en los experimentos de sinergia de crecimiento.

Debido a la presencia de un exceso de polielectrolito en el medio, se espera un aumento de moléculas de TB que se incorporan a la NP-SiO₂@PEI por formación de la superestructura. Este exceso de PEI se adiciona a la solución que contiene las NP-SiO₂@PEI manteniendo una relación constante, llamada Ratio, en cada una de las alícuotas que se tomen de la solución resultante. Los Ratios $\left(\frac{PEI}{NP-SiO_2@PEI} \right)$ preparados para llevar a cabo la obtención de q_{max} fueron R 0.1; 0.25; 0.5; 0.75; 1.0. A partir de las representaciones de [TB] no absorbido frente a [TB] adicionado y del ajuste se determina el “punto de equivalencia” para los distintos Ratios. En la Ilustración 33 se muestra como ejemplo las representaciones para R 0,5; 0,75 y 1,0. En dicha representación se observa a simple vista que al incrementarse la cantidad de PE libre añadido se produce un desplazamiento en el punto de equivalencia hacia valores mayores de TB adicionado. Este aumento en el valor del TB del punto de equivalencia indica un incremento en la capacidad de adsorción.

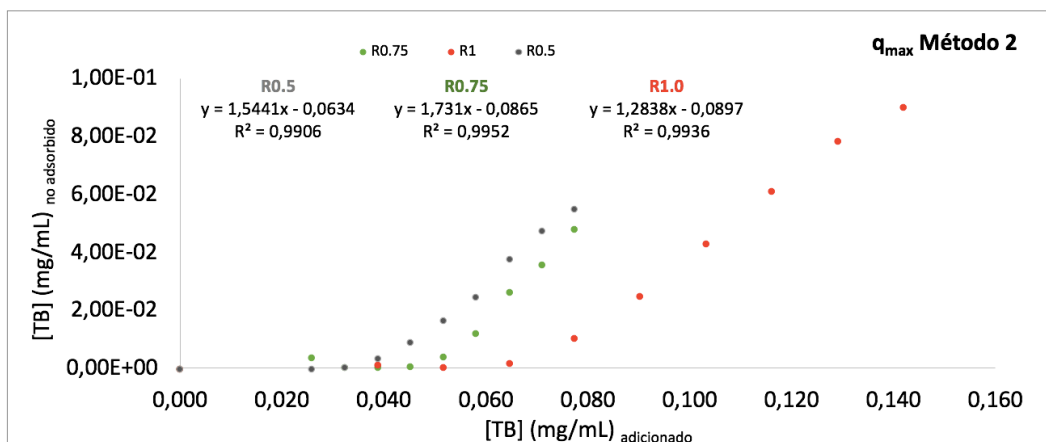


Ilustración 33. Obtención del punto de equivalencia a valores de Ratio 0,5; 0,75; 1,0 de NP-SiO₂@PEI y PEI por el método 2.

En la Tabla 5 se recogen los puntos de equivalencia obtenidos por NP-SiO₂@PEI a los distintos Ratios, también se indica la concentración de NP-SiO₂@PEI utilizada y el valor de q_{max} calculado .

Ratio	[SiO ₂ @PEI] (mg/mL)	$q_{max} \left(\frac{mg_{TB}}{mg_{NP}} \right)$	P _{equivalencia} (mg/mL)
0,00	0,0502	0,189	0,0095
0,10	0,0238	0,799	0,0190
0,25	0,0201	1,816	0,0365
0,50	0,0103	3,724	0,0384
0,75	0,0103	4,621	0,0476
1,00	0,0103	6,757	0,0696

Tabla 5. Recoge los datos de la concentración de NP-SiO₂@PEI, el Ratio, los valores de q_{max} calculados y el punto de equivalencia del TB obtenido de la gráfica.

Los resultados presentados en la Tabla 5 muestran que la hipótesis de trabajo era correcta: el aumento en la cantidad de polielectrolito añadido a la dispersión aumenta de forma considerable la cantidad de ligando que se adsorbe por unidad de masa de polielectrolito. En presencia de un exceso de polielectrolito igual a la cantidad de ligando presente (ratio = 1) la q_{max} ha aumentado en un factor de casi 36 (desde 0,189 hasta 6,757 mg/mg). Como se observa el efecto es muy intenso.

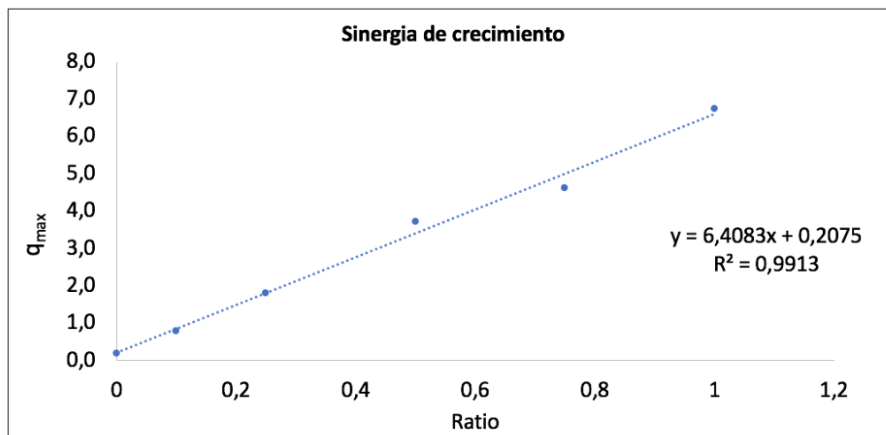


Ilustración 34. Representación del Ratio vs q_{max} para NP-SiO₂@PEI-TB-PEI

Al representar los valores de q_{max} obtenidos para las NP-SiO₂@PEI frente al ratio utilizado, se observa que la tendencia no es saturable. En realidad, la q_{max} , aumenta linealmente con el ratio [TB] / [PEI]. Este comportamiento demuestra que la cantidad de ligando que puede unirse a la nanopartícula deja de depender de la cantidad de ésta y queda definido por el cociente de concentraciones ligando a polielectrolito. En otras palabras, se puede ajustar la cantidad de ligando que se adsorbe por unidad de masa de la nanopartícula simplemente ajustando la cantidad total de polielectrolito presente en el medio. El valor de la pendiente obtenida es próximo a 6,5 y la capacidad de adsorción en ausencia de PE libre según la ecuación de la recta está entorno a 0,2 mg TB / mg NP, un valor no muy lejano a los 0,19 mg TB / mg NP obtenidos experimentalmente. Además, a partir de los valores de la recta podríamos optimizar las cantidades necesarias de NP y PE libre necesarias para “secuestrar” completamente el colorante, con el menor gasto de nanopartícula posible. El estudio podría extrapolarse a otros ligandos o colorantes de interés pudiendo utilizarse esta aproximación para la recuperación o descontaminación de dichos colorantes o ligandos en muestras acuosas.

4.3 Sinergia de crecimiento con IC

Para verificar la sinergia de crecimiento y determinar, además, la influencia de la carga del ligando, se llevaron a cabo los mismos experimentos con la molécula Carmín de índigo. El Carmín de índigo es también un colorante, pero presenta dos cargas negativas menos que el Azul de tripano a priori, una menor carga podría suponer una menor tendencia a actuar como “puente” intercadena o punto de anclaje del polielectrolito, lo que se traduciría en una menor capacidad de la carga. La q_{max} se calcula a partir del punto de equivalencia obtenido de la gráfica por el método 2, que se representa en la Ilustración 35.

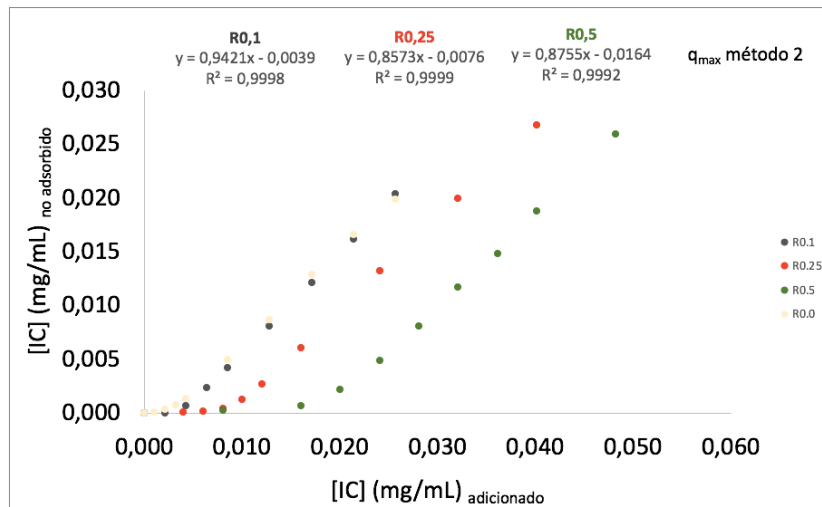


Ilustración 35. Obtención de q_{max} por método 2 para el IC NP-SiO₂@PEI-IC-PEI

En este caso se trabajó con las mismas concentraciones de nanopartícula en todos los ratios, lo que permitía obtener una gráfica conjunta más visual a la hora de compararlas. En la tabla 6 se recogen los datos del Ratio, concentración de nanopartícula, punto de equivalencia y valor de q_{max} .

ratio	[NP] (mg/mL)	q_{max}	[IC] P _{equival} (mg/mL)
0,00	0,0502	0,06	0,0028
0,10	0,0125	0,32	0,0040
0,25	0,0125	0,70	0,0087
0,50	0,0125	1,46	0,0182

Tabla 6. Recoge los datos de las concentraciones de NP-SiO₂@PEI, el Ratio, los valores de q_{max} y el punto de equivalencia del IC para cada Ratio.

Si se representa la q_{max} , para las NP-SiO₂@PEI frente al ratio, [IC] / [PEI], se observa nuevamente que la cantidad de ligando adsorbido crece linealmente con el exceso de polielectrolito utilizado. Nuevamente la tendencia es lineal (no saturable).

Es interesante observar que la pendiente de la correlación lineal, 2,8, es menor que la observada para el Azul de tripano, 6,4, tal y como cabría esperar si el mecanismo de crecimiento del recubrimiento alrededor de la nanopartícula dependiese de la capacidad del ligando para establecer conexiones con moléculas individuales de polielectrolito. El azul de tripano tiene en su estructura cuatro grupos sulfonato por lo que podría establecer contactos salinos con un total de 4 grupos amino. Sin embargo, el Carmín de índigo únicamente dispone de 2 grupos sulfonato por lo que tendría una menor capacidad de unirse a grupos amino del polielectrolito. El hecho que las pendientes observadas para el Azul de tripano (Ilustración 34)

y del Carmin de índigo (Ilustración 35) se escalen con el número de grupos sulfonato parecería corroborar el mecanismo propuesto.

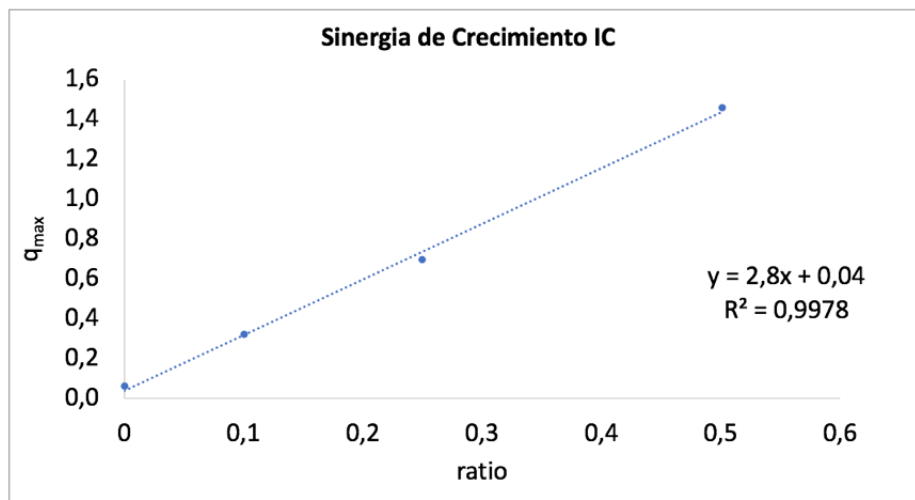


Ilustración 36. Sinergia de crecimiento para NP-SiO₂@PEI-PEI_{exc}-IC

4.4 Sinergia de crecimiento con NP-Fe₃O₄@PE con proteínas modelo

Una de las aplicaciones fundamentales buscadas con la formación de estas superestructuras es el almacenamiento y estabilización de fármacos proteicos. Sería un gran avance poder adicionar simplemente nanopartículas y un exceso determinado de polielectrolito a una solución que contiene proteínas para poder almacenarlas en disolución acuosa de forma estable por largos periodos de tiempo, sin perder su estructura o actividad. Sería deseable poder aplicar este tipo de aproximación a la mayor cantidad de proteínas posibles, independientemente de su carga. Por ello, es interesante determinar la capacidad de formación de las superestructuras con biomoléculas (proteínas) que presenten carga neta negativa pero también con biomoléculas cargadas positivamente. Teniendo en cuenta que la adsorción de la proteína a la nanopartícula es mediada por el polielectrolito y que la naturaleza de dicha interacción es fundamentalmente electrostática, la elección de la carga del polielectrolito del recubrimiento dictará el tipo de proteína que será capaz de formar las superestructuras. Recubrimientos con PE positivos como el PEI o PDADMACI permiten la unión de moléculas/biomoléculas de carga negativa, mientras que, PE cargados negativamente interaccionarán y unirán biomoléculas positivas. Además, los PE libres en presencia de proteínas con carga opuesta pueden dar lugar a la formación de estructuras de mayor o menor solubilidad [53], según las proporciones relativas de PE y biomolécula, como los complejos formados por PE-proteína o los coacervados mostrados en la Ilustración 37.

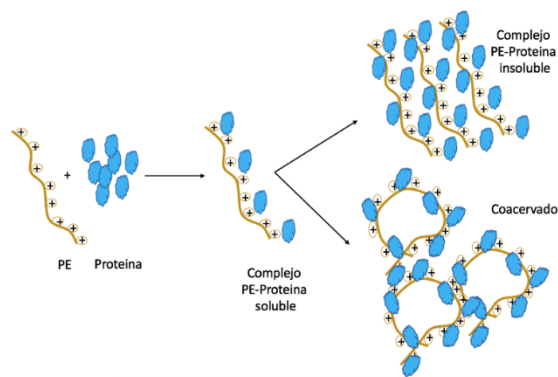


Ilustración 37. Interacción de cargas eléctricas entre PE y proteína.

La necesidad de constatar que los coacervados u otras posibles estructuras PE-libre/proteína insolubles no interferieran al centrifugar en los resultados obtenidos, dictaminó el cambio de nanopartícula utilizada. Los estudios previos al TFM, realizados en el grupo de investigación, en los que se observó la formación de la superestructura con aniones multivalentes se llevaron a cabo con NP-Fe₃O₄. La utilización de NP-Fe₃O₄ en los experimentos de sinergia de crecimiento con proteínas evitaría el paso de centrifugación e independientemente de la presencia de complejos PE-proteína solubles o insolubles, estos no decantarían magnéticamente, quedando en el sobrenadante. Sólo las superestructuras pueden ser separadas magnéticamente con un imán, eliminando la posibilidad de decantar al mismo tiempo superestructuras y posibles complejos insolubles PE/proteína.

Se realizaron experimentos preliminares con las NP-Fe₃O₄@PEI-COOH suministradas en el laboratorio y lisozima como ligando. Se cuantificaron las partículas suministradas espectrofotométricamente por el método de la fenantrolina (20,2 mg/mL de Fe₃O₄) y se caracterizó su tamaño y carga por medidas de DLS (437nm de diámetro y pZ de -37,3 mV a pH5). Utilizando el método 1 (concentración de proteína constante, 0,25 mg/mL y NP-Fe₃O₄@PEI-COOH creciente de 0-0,09 mg/mL) se trató de determinar la q_{max} de las NP en ausencia de PEI-COOH libre. Tras cuantificarse la cantidad de proteína no adsorbida en el sobrenadante, a partir de las absorbancias a 280 nm, no se detectó adsorción significativa en el rango estudiado. Se realizó una medida puntual incrementando la concentración de NP-Fe₃O₄@PEI-COOH a 1 mg/mL y se estimó así una q_{max}≈0.024 mg LZM/mg NP. La baja q_{max} fue en principio atribuida al elevado tamaño de las nanopartículas (casi 500 nm), presentando menos superficie específica que otras de menor tamaño. Se descartó un fallo en el recubrimiento en base a la medida obtenida a pH 5 de potencial Z, ya que en la Ilustración 9 se muestra que a pH 5 la partícula desnuda debe presentar valores positivos de pZ. La Ilustración 38 muestra los espectros obtenidos para la disolución de LZM incubada en ausencia de NP-Fe₃O₄@PEI-COOH y en presencia de NP-Fe₃O₄@PEI-COOH (1mg/mL) para el sobrenadante tras la incubación de 24 horas con las nanopartículas.

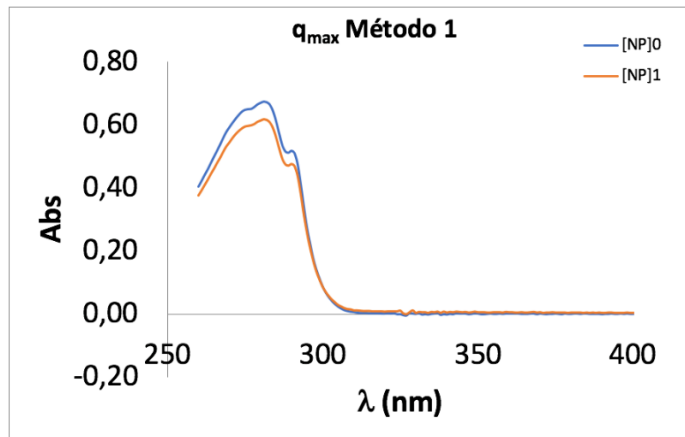


Ilustración 38. Espectro de absorción de LZM (0,25 mg/mL) incubada en presencia de NP-Fe₃O₄@PEI-COOH (1mg/mL) y ausencia de NP-Fe₃O₄@PEI-COOH (0 mg/mL). Obtención preliminar por el método 1 de $q_{max} \approx 0,024 \text{mgLZM/mgNP}$.

A continuación, se realizaron experimentos de sinergia del crecimiento en presencia de PEI-COOH libre, donde se mantuvo constante la concentración de NP-Fe₃O₄@PEI-COOH a 1 mg/mL, adicionando un exceso en todas las muestras de PEI-COOH de 1 mg/mL (Ratio 1) y distintas concentraciones de LZM (Método 2 de determinación de $q_{m\acute{a}x}$).

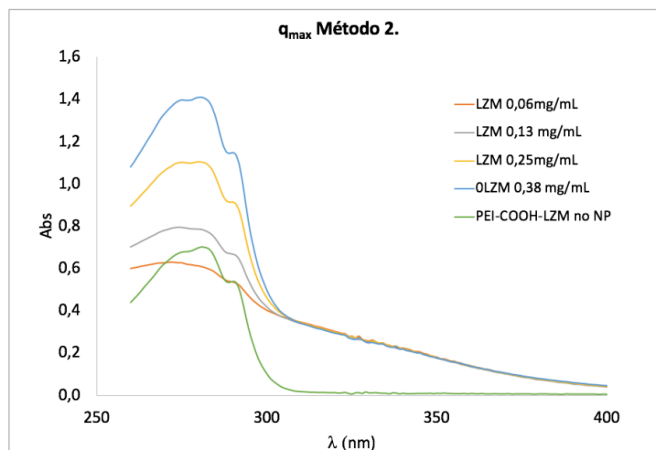


Ilustración 39. Espectro de absorción de NP-Fe₃O₄@PEI-COOH, manteniendo constante la [NP-Fe₃O₄@PEI-COOH] (1 mg/mL) con un exceso de PEI-COOH (1 mg/mL) (Ratio 1.0) y concentraciones crecientes de LZM con decantación magnética. Para determinar el valor de q_{max} por el método 2.

En la Ilustración 39 se muestran los espectros recogidos tras la incubación y decantación magnética. Todos los espectros correspondientes a muestras incubadas con NP y exceso de PE presentan una densidad óptica elevada y no despreciable para longitudes de onda superiores a 350 nm (intervalo en el que la proteína no absorbe radiación electromagnética). Esta absorbancia por su aspecto de cola decreciente al aumentar λ podría atribuirse a la existencia de dispersión por presencia de agregados proteína-PE. Sin embargo, el experimento control realizado recogiendo el espectro en ausencia de NP únicamente con PE y proteína no presenta dispersión alguna. Bajo la sospecha de problemas con el stock inicial de nanopartículas recubiertas se midió de nuevo el tamaño del stock de NP-Fe₃O₄@PEI-COOH

determinándose un diámetro de 789,0 nm, significativamente mayor al determinado inicialmente. Se postuló que debido al proceso de síntesis de las nanopartículas, el stock podía presentar restos de Fe o partículas coloidales de pequeño tamaño. Se realizaron lavados con citrato como quelante, se sonicaron las muestras de NP-Fe₃O₄@PEI-COOH pero se volvió a observar agregación con el tiempo.

Nanopartícula	Diámetro (nm)
NP-Fe ₃ O ₄ @PEI-COOH C+S	459
NP-Fe ₃ O ₄ @PEI-COOH C+S 24 h	654

Tabla 7. Diámetro medio de las NP-Fe₃O₄@PEI-COOH tras el tratamiento con citrato y sonicación (C+S) y a las 24 horas del tratamiento.

Estos resultados, vuelven a mostrar que el tamaño de la NP-Fe₃O₄@PEI-COOH, no se mantiene a lo largo del tiempo y que el tratamiento con citrato no ha sido lo suficiente efectivo, dado que vuelven a aumentarlo. La variabilidad en el tamaño también podría atribuirse a la liberación de partículas coloidales al medio, creando superficies con un recubrimiento incompleto y, por tanto, con tendencia a agregar. La liberación de dichas partículas coloidales podría verse acelerada en presencia del exceso de polielectrolito y formar superestructuras con la proteína y el polielectrolito libre que presenten baja magnetización y difícilmente decantables. En cualquier caso, la inestabilidad detectada en las NP-Fe₃O₄@PEI-COOH desaconseja su utilización ya que afecta a la reproducibilidad de los resultados. Por ello, se decidió variar ligeramente el abordaje utilizado para obtener las nanopartículas magnéticas. En lugar de partículas NP-Fe₃O₄ directamente recubiertas de polielectrolito se trabajaría con NP-Fe₃O₄ recubiertas de sílice, que crearía una capa “estabilizadora”, ver Ilustración 40.

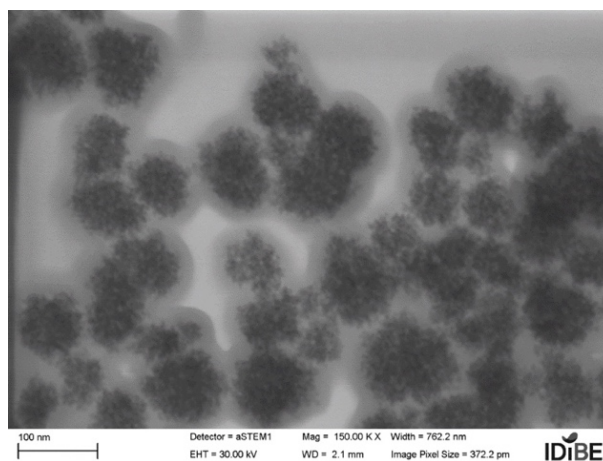


Ilustración 40. Imagen de STEM de NP-Fe₃O₄ obtenidas en el laboratorio por el método de co-precipitación y recubiertas de sílice mediante el proceso de Stöber. Como resultado las nanopartículas recubiertas presentan múltiples núcleos magnéticos magnéticos de pequeño tamaño rodeados por una capa de sílice de ≈15-20 nm de espesor. Imagen del laboratorio de Nanotecnología del IDIBE.

Tal y como se indica en procedimiento experimental, los miembros del laboratorio estaban poniendo a punto la obtención de NP-Fe₃O₄ recubiertas de sílice. El recubrimiento evitaría la posible disgregación del núcleo de magnetita, estabilizándolo. Además, proporcionaría una superficie de sílice análoga a la recubierta con PEI, previamente, para los experimentos con los colorantes. El recubrimiento con PEI se realizaría de forma directa para obtener las partículas de carga positiva, mientras que para obtener la superficie cargada negativamente con PEI-COOH se realizaría un recubrimiento capa a capa PEI/PEI-COOH (LbL). Con las nuevas partículas se pretendía estudiar la sinergia de crecimiento con β -LG y LZM, como proteínas modelo utilizando la misma metodología anteriormente descrita. Era esperable que para ambas proteínas pudiese darse la sinergia del crecimiento y obtenerse las superestructuras, verificando la validez de la metodología propuesta para su uso con proteínas con carga tanto negativa como positiva, en general. Los valores de sinergia obtenidos, sin embargo, no se esperaba que pudieran ser comparables. Tanto los polielectrolitos libres como las NP recubiertas por PEI o PEI-COOH presentan diferencias en su carga; magnitud, distribución, etc. no sólo en el signo de la misma, además de en su tamaño (NP), lo que variará su capacidad intrínseca de adsorción. Por otro lado, las diferencias entre ambas proteínas en tamaño, carga neta y distribución de cargas tampoco es comparable. La LZM posee una distribución de carga bastante homogénea en toda su superficie, mientras que la β -LG posee clusters con zonas de distinta carga. Teniendo presente que la adsorción se produce fundamentalmente por un mecanismo de atracción electrostática, si la proteína no tuviera carga neta se esperaría que no pueda actuar de nodo en este sistema de andamiajes. Por otro lado, proteínas con carga positiva serían nodos en el sistema de PEI-COOH (negativo) y las negativas en el sistema PEI. Sin embargo, como ya se ha mencionado, las diferencias en la distribución superficial de dichas cargas también tendrá un papel determinante en la capacidad de formación de superestructuras, debiendo ser considerado en el caso de cada proteína.

4.5 Influencia de la fuerza iónica del medio

Dado que la adsorción de la biomolécula a la nanopartícula presumiblemente es de naturaleza electrostática, puede verse influencia por la presencia de iones en la disolución. Parte de las cargas que exponen al medio, tanto la nanopartícula como el polielectrolito, se verían apantalladas por un incremento de la fuerza iónica. Este apantallamiento produce una reducción de la efectividad de las cargas y como indican los estudios con los colorantes TB e IC, la sola reducción en la carga del ligando ya disminuye la capacidad de adsorción y formación de superestructuras. Además, en presencia de alta fuerza iónica también la carga efectiva del polielectrolito será menor. Por tanto, la reducción de la capacidad de adsorción esperada será mayor cuanto mayor sea la fuerza iónica. Estos estudios no se llegaron a realizar, pero sí estaban en los objetivos planteados y se encuentran descritos de forma pormenorizada en el

procedimiento experimental. Su realización habría aportado información acerca de la estabilidad de la superestructura y la viabilidad de utilizar cambios en la fuerza iónica del medio para modular la liberación de la biomolécula almacenada en la superestructura. Según los resultados obtenidos se pretendía determinar la fuerza iónica a la cual prácticamente se inhibía la formación de la superestructura. Es esperable que a dicho valor de fuerza iónica se pueda producir incluso la desestabilización de superestructuras previamente formadas, liberándose al medio los distintos componentes que la integran. Este hecho permitiría liberar la proteína y separarla de las partículas por decantación magnética, ver Ilustración 41. Tras la recuperación quedaría pendiente determinar si la proteína liberada ha sufrido cambios en su estructura o estabilidad, comparándola con proteína nativa que no se hubiese sometido al proceso de adsorción y liberación de la superestructura. En principio existen multitud de ejemplo y estudios que indican que la adsorción a superficies solidas mediada por polielectrolitos no produce generalmete alteraciones en la estructura o actividad de las proteínas [70], contrariamente a lo que ocurre cuando la adsorción a la superficie se realiza de forma directa [71].

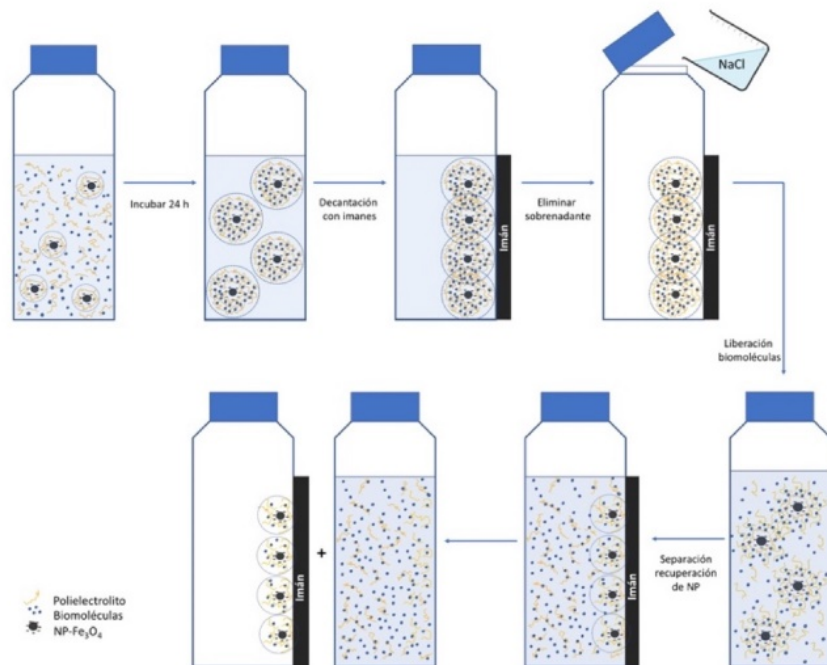


Ilustración 41. Liberación de Biomoléculas encapsuladas en superestructuras por adición de NaCl

5. Conclusión y Proyección futura

En este trabajo se han llevado a cabo experimentos de sinergia de crecimiento para la formación de superestructuras. Las superestructuras se formaron por la acción de de nanopartículas recubiertas de un polielectrolito, polielectrolito libre en el medio y un ligando de carga opuesta al polielectrolito. Los ligandos fueron los colorantes TB e IC, ambas moléculas de carga negativa y las proteínas β -Lactoglobulina con carga neta positiva a pH 7 y lisozima con carga neta negativa a pH 7. Para el caso del TB se utilizó PEI como polielectrolito catiónico, tanto en el recubrimiento de NP-SiO₂ como de PE libre en la solución. La capacidad máxima de carga en ausencia de PEI libre fue de 0,19 mg TB/mg NP y mostró un aumento proporcional de la capacidad de carga en los experimentos con exceso de PEI libre que estaba relacionado con la formación de las superestructuras. Se cambió a la molécula IC, para estudiar la influencia del ligando, utilizando el PEI como polielectrolito catiónico. La capacidad máxima de carga en ausencia de PEI libre fue de 0,06 mg IC/mg NP y la presencia de PEI libre en la solución evidenció un aumento proporcional de la capacidad máxima de carga, pero mucho menor que para el caso con el TB. El experimento reveló que seguía existiendo sinergia en el crecimiento por la adición de PEI libre pero que ésta era mucho menor, atribuyéndose dicho efecto a la menor carga del ligando.

El aumento de la capacidad de adsorción de la nanopartícula en función de la cantidad de polielectrolito resulta ser lineal para ambos ligandos lo que demuestra que la cantidad de ligando que puede adsorberse es independiente de la cantidad de nanopartícula utilizada. Además, la capacidad de crecimiento del recubrimiento de la nanopartícula se correlaciona con el número de cargas negativas de cada ligando. Nuestros datos parecen corroborar el mecanismo propuesto mediante el cual las moléculas de ligando actúan como puentes de unión entre moléculas individuales de polielectrolito anclando una mayor cantidad de polielectrolito y ligando al recubrimiento de la nanopartícula.

Los estudios preliminares con proteínas (LZM), utilizando NP-Fe₃O₄ recubiertas de un polielectrolito de carga negativa (PEI-COOH), no permitieron la adecuada adsorción de la proteína y estudio de sinergia por problemas de inestabilidad intrínseca de la nanopartícula. Se plantea el uso de partículas híbridas (Fe₃O₄@SiO₂) formadas por un núcleo magnético y una capa exterior de sílice, que a su vez serían recubiertas de PEI directamente o PEI-COOH mediante la técnica de LbL (Fe₃O₄@SiO₂@PE). Esto nos posibilitaría estudiar la adsorción de ambas proteínas modelo una con carga negativa y otra positiva, corroborando la formación de la superestructura en proteínas de distinta carga. Además, se planteaba llevar a cabo un estudio sobre la influencia de la fuerza iónica sobre la formación de las superestructuras y su utilización como método de liberación de la proteína almacenada.

Otros estudios no planteados en el presente TFM pero que supondrían una continuidad del tema:

1. Evaluar la influencia del pH , al igual que se ha hecho con la fuerza iónica, sobre la formación de las superestructuras. Por un lado se puede estudiar la influencia de la carga de la proteína utilizando un sistema en el que la carga del polielectrolito no varía con el pH (como el PDADMA). También se puede estudiar como se liberaría la proteína por cambios de pH al cambiar el signo de su carga jugando con pHs por encima y debajo de su pI .
2. Estudios de estabilidad en presencia de otras enzimas sobre la propia superestructura ya formada. Por ejemplo, podría estudiarse la catalasa como modelo de enzima multimérico que pierde su actividad en condiciones de alta dilución debido a la disociación de sus subunidades. Cuando el enzima se encuentre adsorbido formando parte de superestructuras similares a las presentadas aquí, sería de esperar una inhibición de la disociación de sus subunidades con la consiguiente estabilización del enzima.
3. Estudios relativos a la liberación controlada de proteínas formando parte de estas superestructuras mediante competición con otros ligandos que muestren mayor afinidad por el polielectrolito utilizado en el recubrimiento.

6. Bibliografía

1. Alves, M. D.; Aracri, F. M.; Cren, E. C.; Mendes, A. A. Isotherm, Kinetic, Mechanism and Thermodynamic Studies of Adsorption of a Microbial Lipase on a Mesoporous and Hydrophobic Resin. *Chemica Engineering Journal*. **2017**, 311, 1–12
2. Akbari H., Gholami M., Akbari H., Adibzadeh A., Taghavi L., Hayati B., Nazari S., Poly (amidoamine) generation 6 functionalized Fe₃O₄@SiO₂/GPTMS core–shell magnetic NPs as a new adsorbent for Arsenite adsorption:kinetic, isotherm and thermodynamic studies. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. **2020**, 18 (1), 253-265.
3. Antunes JC, Gonçalves RM, Barbosa MA, Chitosan/Poly(γ -glutamic acid) Polyelectrolyte Complexes: From Self-Assembly to Application in Biomolecules Delivery and Regenerative Medicine. *Research & Reviews: Journal of Material Sciences*. **2016**, 4 (4) 2321-2347.
4. Blake CC, Koenig DF, Mair GA, North AC, Phillips DC, Sarma VR. Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution. *Nature*. 1965;206(4986):757-761
5. Blake, C. C. F.; Mair, G. A.; North, A. C. T.; Phillips, D. C.; Sarma, V. R.. On the Conformation of the Hen Egg-white Lysozyme Molecule. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences 1967, pp 365–377.
6. Bonini, M.; Berti, D.; Baglioni, P.. Nanostructures for Magnetically Triggered Release of Drugs and Biomolecules. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. Current Opinion in Colloid & Interface Science **2013**, pp 459–467.
7. Bourganis, V.; Karamanidou, T.; Kammona, O.; Kiparissides, C., Polyelectrolyte complexes as prospective carriers for the oral delivery of protein therapeutics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2017**, 111, 44-60.
8. Buchman, Y.; Lellouche, E.; Zigdon, S.; Bechor, M.; Michaeli, S.; Lellouche, J., Silica Nanoparticles and Polyethyleneimine (PEI)-Mediated Functionalization: A New Method of PEI Covalent Attachment for siRNA Delivery Applications. *Bioconjugate Chemistry* **2013**, 24 (12), 2076-2087.
9. Buszewski, B.; Rodzik, A.; Railean-Plugaru, V.; Sprynskyy, M.; Pomastowski, P.. A Study of Zinc Ions Immobilization by B-lactoglobulin. *Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects*. Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects **2020**, p 124443.
10. Campanini, M.; Ciprian, R.; Bedogni, E.; Mega, A.; Chiesi, V.; Casoli, F.; Fernandez, C.; Rotunno, E.; Rossi, F.; Secchi, A.; Bigi, F.; Salviati, G.; Magen, C.; Grillo, V.; Albertini, F., Lorentz microscopy sheds light on the role of dipolar interactions in magnetic hyperthermia. *Nanoscale* **2015**, 7 (17), 7717-7725.
11. Carbon Nanotube Reinforced Composites: CNR Polymer Science and Technology 10.1016/B978-1-4557-3195-4.00001-1
12. Carrillo W. Lisozima: Actividad antibacteriana y alergenicidad. *Actualización en Nutrición*. 2013. 4-14
13. Ciftci, H.; Ersoy, B.; Evcin, A., Synthesis, Characterization and Cr(VI) Adsorption Properties of Modified Magnetite Nanoparticles. *Acta Physica Polonica a* **2017**, 132 (3), 564-569.
14. Du, A.; Stenzel, M., Drug Carriers for the Delivery of Therapeutic Peptides. *Biomacromolecules* **2014**, 15 (4), 1097-1114.
15. Des Rieux A., Fievez V., Garinot M., Scheneider Y., Pr at V., Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *Journal of Controlled Release*. **2006**, 116, 1–27
16. Duan, X.; Mao, S., New strategies to improve the intranasal absorption of insulin. *Drug Discovery Today* **2010**, 15 (11-12), 416-427.
17. Fan, Y.; Wang, Y.; Fan, Y.; Ma, J., Preparation of insulin nanoparticles and their encapsulation with biodegradable polyelectrolytes via the layer-by-layer adsorption. *International Journal of Pharmaceutics* **2006**, 324 (2), 158-167.
18. Folchman-Wagner, Z.; Zaro, J.; Shen, W., Characterization of Polyelectrolyte Complex Formation Between Anionic and Cationic Poly(amino acids) and Their Potential Applications in pH-Dependent Drug Delivery. *Molecules* **2017**, 22 (7).

19. Ge, J.; Hu, Y.; Biasini, M.; Beyermann, W.; Yin, Y., Superparamagnetic magnetite colloidal nanocrystal clusters. *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**, *46* (23), 4342-4345.
20. GEOLOGÍA. DINÁMICA Y EVOLUCIÓN DE LA TIERRA, MONROE J, Manuel Pozo Rodríguez
21. Haidar, Z. S.; Hamdy, R. C.; Tabrizian, M.. Protein Release Kinetics for Core-shell Hybrid Nanoparticles Based on the Layer-by-layer Assembly of Alginate and Chitosan on Liposomes. *Biomaterials*. *Biomaterials* **2008**, pp 1207–1215.
22. He, P.; Hu, N.; Rusling, J., Driving forces for layer-by-layer self-assembly of films of SiO₂ nanoparticles and heme proteins. *Langmuir* **2004**, *20* (3), 722-729.
23. Heo S., Lee J., et al., Surface plasmon enhanced Organic color image sensor with Ag nanoparticles coated with silicon oxynitride. *Scientific Reports*. **2020**
24. Huang S.H., Liao M.H., Chen D.H., Fast and efficient recovery of lipase by polyacrylic acid-coated magnetic nano-adsorbent with high activity retention. *Separation and Purification Technology*. **2006**, *51*, 113-117
25. Iijima, M.; Kamiya, H., Layer-by-Layer Surface Modification of Functional Nanoparticles for Dispersion in Organic Solvents. *Langmuir* **2010**, *26* (23), 17943-17948.
26. Islam, M.; Choi, W.; Lee, H., Controlled Etching of Internal and External Structures of SiO₂ Nanoparticles Using Hydrogen Bond of Polyelectrolytes. *Acs Applied Materials & Interfaces* **2014**, *6* (12), 9563-9571.
27. Koetz and Kosmella Polyelectrolytes and Nanoparticles-Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2007)
28. Krause, M. E.; Sahin, E.. Chemical and Physical Instabilities in Manufacturing and Storage of Therapeutic Proteins. *Current Opinion in Biotechnology*. *Current Opinion in Biotechnology* **2019**, pp 159–167
29. Langmuir I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. *J Am Chem Soc* **1916**; *38*, 2221–2295.
30. Li, L.; Gu, Z.; Gu, W.; Liu, J.; Xu, Z., Efficient drug delivery using SiO₂-layered double hydroxide nanocomposites. *Journal of Colloid and Interface Science* **2016**, *470*, 47-55.
31. Li, J., Zhou, Q., Yuan, Y., Wu, Y., Iron-based magnetic molecular imprinted polymers and their application in removal and determination of di-n-pentyl phthalate in aqueous media. *Royal society publishing open science*. **2017**, *4*: 170672
32. Li, L., Huang, J., Sun, L., et al. The effects of nanomaterial treated water on the pathogens of rice diseases and fungicides. **2017**, *9*, 6, 957-963
33. Liu J., Sun Z., Deng Y., Zou Y., Li C., Gou X., Xiong L., Gao Y., Li F., Zhao D. Highly Water-Dispersible Biocompatible Magnetite Particles with Low Cytotoxicity Stabilized by Citrate Groups. *Angewandte Chemie*. **2009**, *48* (32) 5875-5879
34. Lin, Y.; Mi, F.; Lin, P.; Miao, Y.; Huang, T.; Chen, K.; Chen, C.; Chang, Y.; Sung, H., Strategies for improving diabetic therapy via alternative administration routes that involve stimuli-responsive insulin-delivering systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2019**, *139*, 71-82.
35. Liu, J.; Qiao, S.; Chen, J.; Lou, X.; Xing, X.; Lu, G., Yolk/shell nanoparticles: new platforms for nanoreactors, drug delivery and lithium-ion batteries. *Chemical Communications* **2011**, *47* (47), 12578-12591.
36. Lowe, B. M., Skylaris C. K., Green, N. G. Acid-base dissociation mechanisms and energetics at the silica-water interface: An activationless process. *Journal of Colloid and Interface Science* **2015**, *451*, 231–244
37. Lundquist, P.; Artursson, P., Oral absorption of peptides and nanoparticles across the human intestine: Opportunities, limitations and studies in human tissues. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2016**, *106*, 256-276.
38. Lvov Y. Ariga K., Onda M., Ichinose I., Kunitake T., Alternate Assembly of Ordered Multilayers of SiO₂ and Other Nanoparticles and Polymers. *Langmuir*. **1997**, *13*, 6195-6203
39. Markides, H., Rotherham, M. Biocompatibility and Toxicity of Magnetic Nanoparticles in Regenerative Medicine. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Nanomaterials*. **2012**, 614094, 11
40. Mahmoudi, M.; Hofmann, H.; Rothen-Rutishauser, B.; Petri-Fink, A., Assessing the In Vitro and In Vivo Toxicity of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Chemical Reviews* **2012**, *112* (4), 2323-2338.
41. Malvindi, M.; Brunetti, V.; Vecchio, G.; Galeone, A.; Cingolani, R.; Pompa, P., SiO₂ nanoparticles biocompatibility and their potential for gene delivery and silencing. *Nanoscale* **2012**, *4* (2), 486-495.

42. Malvindi, M. A.; De Matteis, V.; Galeone, A.; Brunetti, V.; Anyfantis, G. C.; Athanassiou, A.; Cingolani, R.; Pompa, P. P.. Toxicity Assessment of Silica Coated Iron Oxide Nanoparticles and Biocompatibility Improvement by Surface Engineering. *PLoS ONE*. PLoS ONE **2014**, p e85835
43. Malvern Instrumets Ltd. (2013). *Zetasizer nano user manual*. Nano485 Issue 1.1.
44. Massart, R., Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Transactions on Magnetics* **1981**, 17 (2), 1247-1248.
45. Meissner, J.; Prause, A.; Bharti, B.; Findenegg, G., Characterization of protein adsorption onto silica nanoparticles: influence of pH and ionic strength. *Colloid and Polymer Science* **2015**, 293 (11), 3381-3391.
46. Mercadante D., Melton L.M., Norris G.E., Loo T., Williams M., Dobson R., Bovine b-Lactoglobulin Is Dimeric Under Imitative Physiological Conditions: Dissociation Equilibrium and Rate Constants over the pH Range of 2.5–7.5. *Biophysical Journal*. **2012**, 103, 303–312
47. 40Metin A., Dogan M., Erdem U., Babacan T., Güngörs H., Preparation of a novel functionalized magnetic nanobiocomposite as a carrier for protein adsorption. *SPECTROSCOPY LETTERS*. 2020
48. Phillips, D. C.. Symposium on Three-dimensional Structure of Macromolecules of Biological Origin. By Invitation of the Committee on Arrangements for the Autumn Meeting. Presented Before the Academy on October 19, 1966. Chairman, Walter Kauzmann: THE HEN EGG-WHITE LYSOZYME. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Proceedings of the National Academy of Sciences 1967, pp 483–495.
49. 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 applied materials & interfaces* 2015, 7 (4), 2575-84.
50. Qarawi, M. A.; Farah, F. H.; Mohamed, S. S.; El Haj, B. M.. A REVIEW ON THERAPEUTIC PROTEINS: STABILITY ASPECTS AND CLINICAL IMPLICATIONS. *International Research Journal of Pharmacy*. International Research Journal of Pharmacy 2019, pp 1–7.
51. Reibold, M., Paufler, P., Levin, A. et al. Carbon nanotubes in an ancient Damascus sabre. *Nature* 444, 286 (2006).
52. Rim, K.; Eom, D.; Chan, S.; Flytzani-Stephanopoulos, M.; Flynn, G.; Wen, X.; Batista, E., Scanning Tunneling Microscopy and Theoretical Study of Water Adsorption on Fe₃O₄: Implications for Catalysis. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, 134 (46), 18979-18985.
53. Romanini D., Braia M.J., Porfiri M. C., Applications of Calorimetric Techniques in the Formation of Protein-Polyelectrolytes Complexes. Intech. 2013. Chapter 5.
54. Santana, I.; Wu, H.; Hu, P.; Giraldo, J. P.. Targeted Delivery of Nanomaterials with Chemical Cargoes in Plants Enabled by a Biorecognition Motif. *Nature Communications*. Nature Communications **2020**, p.
55. Sethi, M.; Pacardo, D.; Knecht, M., Biological Surface Effects of Metallic Nanomaterials for Applications in Assembly and Catalysis. *Langmuir* **2010**, 26 (19), 15121-15134.
56. Shen, K., Wang, Z., Polyelectrolyte Chain Structure and solution Phase Behavior. *Macromolecules* **2018**, 51(5), 1706-1717.
57. Shi, J.; Votruba, A.; Farokhzad, O.; Langer, R., Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications. *Nano Letters* **2010**, 10 (9), 3223-3230.
58. Shi, X.; Shen, M.; Mohwald, H., Polyelectrolyte multilayer nanoreactors toward the synthesis of diverse nanostructured materials. *Progress in Polymer Science* **2004**, 29 (10), 987-1019.
59. Shu, S.; Zhang, X.; Teng, D.; Wang, Z.; Li, C.. Polyelectrolyte Nanoparticles Based on Water-soluble Chitosan-poly(l-aspartic Acid)-polyethylene Glycol for Controlled Protein Release. *Carbohydrate Research*. Carbohydrate Research **2009**, pp 1197–1204.
60. Stöber W., Fink A., Controlled Growth of monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *Journal of colloid and interface science* **1968**. 26, 62-69
61. Stucki J. W., Anderson W. L. The Quantitative Assay of Minerals for F²⁺ and Fe³⁺ Using 1,10-Phenanthroline: I Sources of Variability. *SOIL SCI. SOC. AM. J.*, **1981**, 45 633-637
62. Swain, B. C.; Subadini, S.; Rout, J.; Sakshi; Mishra, P. P.; Sahoo, H.; Tripathy, U.. Biophysical Study on Complex Formation Between B-lactoglobulin and Vitamin B12. *Food Chemistry*. Food Chemistry **2020**, p 126064.

63. Tausend, W.; Downing, C.; Tying, S., Systematic Review of Interleukin-12, Interleukin-17, and Interleukin-23 Pathway Inhibitors for the Treatment of Moderate-to-Severe Chronic Plaque Psoriasis: Ustekinumab, Briakinumab, Tildrakizumab, Guselkumab, Secukinumab, Ixekizumab, and Brodalumab. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery* **2014**, *18* (3), 156-169.
64. Togue Kamga, F.. Modeling Adsorption Mechanism of Paraquat onto Ayous (triplochiton Scleroxylon) Wood Sawdust. *Applied Water Science*. *Applied Water Science* **2019**
65. Wang, Z.; Guo, F.; Chen, C.; Shi, L.; Yuan, S.; Sun, L.; Zhu, J., Self-Assembly of PEI/SiO₂ on Polyethylene Separators for Li-Ion Batteries with Enhanced Rate Capability. *Acs Applied Materials & Interfaces* **2015**, *7* (5), 3314-3322.
66. Xu, P.; Wang, H.; Tong, R.; Du, Q.; Zhong, W., Preparation and morphology of SiO₂/PMMA nanohybrids by microemulsion polymerization. *Colloid and Polymer Science* **2006**, *284* (7), 755-762.
67. Youssef, Z.; Jouan-Hureau, V.; Colombeau, L.; Arnoux, P.; Moussaron, A.; Baros, F.; Toufaily, J.; Hamieh, T.; Roques-Carmes, T.; Frochot, C.. Titania and Silica Nanoparticles Coupled to Chlorin E6 for Anti-cancer Photodynamic Therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. **2018**, 115–126.
68. Zhao, L.; Skwarczynski, M.; Toth, I., Polyelectrolyte-Based Platforms for the Delivery of Peptides and Proteins. *Acs Biomaterials Science & Engineering* **2019**, *5* (10), 4937-4950.
69. Zhuravlev, L., The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **2000**, *173* (1-3), 1-38.
70. Anikin K., Röcker, C., Wittemann, A., Wiedenmann, J., Ballauff, M., Nienhaus, G. U. Polyelectrolyte-Mediated Protein Adsorption: Fluorescent Protein Binding to Individual Polyelectrolyte Nanospheres. *The Journal of Physical Chemistry B* **2005** *109* (12), 5418-5420
71. Meissner, J., Prause, A., Bharti, B. *et al.* Characterization of protein adsorption onto silica nanoparticles: influence of pH and ionic strength. *Colloid Polym Sci* **293**, 3381–3391 (2015).