

## TRABAJO FIN DE GRADO

# USO DE POLÍMEROS NEUTROS PARA REDUCIR EL FENÓMENO DE OPSONIZACIÓN SOBRE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECUBIERTAS CON UN POLIELECTROLITO ANIÓNICO

**Autora: Claudia Pérez García**

**Tutor académico: Felipe Hornos Adán**

**Co-Tutor: Rocío Esquembre Tomé**

Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente

Área de Química Física

Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC)

Grado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Experimentales

Curso 2016/2017

## ÍNDICE

RESUMEN .....	3
PALABRAS CLAVE.....	3
1. INTRODUCCIÓN .....	4
1.1 Nanopartículas de magnetita.....	6
1.2 Recubrimiento de nanopartículas magnéticas con polielectrolitos aniónicos.....	8
1.3 Polímeros neutros como tratamiento de nanopartículas de magnetita recubiertas con polielectrolito (NP-PAA).....	9
1.4 Isoterma de Langmuir.....	11
1.5 Lisozima como proteína modelo.....	13
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1 Síntesis de magnetita.....	17
3.2 Cuantificación de las nanopartículas de magnetita obtenidas.....	17
3.3 Recubrimiento de nanopartículas de magnetita con ácido poliacrílico.....	17
3.4 Cuantificación de las NP-PAA por métodos colorimétricos.....	18
3.5 Adsorción de lisozima a las NP-PAA.....	20
3.6 Tratamiento de las NP-PAA con PEG de diferentes pesos moleculares, PVP y PVA.....	20
3.7 Medición del tamaño y carga de las nanopartículas obtenidas.....	21
3.8 Influencia de la cantidad de polímero neutro sobre las NP-PAA tratadas con PEG 400.....	21
4. RESULTADOS .....	21
4.1 Determinación de la $Q_{m\acute{a}x}$ de la lisozima adsorbida sobre las NP-PAA.....	22
4.2 Determinación de la $Q_{m\acute{a}x}$ de la lisozima adsorbida sobre las NP-PAA tratadas con PEG de diferentes pesos moleculares.....	23
4.3 Determinación de la $Q_{m\acute{a}x}$ de la lisozima adsorbida sobre las NP-PAA tratadas con PVP.....	26
4.4 Determinación de la $Q_{m\acute{a}x}$ de la lisozima adsorbida sobre las NP-PAA tratadas con PVA.....	26
5. DISCUSIÓN.....	27
5.1 Caracterización de las NP-PAA tratadas con PEG de diferentes pesos moleculares.....	29
5.2 Caracterización de las NP-PAA tratadas con otros polímeros neutros: PVP y PVA.....	30
6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA .....	30
7. BIBLIOGRAFÍA.....	33

## RESUMEN

El uso de nanopartículas magnéticas ha ido creciendo de forma desmesurada durante las últimas décadas debido a la gran aplicabilidad que presentan. Podemos destacar su uso dentro del campo de la biomedicina, donde ya han sido usadas como agentes de contraste en imagen por resonancia magnética. Aunque aún en desarrollo, se pretenden utilizar como sistemas transportadores de biomoléculas, sin embargo, estas partículas al ser administradas podrían ser eliminadas del organismo por el sistema inmune (opsonización).

En este trabajo se han obtenido nanopartículas de magnetita recubiertas con un polielectrolito aniónico y se ha caracterizado su capacidad máxima para adsorber Lisozima. Con el fin de reducir/evitar la opsonización, proponemos el tratamiento de las nanopartículas con distintos polímeros neutros, como polietilenglicol (PEG) de distinto peso molecular (400, 4000 y 35000 g/mol), polivinil alcohol (PVA) y polivinilpirrolidona (PVP).

Los resultados parecerían indicar que de los polímeros utilizados, tanto el PEG 400 como el PVA aumentan la capacidad de adsorción de la nanopartícula (un 28 % y un 144 % respectivamente) favoreciendo la opsonización, el PEG 4000 no afectaría a tal fenómeno, y que solamente el PEG de 35000 y la PVP lo reducirían un 26 %.

## ABSTRACT

Use of magnetic nanoparticles has shown a significant increase during the last decades due to their numerous applications. In particular, in the biomedical field, where they have been used as magnetic resonance imaging contrast agents. Their application as drug delivery systems is now in development, but one of the main problems encountered is their elimination by the immune system (opsonization).

In this work, we have obtained magnetic nanoparticles coated by an anionic polyelectrolyte and have characterized their adsorption capacity towards hen egg white lysozyme, used as a model cationic protein. As a working hypothesis, we have studied if several neutral polymers could compete with the protein for the charged surface of the nanoparticle as a means to decrease the adsorption to the nanoparticles of some of the proteins present in the biological media that initiates the opsonization process. In particular, we have studied the effect of polyethyleneglycol (PEG) of different molecular weights (400, 4000 y 35000 g/mol), polyvinyl alcohol (PVA) and polyvinylpyrrolidone (PVP).

The results suggest that PEG 400 and PVA increase the nanoparticle adsorption capacity (28% and 144%, respectively) promoting opsonization while PEG 4000 has a negligible effect and PEG 35000 and PVP reduce the protein adsorption capacity by a 26%.

*Palabras clave: NP-PAA, PEG, PVP, PVA, capacidad de adsorción máxima, opsonización.*

*Key words: NP-PAA, PEG, PVP, PVA, maximum adsorption capacity, opsonization.*

## 1. INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, el desarrollo y la caracterización de nanopartículas magnéticas han ido creciendo desmesuradamente. Gracias a sus propiedades físicoquímicas y a su magnetismo, pueden ser empleadas en numerosos ámbitos: como sistemas de refrigeración magnética, en sistemas de almacenamiento de datos, tratando aspectos medioambientales o dentro del campo de la biomedicina (Tong et al., 2015; Laurent et al., 2008). Concretamente, es de gran interés su aplicabilidad biomédica, ya que demuestran ser un gran avance en ciencia con un futuro muy prometedor. Así pues, pueden ser, entre otros, interesantes agentes de contraste en imagen por resonancia magnética, eficientes marcadores celulares o buenos sistemas de liberación controlada de fármacos (Gupta et al., 2005). Es de especial importancia su empleo como vehiculizadoras de fármacos como una potencial alternativa frente al uso de fármacos convencionales, sobre todo, los empleados en el cáncer. Los agentes quimioterapéuticos y antitumorales habituales son liberados al torrente sanguíneo y se caracterizan por no presentar especificidad por el tejido tumoral. Como consecuencia, las células y los tejidos sanos también se ven afectados dando como resultado una alta toxicidad y severos efectos secundarios (Bekaroğlu et al., 2017). Con el fin de paliar este problema, el fármaco antitumoral puede ser adsorbido a la superficie de la nanopartícula magnética, la cual se dirige bajo la acción de un campo magnético externo al tejido específico donde actuará dicho fármaco evitando los indeseados efectos secundarios. Sin embargo, el principal problema asociado a este sistema de liberación controlada es el fenómeno de opsonización.

Este fenómeno se describe como el mecanismo por el cual el sistema inmune elimina agentes extraños del organismo tales como patógenos o partículas exógenas. Se basa en el recubrimiento del agente extraño por unas proteínas séricas denominadas opsoninas. Existe una amplia variedad y naturaleza dentro de este tipo de proteínas, pudiendo englobar desde componentes fundamentales del sistema inmunológico, como las inmunoglobulinas y ciertos elementos del sistema del complemento, hasta proteínas séricas comunes, como el colágeno tipo I, la proteína C reactiva o la fibronectina.

El proceso de opsonización (Fig.1) comienza con la unión de la opsonina al elemento que se desea eliminar. Esta unión está mediada normalmente por receptores y ligandos específicos y da lugar a una fuerte señalización que activa a las células fagocíticas, las cuales destruyen el

material exógeno mediante fagocitosis. En el caso de las nanopartículas, se ha visto que, generalmente no son fagocitadas por el sistema inmune sino que son secuestradas en los sistemas fagocíticos mononucleares (MNP) (Owens et al., 2006).

Como consecuencia de la opsonización, el sistema inmune tratará de eliminar las nanopartículas magnéticas mediante diversos mecanismos que incluyen la adsorción de las proteínas plasmáticas por la superficie de la nanopartícula y posterior desorción de la proteína farmacológica así como el reclutamiento de las células fagocíticas y componentes del sistema inmune que median el reconocimiento, digestión y eliminación de compuestos extraños dentro del torrente sanguíneo.

Un posible abordaje para poder emplear las nanopartículas magnéticas como sistemas de liberación controlada de fármacos y poder dirigir las hacia los tejidos diana del fármaco es su recubrimiento con polímeros neutros con grupos hidroxilos semejantes al agua tales como el polietilenglicol (PEG), la polivinilpirrolidona (PVP) o el polivinil alcohol (PVA). De este modo, el sistema inmune no detectaría las nanopartículas como agentes exógenos que han de eliminarse y se evitaría, de forma relativamente eficaz, el fenómeno de opsonización (Gref et al., 1995).

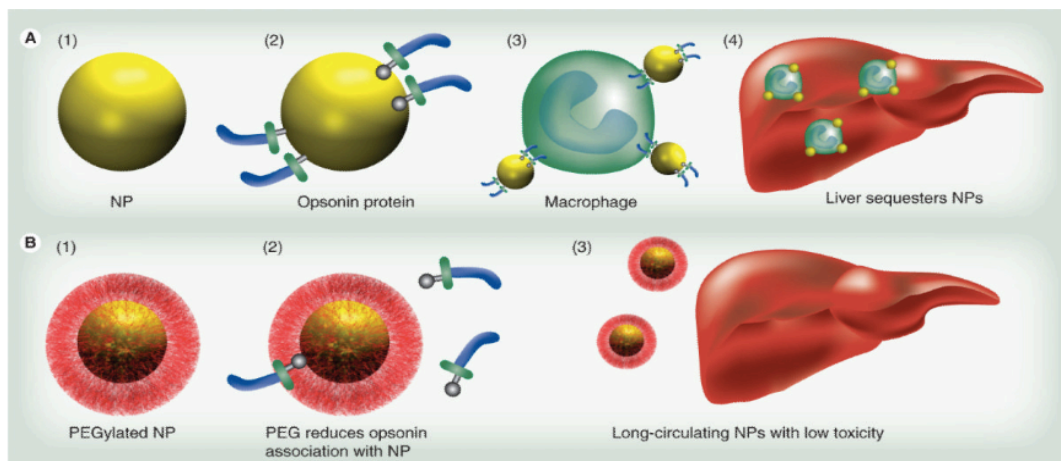


Figura 1. Esquema del proceso de opsonización en el torrente sanguíneo ante la presencia de nanopartículas magnéticas sin recubrir por polímeros neutros (A) y recubiertas con PEG (B). (A) Unión de las opsoninas a la nanopartícula (2). Activación de macrófagos (3). Acumulación de las nanopartículas en el hígado para detoxificar (4). (B) La presencia del PEG reduce la unión de las opsoninas (2) y el secuestro en el hígado (3). (Jokerst et al., 2011)

### 1.1 Nanopartículas de magnetita.

Los óxidos de hierro son compuestos comunes en la naturaleza y fácilmente obtenibles en el laboratorio por métodos fisicoquímicos. Sus principales formas son: magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$ ) y hematita ( $\alpha\text{-Fe}_3\text{O}_4$ ) (Teja et al., 2009).

La magnetita, compuesto de interés en este trabajo, es un mineral de hierro de coloración negra perteneciente al grupo de las espinelas. Este mineral se encuentra en un amplio escenario en la naturaleza, siendo más común en rocas ígneas, metamórficas y sedimentarias.

La estructura de la magnetita (Fig.2) fue una de las primeras estructuras minerales en ser definida mediante difracción de rayos X en 1915 (Bragg., 1915; Nishikawa., 1915) Este tipo de mineral presenta una estructura típica correspondiente a las espinelas inversas. Se basa en la disposición de los iones de oxígeno ( $32 \text{O}^{2-}$ ) formando una red cúbica centrada en las caras (FCC). En cuanto a los iones Fe, éstos se posicionan en función de su estado de oxidación. Los iones  $\text{Fe}^{2+}$  se localizan en los huecos octaédricos mientras que los iones  $\text{Fe}^{3+}$  se encuentran en los tetraédricos.

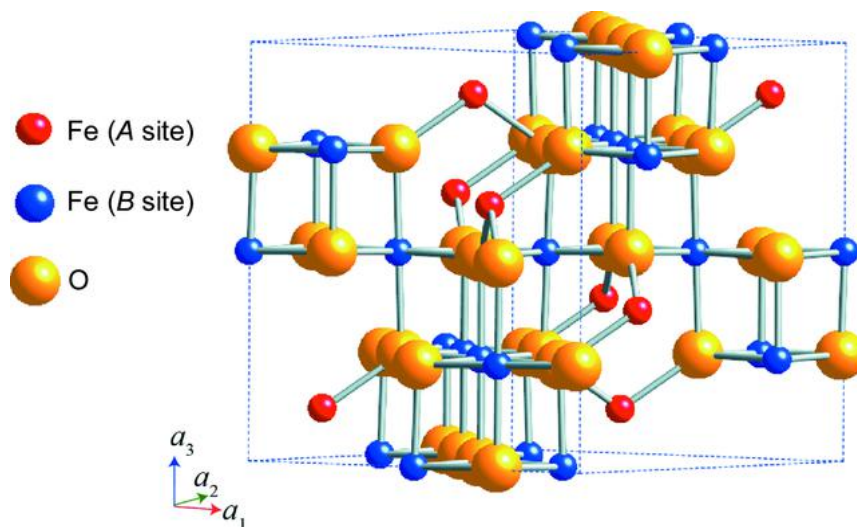


Figura 2. Estructura de la magnetita (Okube et al.,2014).

La principal propiedad y aplicabilidad de la magnetita es su fuerte magnetismo debido a que es considerado el óxido metálico de transición con mayor magnetismo. Esta propiedad viene ocasionada como consecuencia del alineamiento de los momentos magnéticos de diversos elementos. En función de estos momentos magnéticos, existen diversos comportamientos: ferromagnético, ferrimagnético y antiferromagnético (Teja et al., 2009). Concretamente, la magnetita es considerada como un compuesto ferromagnético ya que,

todos sus momentos magnéticos se encuentran alineados sin necesidad de la aplicación de un campo magnético externo. Esta propiedad, junto con su alta biocompatibilidad y su baja toxicidad, favorece el desarrollo y caracterización de nanopartículas compuestas de este elemento (Leslie-Pelecky., 1996).

Centrando su aplicabilidad a la liberación controlada de fármacos, es de vital importancia conocer qué comportamiento presentan a un pH fisiológico. Dado que su punto isoeléctrico ( $pI$ ) es cercano a 6.5 (Fig.3), se puede concluir que se encontrarán en su forma neutra, careciendo de cualquier tipo de carga. Como consecuencia, tienden a formar agregaciones dando como resultado partículas de un diámetro aparente mayor al de las nanopartículas individuales dispersas.

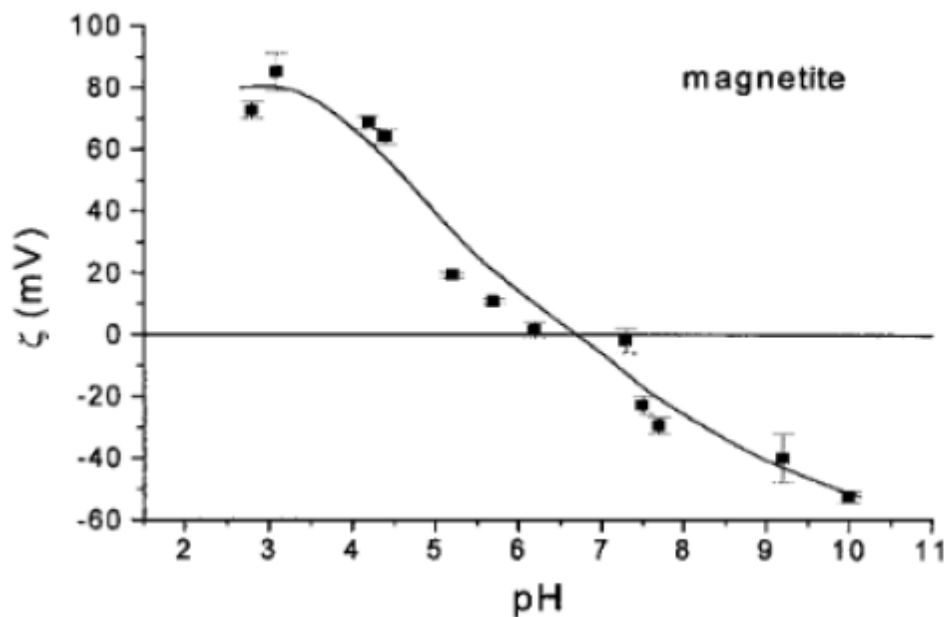


Figura 3. Representación del potencial Z de la magnetita frente al pH. Como se puede observar, el punto isoeléctrico es cercano a 6.5. (Halper et al.,1971)

## 1.2 Recubrimiento de nanopartículas magnéticas con polielectrolitos aniónicos.

Una posible solución planteada por numerosos autores para estabilizar coloidalmente la nanopartícula de magnetita es recubrirla con un polielectrolito (PE) (Tombácz et al., 2006; Mendenhall et al., 1996), el cual puede definirse como un polímero que contiene grupos ionizables los cuales pueden estar total o parcialmente disociados en disolución presentando una elevada carga superficial, lo que nos permitirá unir fármacos con carga neta opuesta mediante interacción electrostática.

Para llevar a cabo este recubrimiento hemos utilizado el ácido poliacrílico (PAA) (Fig.4), un polímero formado por homopolímeros de ácido acrílico entrecruzados con un alil éter pentaeritrol. A pH fisiológico, los grupos carboxilatos que presenta pierden los protones adquiriendo carga negativa. La principal ventaja de este polielectrolito, es la capacidad quelante de dichos grupos carboxilato por los iones Fe que hay en la superficie de la partícula, lo que sumado a la interacción electrostática la recubrirá de forma eficaz, al mismo tiempo que evita su corrosión (Hajdú et al.,2012).

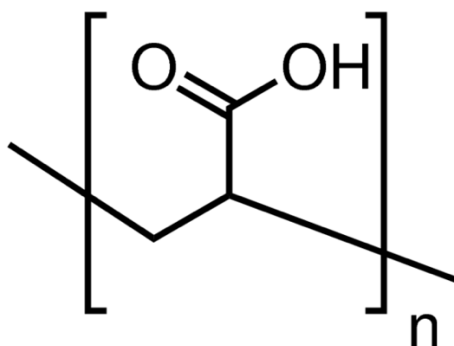


Figura 4. Estructura del ácido poliacrílico (PAA). Obtenida de Sigma Aldrich.

A partir de este sistema propuesto de nanopartícula-PE como sistema de liberación controlada intentaremos reducir el fenómeno de opsonización tratándolo con polímeros neutros.



### 1.3 Polímeros neutros como tratamiento de nanopartículas de magnetita recubiertas con polielectrolito (NP-PAA).

Dadas las características fisicoquímicas que presentan este tipo de compuestos y los estudios que se han realizado sobre sus efectos sobre los fluidos biológicos, los polímeros son una pieza fundamental en el desarrollo y caracterización de las nanopartículas magnéticas como transportadoras de fármacos. La amplia variedad de materiales candidatos a recubrir nanopartículas magnética crece en paralelo al desarrollo de nuevos compuestos poliméricos. Los empleados para llevar a cabo el objetivo de este trabajo fueron los siguientes:

#### 1.3.1 PEG

El PEG (Fig. 5-2) es un polímero helicoidal constituido por repeticiones de unidades formadas por óxido de etileno (Li, J et al., 2003).

La síntesis del PEG se produce por una interacción entre el óxido de etileno con el agua, etilenglicol u oligómeros de etilenglicol pudiendo ser catalizada por bases o ácidos.

El polietilenglicol presenta una gran versatilidad y puede unirse, de forma covalente, a otras moléculas como proteínas farmacéuticas por un mecanismo conocido como PEGilación (Fig. 5-3). Gracias a este mecanismo es posible la modulación de la solubilidad de la proteína unida así como la interferencia en el tamaño final de la nanopartícula (Illés et al., 2015).

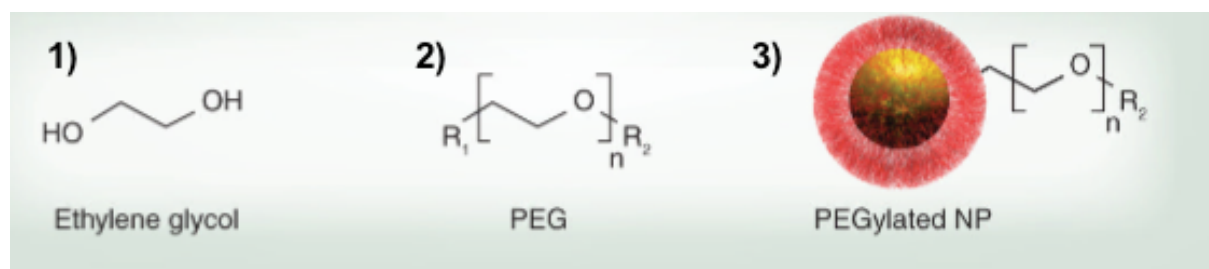


Figura 5. Estructura química del monómero del PEG (1) así como del polímero neutro (2). Representación de una nanopartícula magnética recubierta por PEG o PEGilada (3). (Jokerst et al., 2011)

La gran importancia que presenta este polímero como recubrimiento de nanopartículas reside en su biocompatibilidad y solubilidad en agua (Barrera et al., 2008; Yang et al., 2014). Estos aspectos son muy importantes debido a que se ha observado que la PEGilación de las nanopartículas magnéticas desnudas reduce el fenómeno de opsonización y, por tanto, aumenta el tiempo de circulación en sangre (Gref et al., 1995).

### 1.3.2 PVA

El PVA (Fig.6) es un polímero hidrofílico que fue sintetizado por primera vez por Hermann y Haehnel en 1924 mediante la saponificación del polivinil éster en una solución de NaOH. Sin embargo, el PVA comercial es producido mediante una hidrólisis del polivinil acetato. Sus propiedades estructurales dependen de la masa molecular del polímero y el grado de hidrólisis al que se ha sometido (Muppalaneni et al.,2013). Este último aspecto es muy importante ya que está relacionado con la solubilidad. Se puede afirmar que los compuestos con mayores grados de hidrólisis son aquellos que presentan menor solubilidad en agua (Hassan et al., 2000).

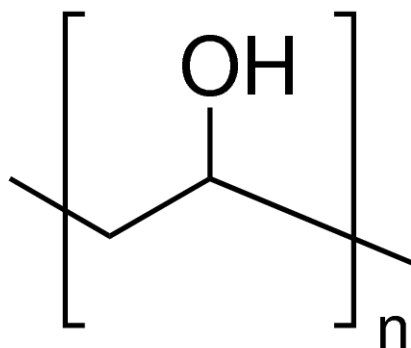


Figura 6. Estructura del PVA. Obtenida de Sigma Aldrich.

Este polímero se emplea en diferentes áreas biotecnológicas y biomédicas debido a sus propiedades fisicoquímicas, su fácil procesamiento y su baja toxicidad (Chiellini et al.,2003).

### 1.3.3 PVP

La PVP (Fig.7) es un polímero que presenta una conformación de "random coil" en soluciones acuosas. Está constituido por la polimerización de la N-vinilpirrolidona, la cual da lugar a polímeros con diferentes pesos moleculares en función de las condiciones así como copolímeros y "entrecruzamientos" (cross-linked) de PVP.

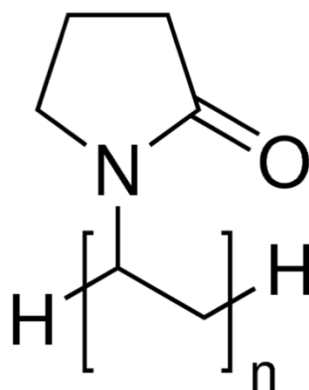


Figura 7. Estructura de la PVP. Obtenida de Sigma Aldrich.

La síntesis de la PVP comienza a partir del acetileno y el formaldehído que, por una serie de reacciones químicas, da lugar a la N-vinilpirrolidona. Para obtener la polivinilpirrolidona, este último compuesto se polimeriza en diversas condiciones. Por una parte, la síntesis se puede realizar en agua, tomando el peróxido de hidrógeno como compuesto iniciador. Paralelamente, se puede realizar la polimerización en solventes orgánicos siendo, en este caso, el radical del solvente el iniciador de la reacción.

La presencia de grupos hidrofóbicos así como de hidrofílicos permite que este polímero sea capaz de ser soluble tanto en agua como en solventes orgánicos. Además, la alta higroscopia que presenta en soluciones acuosas, convierten la PVP en un polímero adecuado para ser empleado como recubrimiento. Sin embargo, hay que recalcar que el peso molecular de este polímero juega un papel importante en su aplicabilidad biomédica ya que, según el tamaño que presente, tendrá mayor susceptibilidad de ser excretado por el organismo (Haaf et al., 1985).

#### **1.4 Isoterma de Langmuir.**

Para caracterizar la capacidad de adsorción de estos sistemas vehiculizadores nos basaremos en la isoterma de Langmuir (Langmuir, 1916), el cual indica el grado de adsorción de las moléculas que se encuentran dispersas entre una fase líquida/gaseosa y una fase sólida cuando se alcanza el equilibrio.

La isoterma teórica de Langmuir (Fig.8) es un ejemplo de un modelo de isoterma de adsorción en monocapa. Este modelo defiende que la fase sólida proporciona una serie de posiciones para la adsorción, donde, únicamente se adsorberá una molécula, la cual no interactuará con las moléculas de posiciones vecinas. Para definir con mayor exactitud este

tipo de adsorción, el modelo incluye el término de grado o factor de recubrimiento,  $\theta$ . Este factor indica la fracción de los sitios de adsorción a los cuáles se ha unido una molécula del soluto.

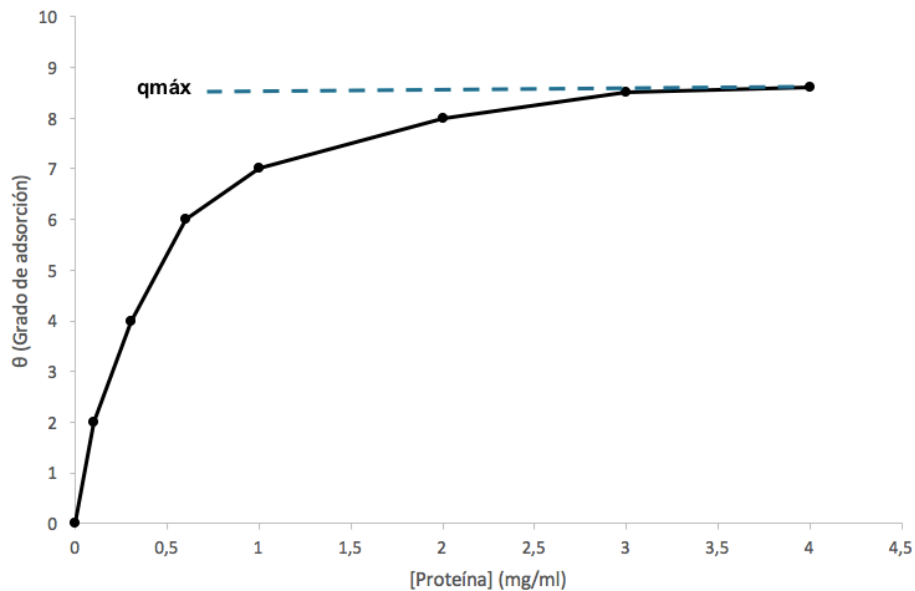


Figura 8. Isoterma de Langmuir.

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

$$\theta = \frac{q}{Q_{max}} = \frac{K \cdot [P]}{1 + K \cdot [P]} ; K = \frac{k_{ads}}{k_d}$$

siendo  $q$  el recubrimiento para unas condiciones dadas,  $Q_{m\acute{a}x}$  el recubrimiento máximo,  $K$ , la constante de equilibrio y  $P$ , la concentración de proteína en el equilibrio.

Si se trabaja en condiciones saturantes de proteína (Ec.1.1), siendo la concentración de ésta superior a la constante de disociación, el recubrimiento obtenido será el grado de recubrimiento máximo. De este modo, se trabaja en la parte final de la isoterma y se halla el valor con mayor facilidad. La pendiente de la ecuación de la recta resultante de representar la concentración de proteína frente a la concentración de nanopartícula será el recubrimiento máximo o  $Q_{m\acute{a}x}$  (Ec.1).

$$q = \frac{Q_{max} \cdot k_{ad} \cdot [P]}{k_d + k_{ad} \cdot [P]} \rightarrow \text{Si } k_d \ll [P] \rightarrow q = Q_{max} \text{ (Ec. 1)}$$

$$q = \frac{m_{Prot \text{ adsorbida}}}{m_{NP \text{ total}}} = Q_{max}$$

### 1.5 Lisozima como proteína modelo.

Para llevar a cabo los diferentes ensayos de adsorción se emplea como proteína modelo la lisozima (Lzm) (Fig.9). Esta proteína, también conocida como muramidasa, es una enzima glucosidasa descubierta por Alexander Fleming en 1922 (Fleming, 1922) cuando observó que las secreciones nasales podían matar diversas bacterias. Esta enzima se encuentra en todo tipo de fluidos corporales como las secreciones lacrimales, saliva, leche materna o suero sanguíneo.

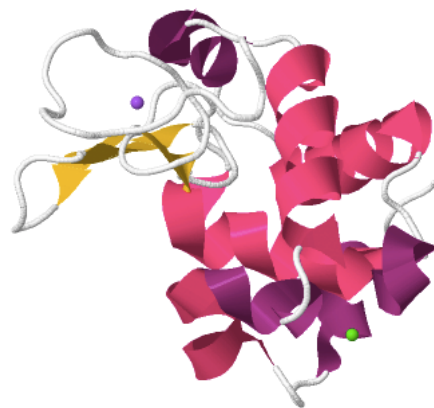


Figura 9. Representación en *cartoon* de la lisozima. Obtenida de Protein Data Bank. (Código: 5TK0)

Su principal función radica en catalizar la hidrólisis de enlace glucosídico  $\beta$  1-4 entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina en el peptidoglicano, componente principal de las paredes bacterianas. Además, aparte de hidrolizar enlaces, es capaz de realizar otras funciones cooperando con el sistema inmunológico con el fin de eliminar microorganismos patógenos del organismo. De este modo, actúa conjuntamente con anticuerpos (IgA secretadas) y los factores del sistema del complemento para lisar bacterias como *E.coli*.

También, juega un papel importante en la fagocitosis, durante la cual es liberada de las células granulocíticas (McClelland et al., 1975).

Gracias a los estudios de Pierre Jollès (Jollès et al., 1969), hoy se conoce que la lisozima presenta 129 residuos aminoácidos que forman una cadena polipeptídica entrecruzada por cuatro puentes disulfuro intramoleculares. El empaquetamiento de las proteínas es vital para definir y comprender su actividad. De este modo, la conformación de la lisozima se caracteriza por la presencia de estructuras secundarias como alfa hélices y láminas beta con residuos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos. Es de interés resaltar el sitio activo de la enzima, caracterizado por ser una especie de grieta donde el sustrato se une y, posteriormente, es hidrolizado.

La lisozima es una enzima que por su estructura, estabilidad y empaquetamiento es de las más empleadas y estudiadas en investigación bioquímica. Aunque ésta se encuentra en todos los animales, es de reconocer la importancia de la lisozima de huevo blanco de gallina, como modelo de numerosos estudios (Swaminathan et al., 2011).

En este trabajo, la cuantificación por métodos espectrofotométricos de la lisozima se realiza midiendo su espectro desde 400 a 240 nm (Fig.10). La absorción de luz UV de esta proteína es gracias a la presencia de aminoácidos aromáticos en su estructura, tales como el triptófano (Trp), la tirosina (Tyr), además de puentes disulfuro. Concretamente la lisozima presenta 6 Trp, 3 Tyr y 4 puentes disulfuro, donde todos contribuyen a su máximo de absorción a 280 nm ( $\epsilon = 2.653 \text{ (mg/mL)}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

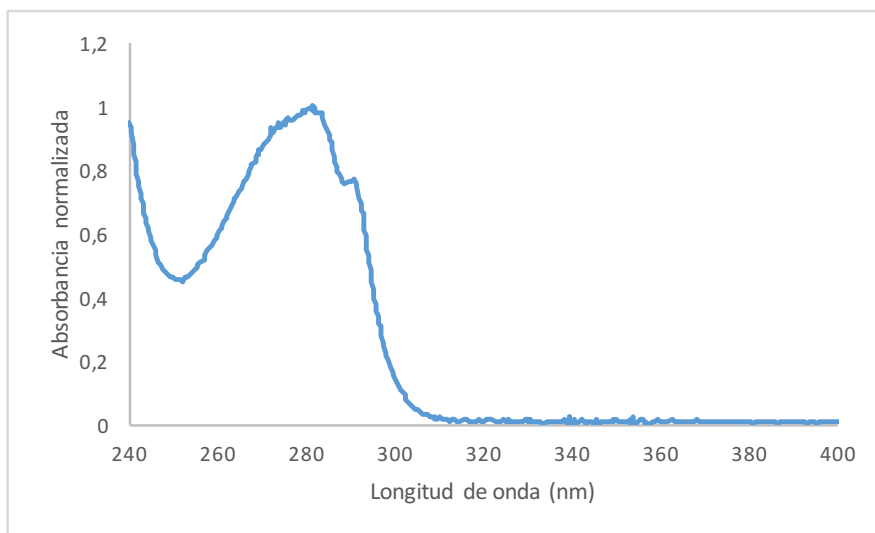


Figura 10. Espectro de absorción de la lisozima en un rango de 240 a 400 nm.

## 2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.

Los primeros estudios que destacan la importancia de las nanopartículas magnéticas como transportadoras de fármacos se remontan a la década de los 70 (Seny et al., 1978; Widder et al., 1978). El primer artículo que demuestra su uso como sistemas liberadores de fármacos tiene su origen en 1983, cuando Wider et al (Widder et al., 1983) probaron la eficacia de las nanopartículas transportando doxorubicina directamente a un sarcoma de rata.

Existen numerosos artículos que destacan la importancia de la búsqueda de una solución al problema de opsonización de nanopartículas magnéticas. Estos estudios previos se centran en el recubrimiento de nanopartículas de magnetita desnudas (Owens et al., 2006).

En cuanto al PEG, son numerosos los estudios que resaltan su idoneidad como recubrimiento dada su biocompatibilidad y su capacidad de generar una superficie hidrofílica y, por tanto, con mayor vida media en el torrente sanguíneo (Moghimi et al., 2001; Zhang et al., 2002; Harris et al., 2003).

Sin embargo, estudios más centrados en la caracterización de las nanopartículas recubiertas de PEG buscan como objetivo el recubrimiento óptimo. Un caso es el trabajo realizado por Illés et al (Illés et al., 2015) en el que se concluye que los copolímeros de PEG con un gran número de grupos funcionales COOH son los recubrimientos idóneos. Además, otros aspectos estudiados son su absorción y toxicidad *in vivo*. Pisciotti et al (Pisciotti et al., 2014) determinan que las nanopartículas recubiertas con PEG aumentaban considerablemente la absorción en las células tumorales donde se deseaba actuar. Además, paralelamente,

realizaron estudios de citotoxicidad, demostrando que estos compuestos presentaban baja toxicidad.

En cuanto al recubrimiento de las nanopartículas con PVA, diversos autores afirman que este tipo de recubrimiento permite una estabilidad coloidal y un comportamiento magnético óptimo (Qiu et al.,2000). Sin embargo, estudios más recientes (Nadeem et al., 2016) afirman que un aumento en la concentración de PVA disminuye el magnetismo de las nanopartículas. En cuanto a otras propiedades, el PVA disminuye el tamaño de las nanopartículas y, a su vez, evita la aglomeración.

La PVP, por su parte, también muestra evidencias de ser un recubrimiento prometedor dentro del campo de la biomedicina. Huang et al (Huang et al.,2010) estudiaron el efecto del tamaño de las nanopartículas recubiertas en la absorción celular y llegaron a la conclusión de que el tamaño de éstas es determinante. Además, también se han realizado experimentos con nanopartículas recubiertas con PEG y PVP conjuntamente (Tu et al., 2013). Este tipo de recubrimiento resulta en una buena estabilidad coloidal.

#### **OBJETIVO GENERAL:**

El objetivo de este trabajo es la búsqueda de polímeros neutros para el tratamiento de nanopartículas de magnetita recubiertas con polielectrolitos con el fin de evitar o reducir el fenómeno de opsonización.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

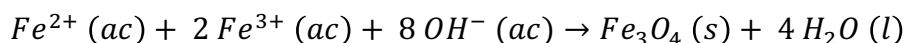
- Síntesis de nanopartículas de magnetita.
- Estabilización de las nanopartículas de magnetita mediante el recubrimiento con un polielectrolito aniónico y posterior caracterización (tamaño y carga).
- Determinación de la capacidad de adsorción de Lzm sobre nanopartículas-PE.
- Tratamiento de las nanopartículas-PE con diferentes polímeros neutros y posterior caracterización (tamaño y carga).
- Determinación de la capacidad de adsorción de Lzm sobre nanopartículas-PE tratadas con polímeros neutros.



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Síntesis de magnetita.**

La síntesis de la magnetita se da por una reacción conocida como reacción de coprecipitación (Massart, 1981).



Para obtener las nanopartículas de magnetita por el método de coprecipitación, se debe partir de una solución de ácido clorhídrico (HCl) 0,4 M mezclada con  $Fe^{3+}$  y  $Fe^{2+}$  en un ratio 2:1, respectivamente. Esta solución se mantiene en agitación y se echa, gota a gota, sobre una solución básica de hidróxido de sodio (NaOH) 0,5 M preparada previamente. Una vez finalizada la síntesis, se mantiene la solución en agitación durante una hora. El resultado final es una solución de coloración negra compuesta por óxido ferroso férrico ( $Fe_3O_4$ ) o magnetita.

Cabe destacar que un posible problema asociado a la síntesis de la magnetita es la oxidación del hierro, la cual desencadenaría problemas de pureza. Por este motivo, con el fin de evitar dicha oxidación, todo el proceso de coprecipitación se da en una atmósfera de nitrógeno, el cual desplaza todo el oxígeno presente y a una temperatura de 40°C.

Tras la síntesis de la magnetita, las nanopartículas deben seguir un proceso de varios lavados con agua desgasificada. Por último, para mantenerlas en una solución dispersa, se realiza un último lavado con etanol.

#### **3.2 Cuantificación de las nanopartículas de magnetita obtenidas.**

Con el fin de conocer la concentración de magnetita obtenida en la síntesis, se realiza una cuantificación mediante residuo seco. Para ello, se añaden 2 ml de las nanopartículas de magnetita obtenidas a tres tubos pesados previamente y se dejan secar en un termobloque. Una vez se tiene el residuo seco, se pesa y se calcula la concentración de magnetita en función de la alícuota que se ha añadido inicialmente.

#### **3.3 Recubrimiento de nanopartículas de magnetita con ácido poliacrílico.**

Para recubrir las nanopartículas de magnetita, se preparan 1000 ml de PAA de 15000 g/mol a 2,7 mg/ml ajustado previamente a pH 9,0 y se mantiene en agitación. Paralelamente, se añaden desde una bureta 100 ml a 4 mg/ml de nanopartículas de magnetita ajustadas a pH 11 y sonicadas previamente durante treinta minutos en intervalos de diez segundos de sonicación y veinte segundos sin sonicación (para evitar un calentamiento excesivo de la

disolución empleando un baño de hielo), sobre la disolución de PAA y se deja en agitación toda la noche.

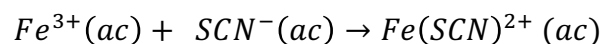
Una vez recubiertas, se baja el pH a 3,0 y así se consigue que las nanopartículas recubiertas con PAA (NP-PAA) decanten. La decantación se produce porque, a este pH por debajo del pKa del PAA (4,35), los grupos carboxilato se protonan y, por tanto, se pierde carga, lo que conlleva a una pérdida de estabilidad coloidal. Una vez decantadas, las NP-PAA pueden ser sometidas a una serie de lavados hasta que, finalmente, se sube el pH a 7,0. En estas condiciones, las NP-PAA volverán a ser sometidas a procesos de sonicación para individualizarlas y poder cuantificarlas.

### **3.4 Cuantificación de las NP-PAA por métodos colorimétricos.**

Existen diversos métodos para cuantificar la presencia de Fe y, por tanto, de magnetita en una muestra. Concretamente, mediante colorimetría, empleando reactivos que interaccionen con el hierro y formen complejos coloreados, se puede hallar, de una forma cuantitativa, el contenido en hierro de las soluciones deseadas.

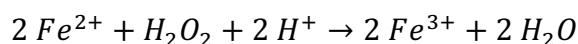
El tiocianato de potasio (KSCN) es un compuesto químico que se caracteriza por reaccionar con diferentes elementos dando lugar a compuestos caracterizados por su coloración. Concretamente, con los compuestos de hierro, el ion  $SCN^-$  interacciona con el ion  $Fe^{3+}$ . El resultado de esta interacción es un complejo de coloración rojiza ( $Fe(SCN)^{2+}$ ), el cual se puede medir mediante técnicas espectrofotométricas a una longitud de onda de 474 nm. De este modo, se halla de forma precisa y cuantitativa la cantidad de hierro presente en una muestra a estudio. Son numerosos los estudios que emplean este tipo de cuantificación dada su precisión y facilidad (Niedzielski et al., 2014).

La reacción mencionada entre el compuesto de hierro y el ion del tiocianato es la siguiente:



Un problema adicional que puede surgir a la hora de cuantificar la presencia de magnetita en diferentes muestras es la problemática asociada a su carácter divalente y trivalente. Ya que la magnetita está formada tanto por iones de hierro  $Fe^{2+}$  como  $Fe^{3+}$ , la cuantificación con KSCN podría ser imprecisa. Por este motivo, se requiere de un agente oxidante con el fin de desplazar todo el hierro divalente de la magnetita a hierro trivalente. Son numerosos los agentes oxidantes empleados en la literatura para la cuantificación del hierro pero, los más

empleados son el peróxido de hidrógeno y el permanganato, siendo el primero el más adecuado (Martins et al.,2005).



Este método de cuantificación es el empleado para hallar la concentración de las nanopartículas recubiertas con PAA. Para ello, se disuelven las nanopartículas de magnetita recubiertas con PAA en una solución con ácido clorhídrico (HCl 6M), agua (H<sub>2</sub>O) y peróxido de hidrógeno al 0,75% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Seguidamente, se realizan una serie de diluciones, las cuales contienen volúmenes crecientes de Fe<sup>3+</sup> en HCl 2M.

La determinación de la concentración de nanopartícula se realiza mediante la medida de la absorbancia a una longitud de onda de 474 nm de las muestras preparadas junto con un volumen fijo de KSCN 2M, el cual se añade justo antes de medir.

A continuación, a partir de la ley de Lambert-Beer, conociendo el coeficiente de extinción del complejo, expresado en función de concentración de Fe<sup>3+</sup> en mg/ml (Fig.11) ( $\epsilon = 218,51$  (mg/ml)<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>) se halla la concentración de las muestras medidas en el espectrofotómetro.

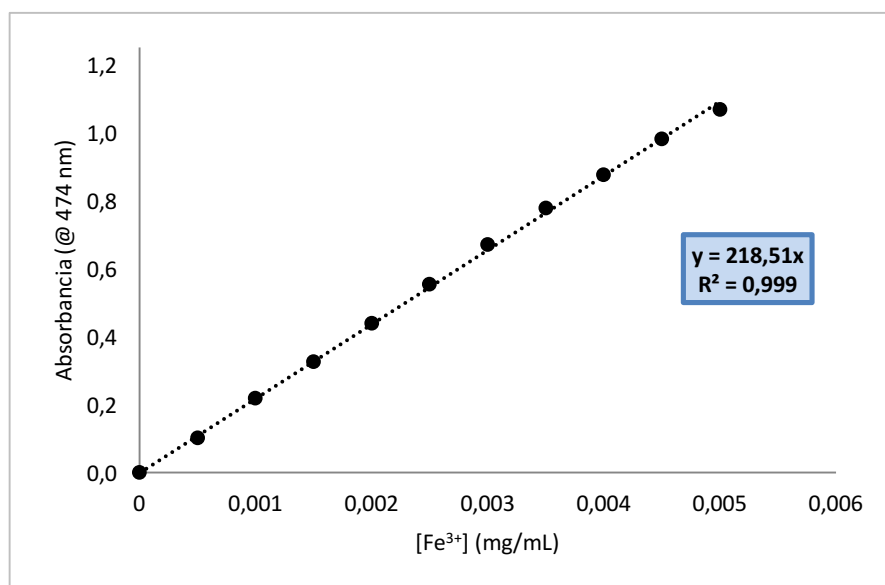


Figura 11. Determinación del coeficiente de extinción del complejo Fe·(SCN)<sup>2+</sup> en medio ácido a una longitud de onda de 474 nm.

Una vez conocidas las concentraciones de hierro de las muestras medidas, se calcula la concentración de magnetita mediante relación de sus masas molares.

### **3.5 Adsorción de lisozima a las NP-PAA.**

Con el fin de conocer cómo se comportan las NP-PAA obtenidas como vehiculizadoras de fármacos, se procede a realizar un estudio tomando como referencia la proteína lisozima.

Para observar el comportamiento de las NP-PAA junto con la lisozima y, por último, hallar la capacidad de adsorción máxima, se preparan una serie de tubos con una concentración creciente de nanopartícula (desde 0 hasta 0,055 mg/ml) y una concentración fija de proteína (0,3 mg/ml). Además, los tubos se mantienen a un pH de 7,0 debido a la adición del buffer Hepes (10 mM a pH 7,0).

Tras dejar los tubos toda la noche en agitación en una noria, se separan las NP-PAA con un imán y se cuantifica la lisozima que queda en el sobrenadante mediante la medida de su espectro y cogiendo el valor de absorbancia a 280 nm. De este modo, mediante la aproximación de la isoterma de Langmuir, se puede hallar la capacidad máxima de adsorción de la proteína ( $Q_{m\acute{a}x}$ ), la cual sirve como referencia a la hora de realizar los estudios con los polímeros.

### **3.6 Tratamiento de las NP-PAA con PEG de diferentes pesos moleculares, PVP y PVA.**

Una vez realizados los estudios de adsorción de las NP-PAA junto con la proteína modelo, se procede a caracterizar las NP-PAA que han sido tratadas con diferentes polímeros neutros candidatos a evitar el fenómeno de opsonización.

Para ello, se preparan una serie de tubos en las que la concentración de NP-PAA y polímero es creciente y con una relación en masa 1:10, respectivamente (desde 0 a 0,055 mg/ml de nanopartícula). Por su parte, la concentración de lisozima se mantiene constante en 0,5 mg/ml durante todo el experimento. Además, gracias a la adición del buffer Hepes (10 mM pH 7.0), los tubos se encuentran en condiciones fisiológicas.

Para la realización del experimento, primeramente, se añaden todos los volúmenes requeridos a excepción de la lisozima. Una vez preparados los tubos se mantienen durante una hora en la noria para favorecer la interacción entre las NP-PAA y el polímero. Pasada la hora, se añade el volumen faltante de lisozima y se mantienen durante toda la noche en la noria para, finalmente, separar los tubos en el imán y medir el espectro de la lisozima presente en el sobrenadante, es decir, la cantidad de proteína no adsorbida por las nanopartículas.

### 3.7 Medición del tamaño y carga de las nanopartículas obtenidas.

El tamaño de las NP-PAA se determinó mediante dispersión de luz dinámica (DLS, *Dynamic Light Scattering*) en el instrumento Brookhaven Mod 90 Plus (New York, EE.UU.). Este instrumento mide el diámetro hidrodinámico de las partículas esféricas a partir de la dispersión de luz y teniendo en cuenta la velocidad a la que se difunden según el movimiento browniano, movimiento aleatorio de las partículas debido al solvente en el que se encuentran.

Concretamente, para medir el tamaño de las partículas se requiere el coeficiente de difusión traslacional, hallado a partir de la ecuación de Stokes-Einstein:

$$d(H) = \frac{kT}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D}$$

donde  $d$  es el diámetro hidrodinámico,  $D$  el coeficiente de difusión traslacional,  $k$  la constante de Boltzmann,  $T$  la temperatura absoluta y  $\eta$ , la viscosidad (DLS technical note).

Con el mismo instrumento también se halla la carga de la superficie de las nanopartículas, a partir del potencial  $Z$ , el cual es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción entre partículas. La magnitud del potencial  $Z$  informa sobre la estabilidad del sistema coloidal. Partículas en suspensión con un gran valor (negativo o positivo) de potencial  $Z$  tenderán a repelerse mientras que partículas con valores bajos de potencial  $Z$  acabarán agregando.

Existen diversos factores que afectan al potencial  $Z$  como es el pH, la conductividad y la concentración de los componentes a estudio (DLS technical note).

Tanto la medida del tamaño como de la carga por DLS requiere que las muestras estén diluidas, lo cual es una desventaja de la técnica (Bhattacharjee S., 2016).

### 3.8 Influencia de la cantidad de polímero neutro sobre las NP-PAA tratadas con PEG 400.

El experimento parte de la preparación de un stock con concentraciones de 0,1 mg/ml y 100 mM de NaCl constantes mientras que se varía la concentración del PEG 400 (desde 0 hasta 1 mg/ml). A continuación, se disponen los tubos preparados en el imán y se mide el sobrenadante cada cinco minutos a una longitud de onda de 440 nm.

## 4. RESULTADOS

Tras emplear el método de coprecipitación para sintetizar magnetita, se obtiene una concentración de 14,86 mg/ml determinada mediante residuo seco. Esta magnetita, como se

ha comentado, a pH cercanos a su pl (6,5) no es estable coloidalmente y tiende a formar agregados por lo que la caracterización por DLS no es posible. La presencia del PAA dota de carga a las nanopartículas y, de este modo, se mantienen estables coloidalmente, obteniendo una concentración para nuestro stock de 5,5 mg/ml determinada mediante la formación del complejo  $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$ . La posterior caracterización mediante DLS indica que a pH 7 presentan un tamaño de  $92,3 \pm 0,9$  nm y una carga de  $-17,0 \pm 1,9$  mV, confirmando que el recubrimiento ha sido eficaz dado el tamaño que presentan y la carga (a pH 7 las nanopartículas sin recubrir poseen un tamaño micrométrico debido a la agregación).

#### 4.1 Determinación de la $Q_{\text{máx}}$ de la lisozima adsorbida sobre las NP-PAA.

Mediante el empleo de la aproximación de la isoterma de Langmuir en las condiciones descritas en materiales y métodos es posible determinar la capacidad máxima de adsorción de la lisozima. En la Fig.12 se representa la concentración de lisozima que queda en el sobrenadante tras haber decantado magnéticamente las nanopartículas mediante un campo magnético externo frente a la concentración de nanopartícula que había inicialmente en el medio. A medida que aumenta la concentración de nanopartícula, la concentración de lisozima disminuye en el sobrenadante, obteniendo una recta cuya pendiente podemos relacionar con la capacidad máxima de adsorción.

El valor de  $Q_{\text{máx}}$  obtenido para las NP-PAA es de 2,10 mg de lisozima/mg de nanopartícula.

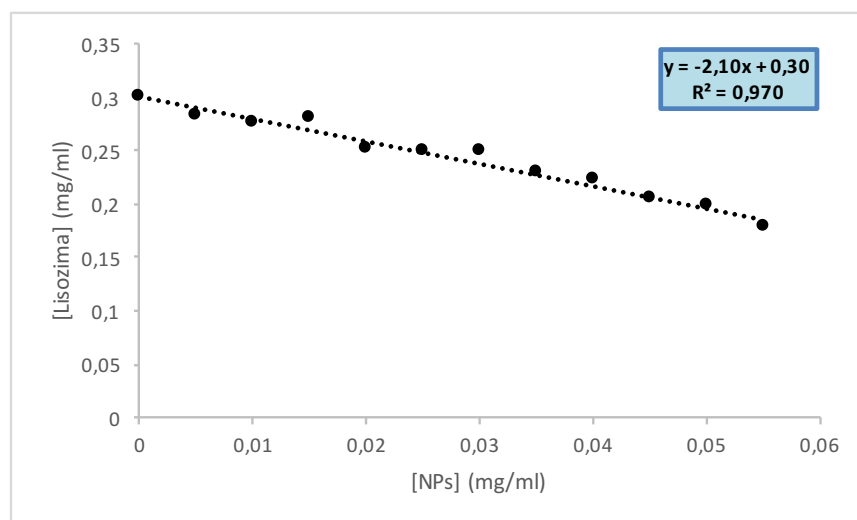


Figura 12. Determinación de la capacidad máxima de adsorción de las NP recubiertas con PAA.

Obtenida la capacidad máxima de adsorción de Lzm por parte de las NP-PAA, tratamos las nanopartículas con distintos polímeros neutros, y determinamos su capacidad de adsorción.

A partir de este momento, en todas las gráficas siguientes donde se estudia la capacidad máxima de adsorción se representa la concentración de lisozima que queda en el sobrenadante tras haber decantado magnéticamente las nanopartículas mediante un campo magnético externo frente a la concentración de nanopartícula (NP-PAA tratadas con el polímero neutro que se indica) que había inicialmente en el medio.

#### 4.2 Determinación de la $Q_{\text{máx}}$ de la lisozima adsorbida sobre las NP-PAA tratadas con PEG de diferentes pesos moleculares.

Con el uso de PEG de diferentes pesos moleculares se pretende estudiar si se producen cambios, tanto positivos como negativos en cuanto a su capacidad para disminuir la opsonización, y de haberlos si existe una correlación con la variación de su peso molecular.

- PEG 400 g/mol

Una vez tratadas las NP-PAA con PEG de 400 obtenemos un tamaño de  $94,1 \pm 1,9$  nm y una carga de  $-21,9 \pm 1,6$  mV mediante medidas de DLS y PZ.

Tras hacer el ensayo con estas partículas obtenemos que la capacidad máxima de adsorción es de 2,68 mg/ml (Fig.13).

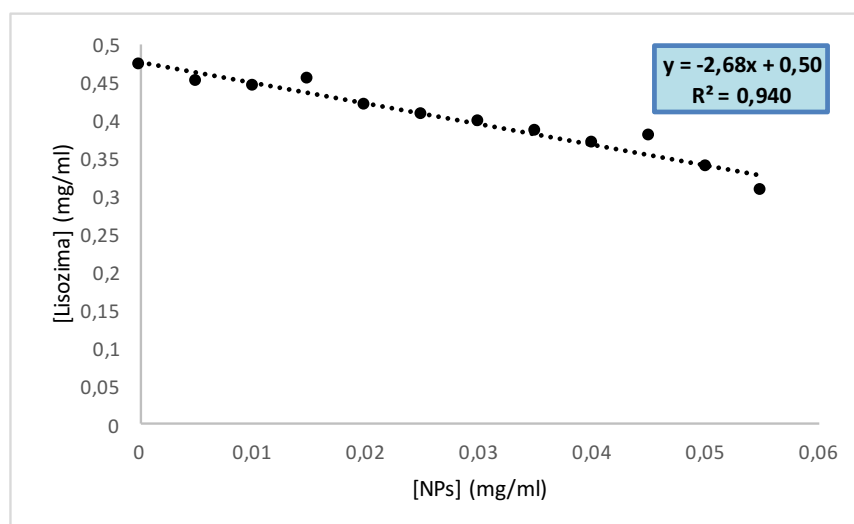


Figura 13. Determinación de la capacidad máxima de adsorción de las NP recubiertas con PAA tratadas con PEG de 400 g/mol.

Para conocer si un aumento de concentración de PEG 400 conlleva una agregación y, por tanto, un efecto en la estabilidad coloidal, se realiza un experimento con cantidades crecientes de éste, en presencia de 100 mM de NaCl, condiciones en las cuales las NP tienden a agregar debido al apantallamiento de las cargas que presenta (Fig.14). En esta gráfica se representa la densidad óptica del sobrenadante tras haber incubado las nanopartículas en las condiciones

anteriormente indicadas (materiales y métodos) y ser sometidas a una fuerza magnética externa, frente al tiempo.

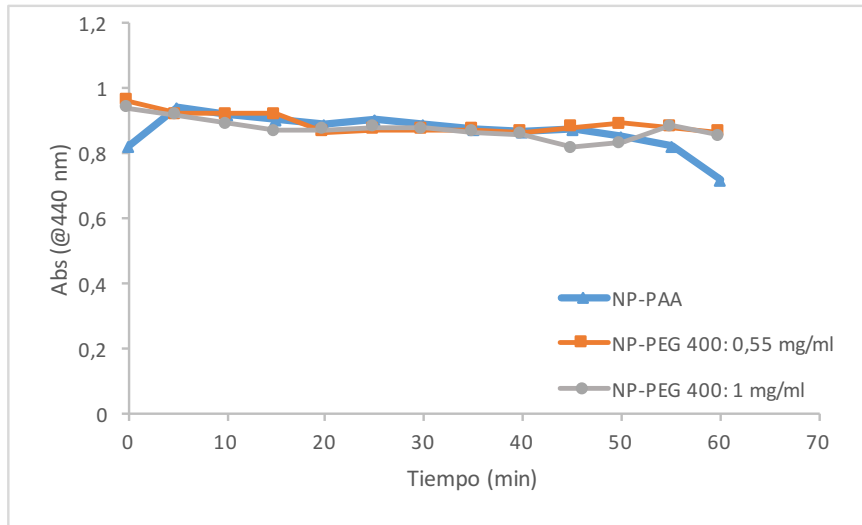


Figura 14. Variación de la estabilidad coloidal de las NP-PAA tratadas con PEG 400 mediante medida de dispersión óptica a 440 nm frente al tiempo.

Tras una hora de incubación, se observa que la cantidad de PEG no afecta significativamente a la estabilidad coloidal de las nanopartículas, recuperando aproximadamente el 80% de las nanopartículas iniciales.

- PEG 4000 g/mol

Una vez tratadas las NP-PAA con PEG de 4000 obtenemos un tamaño de  $95,5 \pm 0,5$  nm y una carga de  $-22,6 \pm 1,1$  mV mediante medidas de DLS y PZ.

Tras hacer el ensayo con estas partículas obtenemos que la capacidad máxima de adsorción es de 2,27 mg/ml (Fig.15).



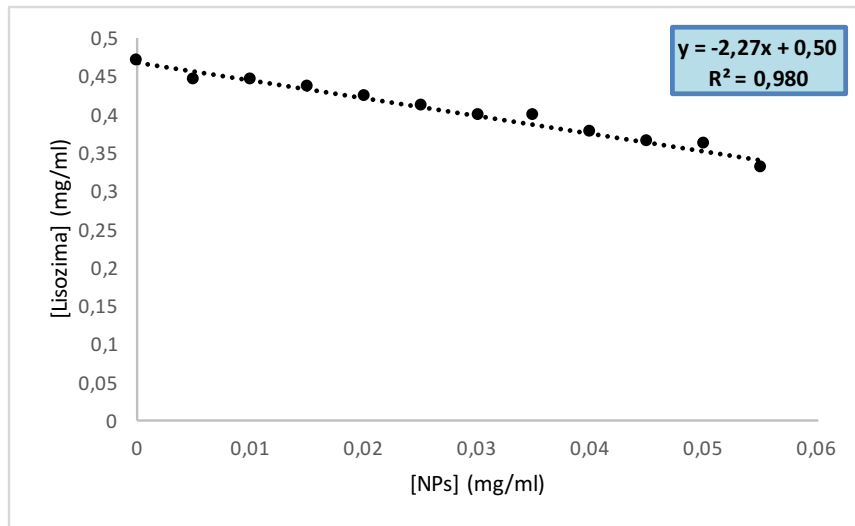


Figura 15. Determinación de la capacidad máxima de adsorción de las NP recubiertas con PAA tratadas con PEG de 4000 g/mol.

- PEG 35000 g/mol

Una vez tratadas las NP-PAA con PEG de 35000 obtenemos un tamaño de  $98,5 \pm 0,2$  nm, y una carga de  $-17,9 \pm 0,2$  mV.

Tras hacer el ensayo con estas partículas obtenemos que la capacidad máxima de adsorción es de 1,56 mg/ml (Fig.16).

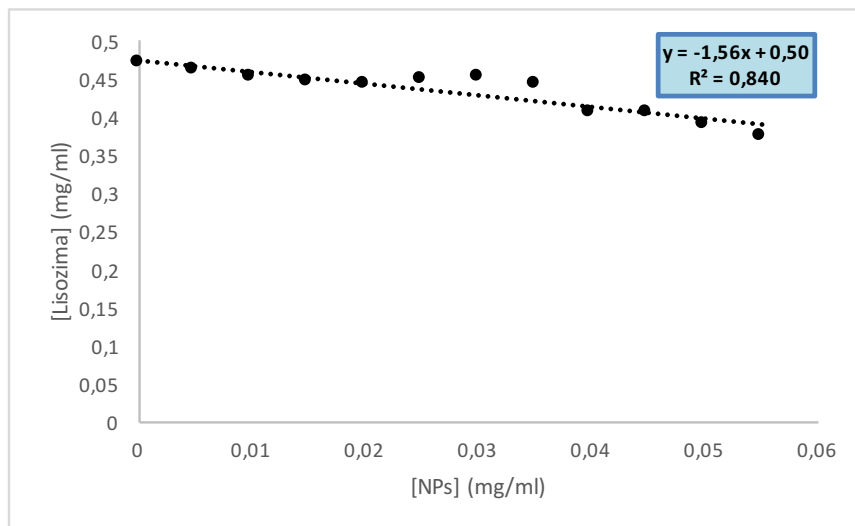


Figura 16. Determinación de la capacidad máxima de adsorción de las NP recubiertas con PAA tratadas con PEG de 35000 g/mol.

#### 4.3 Determinación de la $Q_{m\acute{a}x}$ de la lisozima adsorbida sobre las NP-PAA tratadas con PVP.

Tras tratar las NP-PAA con PVP obtenemos un tamaño de  $100,7 \pm 1,1$  nm, y una carga de  $-12,1 \pm 1,2$  mV mediante medidas de DLS y PZ.

Tras hacer el ensayo con estas partículas obtenemos que la capacidad máxima de adsorción es de 1,55 mg/ml (Fig.17).

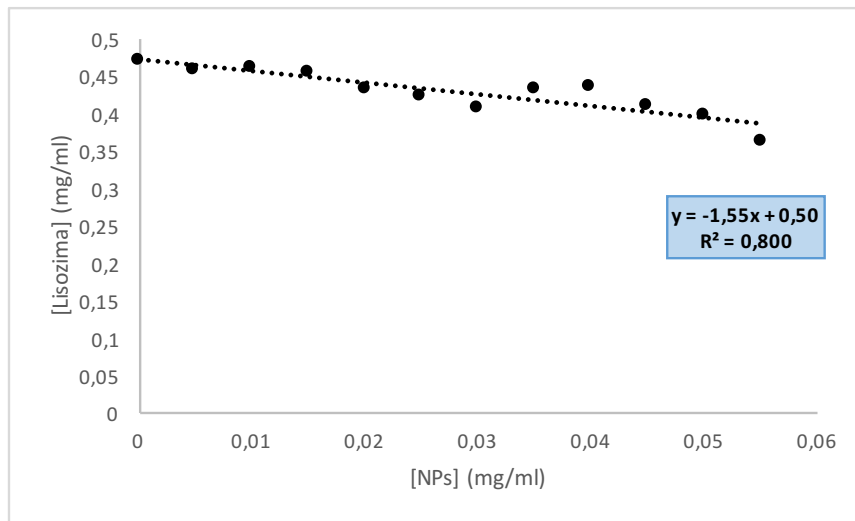


Figura 17. Determinación de la capacidad máxima de adsorción de las NP recubiertas con PAA tratadas con PVP.

#### 4.4 Determinación de la $Q_{m\acute{a}x}$ de la lisozima adsorbida sobre las NP-PAA tratadas con PVA.

Tras tratar las NP-PAA con PVA obtenemos un tamaño de  $101,7 \pm 0,5$  nm, y una carga de  $-18,8 \pm 1,3$  mV mediante medidas de DLS y PZ.

Tras hacer el ensayo con estas partículas obtenemos que la capacidad máxima de adsorción es de 5,13 mg/ml (Fig.18).

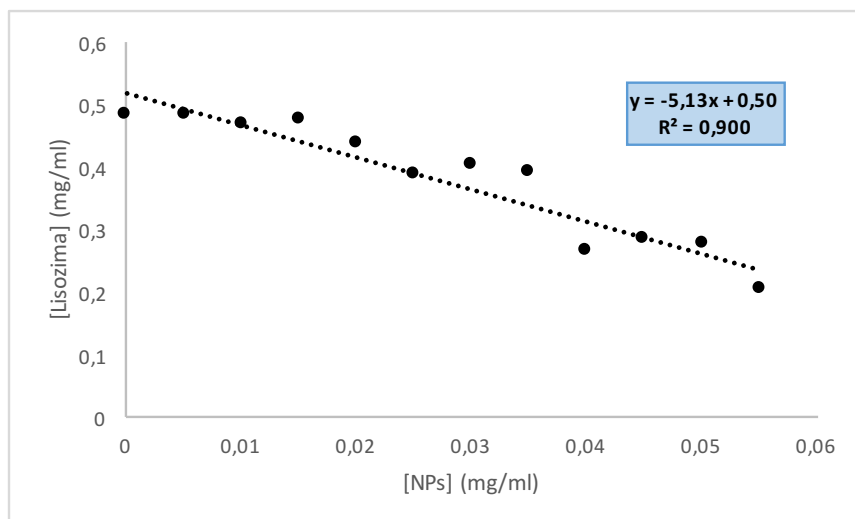


Figura 18. Determinación de la capacidad máxima de adsorción de las NP recubiertas con PAA tratadas con PVA.

## 5. DISCUSIÓN

La síntesis de nanopartículas de magnetita mediante el método de coprecipitación es un buen método para su obtención ya que el comportamiento que presentan es el esperado (magnetismo, baja estabilidad a pH fisiológico...).

Tras recubrir las nanopartículas de magnetita con un polielectrolito aniónico como el PAA, las nanopartículas aumentan su estabilidad coloidal (ver tamaño y carga en Tabla 1), siendo un buen candidato para estabilizarlas, ya que además de presentar alta densidad de carga, sus grupos carboxilato se unen de forma muy efectiva a la superficie de la nanopartícula dado su capacidad quelante hacia los metales, en este caso hacia el hierro.

Una vez caracterizadas las NP-PAA determinamos la capacidad de adsorción que tienen cuando en el medio en el que se encuentran hay presente una proteína, como es la lisozima, la cual a pH 7 posee carga neta positiva. Debido a la alta densidad de carga que el polielectrolito expone hacia el medio, esperamos que la capacidad de adsorción sea elevada, ya que el número de contactos con respecto a la partícula desnuda (inestable) ha aumentado. Tras realizar el estudio de su capacidad de adsorción mediante la aproximación de la isoterma de Langmuir, obtenemos una capacidad de adsorción de 2,10 mg Lzm/mg NP-PAA, lo que nos indica que la NP-PAA es capaz de adsorber el doble de su masa.

Sintetizar unas nanopartículas con alta capacidad de adsorción, puede ser contradictorio para el objetivo que planteamos, ya que si la capacidad de adsorción es elevada, el fenómeno de opsonización se verá favorecido, pero a su vez, permitiría administrar una cantidad de

nanopartícula más reducida transportando la misma cantidad de fármaco, siempre y cuando hayamos sido capaces de reducir dicho fenómeno.

Para intentar reducirlo hacemos uso de polímeros neutros, de los cuales algunos de ellos ya han sido utilizados para recubrir NP de magnetita “desnudas” y se ha visto que reducen la opsonización (Owens et al., 2006).

Los polímeros elegidos para tratar nuestras partículas recubiertas de PAA e intentar reducir la opsonización han sido; polietilenglicol (PEG) de distinto peso molecular (400,4000 y 35000 g/mol), polivinil alcohol (PVA), y polivinilpirrolidona (PVP). La caracterización obtenida mediante DLS de las diferentes NP-PAA tratadas con diferentes polímeros neutros revelan los siguientes resultados (Tabla 1).

Muestra	Tamaño (nm)	Potencial Z (mV)
<b>NP-PAA (Control)</b>	92,3 ± 0,9	-17,0 ± 1,9
<b>NP-PEG 400</b>	94,1 ± 1,9	-21,9 ± 1,6
<b>NP-PEG 4000</b>	95,5 ± 0,5	-22,6 ± 1,1
<b>NP-PEG 35000</b>	98,5 ± 0,20	-17,9 ± 0,9
<b>NP-PVP</b>	100,7 ± 1,1	-12,1 ± 1,2
<b>NP-PVA</b>	101,7 ± 0,5	-18,8 ± 1,3

Tabla 1. Comparativa de tamaños y carga de NP-PAA y NP-PAA tratadas con distintos polímeros neutros.

Una posible consecuencia del recubrimiento de las nanopartículas magnéticas con polímeros es la alteración del tamaño y sus características (pérdida de la capacidad magnética, aumento del comportamiento coloidal, agregación...). Sin embargo, como se puede observar, el tamaño de las NP-PAA tratadas con los diferentes polímeros neutros se mantiene cercano a los 90-100 nm, pudiendo atribuir esta diferencia de tamaño al posible “recubrimiento” de las NP-PAA por parte de los polímeros neutros. Sin embargo, la carga de las NP-PAA tratadas, no parece tener una tendencia, siendo todas negativas, lo que parecería indicar que si el polímero neutro está “recubriendo” la partícula lo podría hacer de forma localizada sobre distintos puntos de la superficie, pero dejando expuestas la mayoría de sus cargas negativas.

Tomando como referencia el valor de  $Q_{m\acute{a}x}$  para las NP-PAA (2,10 mg Lzm/mg NP-PAA), y tratando estas NP-PAA con polímeros neutros veremos si cambia la capacidad de adsorción sobre la proteína indicando por tanto si el polímero es eficaz para disminuir el fenómeno de opsonización, o si por el contrario lo aumenta.

### 5.1 Caracterización de las NP-PAA tratadas con PEG de diferentes pesos moleculares.

En cuanto a su comportamiento en presencia de concentraciones altas de PEG 400, se puede observar que la estabilidad de la nanopartícula es prácticamente la misma que el control (NP-PAA). Por tanto, a 100 mM de NaCl, las NP-PAA tratadas con distintas cantidades de PEG 400 mantienen su estabilidad coloidal.

Para discutir sobre la capacidad de adsorción de cada NP-PAA tratadas con este polímero recogemos las  $Q_{m\acute{a}x}$  en una tabla (Tabla 2).

Muestra	$Q_{m\acute{a}x}$ (mg Lzm/mg NP-PAA)
<b>NP-PAA (Control)</b>	2,10
<b>NP-PEG 400</b>	2,68
<b>NP-PEG 4000</b>	2,27
<b>NP-PEG 35000</b>	1,56

Tabla 2. Comparativa de la capacidad de adsorción de Lzm para NP-PAA y NP-PAA tratadas con PEG de distinto peso molecular.

Los resultados obtenidos indicarían que el PEG de 400 g/mol parecería aumentar un 28 % la capacidad de adsorción de la nanopartícula, con lo cual no sería el mejor polímero para tratar la superficie, y evitar la opsonización. A medida que aumentamos el peso molecular del PEG vemos que la capacidad de adsorción con respecto al de menor peso molecular disminuye, siendo prácticamente la misma que las NP-PAA sin tratar cuando usamos el PEG de 4000, pero alrededor de un 26% menor con el uso de PEG de 35000. Esto podría deberse a que a medida que aumenta el número de monómeros de polímero la NP-PAA podría encontrarse más “solvatada” por estos, haciendo disminuir su capacidad de adsorber la lisozima.

Los resultados obtenidos tras realizar la caracterización de las NP-PAA tratadas con PEG de diferentes pesos moleculares parecerían indicar que el polímero que mayor efecto tendría

sobre la inhibición de la opsonización sería el PEG de 35000 g/mol. Esto debería estudiarse más a fondo utilizando cantidades mayores de PEG para confirmar si su presencia evita casi, o por completo, la adsorción de la Lzm.

## 5.2 Caracterización de las NP-PAA tratadas con otros polímeros neutros: PVP y PVA.

Empleando otros polímeros neutros como la PVP o el PVA, los resultados indican que la presencia de estos polímeros afecta de forma diferente a la  $Q_{\text{máx}}$  (Tabla 3).

Muestra	$Q_{\text{máx}}$ (mg Lzm/mg NP-PAA)
NP-PAA (Control)	2,10
NP-PVP	1,55
NP-PVA	5,13

Tabla 3. Comparativa de la capacidad de adsorción de Lzm para NP-PAA y NP-PAA tratadas con PVP y PVA.

En cuanto a los resultados obtenidos con la PVP, se obtienen valores semejantes a los obtenidos con el PEG de mayor peso molecular. Estos resultados indicarían que este tipo de polímero, inhibiría el fenómeno de opsonización alrededor de un 26%, por lo que sería otro candidato para hacer un estudio más exhaustivo empleando cantidades mayores de polímero y ver si la reducción de la capacidad de adsorción es casi total o prácticamente total.

Por otro lado los resultados obtenidos con el recubrimiento con PVA indican que la capacidad de adsorción aumenta un 144% con respecto a la NP-PAA, por lo que sería un polímero inadecuado para el objetivo que se ha planteado en este trabajo. Por otro lado, se abriría la posibilidad de utilizar las NP-PAA tratadas para otras aplicaciones donde se requiera de una mayor capacidad de adsorción.

## 6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

### CONCLUSIONES:

La síntesis de nanopartículas de magnetita mediante el método de coprecipitación y su posterior recubrimiento con PAA en las condiciones anteriormente descritas, resulta ser una buena estrategia para obtener nanopartículas con una elevada estabilidad coloidal y un diámetro de alrededor de 100 nm.

Las NP-PAA demuestran tener una elevada capacidad de adsorción, siendo capaces de adsorber alrededor de 2 g de lisozima por gramo de magnetita.

Las NP-PAA tratadas con distintos polímeros neutros (PEG, PVA, PVP) no parecen afectar al diámetro hidrodinámico y carga de la nanopartícula y, como consecuencia, presentan una estabilidad coloidal similar a la que es característica de las nanopartículas no tratadas.

La presencia en la disolución de polímeros neutros como el PEG 400 o el PVA parece aumentar la capacidad de adsorción de las nanopartículas recubiertas con PAA, por lo que tienen un efecto contrario al buscado (inhibición parcial de la adsorción proteica) aumentando por tanto el fenómeno de opsonización.

Por su parte, la presencia de PEG 4000 parece tener un efecto neutro en lo que se refiere a la capacidad de adsorción de las nanopartículas recubiertas, NP-PAA.

Por último, tanto el PEG 35000 como el PVP demuestran tener un cierto efecto inhibitorio de la adsorción de lisozima a las nanopartículas recubiertas, reduciendo alrededor de un 26 % la cantidad de proteína adsorbida por lo que ambos polímeros neutros podrían ser dos candidatos para reducir el fenómeno de opsonización.

### **PROYECCIÓN FUTURA:**

Tras la realización y conclusión de este trabajo, surge un abanico de posibles proyecciones futuras a abordar.

- Encontramos resultados positivos tanto con la PVP como con PEG de 35000 cuando trabajamos en relaciones 1:10 en masa de NP-PAA:polímero neutro. Podríamos plantear sistemas en el que la relación de polímero/nanopartícula fuese mayor a la estudiada en este trabajo, para confirmar que se puede reducir aún más la capacidad de adsorción de la nanopartícula tratada.
- Dado que con el PEG se han obtenido resultados positivos, la búsqueda y caracterización del PEG de peso molecular óptimo podría ser un futuro abordaje para nuevos estudios. En este trabajo se ha estudiado el PEG de tres pesos moleculares diferentes (400, 4000 y 35000 g/mol, respectivamente) obteniendo resultados con sutiles diferencias, siendo el PEG 35000 el recubrimiento con el que se obtienen resultados más prometedores. Por tanto, estudios más centrados en este tipo de PEG podrían ser claves a la hora de obtener un recubrimiento óptimo de NP-PAA con fines

biomédicos. También, tomando como base la idoneidad del PEG, se podrían realizar estudios con copolímeros de PEG como los polisorbatos, los poloxámeros o las poloxaminas.

- Otra posibilidad que surge tras la finalización de este trabajo es la realización de estudios similares empleando otro tipo de polímeros neutros como agentes de recubrimiento encontrados en la literatura tales como el ficol, la poliácridamida o diversos polisacáridos. Un ejemplo queda reflejado en la review realizada por Cole et al (Cole et al., 2011) (Fig.19).

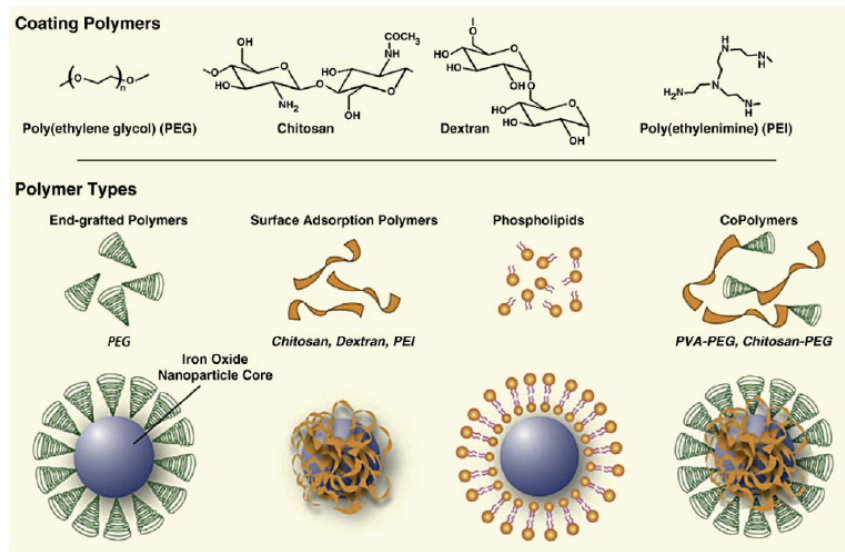


Figura 19. Posibles recubrimientos poliméricos de nanopartículas magnéticas. (Cole et al., 2011)

- Otra propuesta interesante es la modificación de la superficie de la nanopartícula empleando otro tipo de estrategia. Los estudios realizados por Veisheh et al (Veisheh et al., 2010) recopilan las principales estrategias para modificar la superficie de las NP-PAA incluyendo la conjugación directa o mediada por un “linker” así como la modificación de la superficie mediante interacciones físicas como las hidrofóbicas, electrostáticas o de afinidad por ligando. Por tanto, siguiendo el mismo protocolo realizado en este trabajo o empleando otra técnica para modificar las nanopartículas, se pueden ampliar los resultados y las posibilidades de obtener un recubrimiento acorde al objetivo planteado.



Es de destacar la posible futura aplicabilidad de las NP-PAA tratadas con PVA, ya que podría ser muy útil para aplicaciones donde la capacidad de adsorción de proteína, partiendo de la misma NP-PAA fuesen mayores.

Por último, los resultados obtenidos en la realización de este trabajo refuerzan la necesidad de realizar estudios posteriores con el fin de obtener resultados totalmente acordes al objetivo previamente planteado.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Barrera, C., Herrera, A.P. & Rinaldi, C. (2008). Colloidal dispersions of monodisperse magnetite nanoparticles modified with poly(ethylene glycol). *Journal of Colloid and Interface Science* 329, 107-113.

Bekaroğlu, M.D., Işçi, Y. & Işçi, S. (2017). Colloidal properties and *in vitro* evaluation of Hydroxy ethyl cellulose coated iron oxide particles for targeted drug delivery. *Materials Science and Engineering C* 78, 847-853.

Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential- What they are and what they are not?. *Journal of Controlled Release* 235, 337-351.

Bragg, W.H. (1915). The structure of magnetite and spinels. *Nature* 95, 561.

Chiellini, E., Corti, A., D'Antone, S. & Solaro, R. (2003). Biodegradation of poly (vinyl alcohol) based materials. *Progress in Polymer Science* 28,963-1014.

Cole, A.J., Yang, V.C. & David, A.E.(2011). Cancer Theranostics: the rise of targeted magnetic nanoparticles. *Trends Biotechnol.* Volume 29, 323-332.

DLS technical note, Malvern Instruments; Dynamic Light Scattering: An introduction in 30 minutes.

DLS technical note, Malvern Instruments; Zeta Potential: An introduction in 30 minutes.

Fleming, A. (1922). On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B* 93, 306-317.

Gref, R., Domb, A., Quellec, P., Blunk, T., Müller, R.H., Verbavatz, J.M. & Langer, R. (1995). The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilizes nanospheres. *Advanced Drug Delivery Reviews* 16, 215-233.

- Gupta, A.K. & Wells, S. (2004). Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies. *IEEE Trans Nanobioscience* 3, 66-73.
- Gupta, A.K., & Gupta, M. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 26, 3995-4021.
- Haaf, F., Sanner, A. & Straub, F. (1985). Polymers of N-vinyl pyrrolidone: synthesis, characterization and uses. *Polymer Journal* 7, 143-152.
- Hajdú, A., Szekeres, M., Tóth, I.Y., Bauer, R.T., Mihály, J., Zupkó, I. & Tombácz, E. (2012). Enhanced stability of polyacrylate-coated magnetite nanoparticles in biorrelevant media. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 94, 242-249.
- Harris, JM. & Chess, RB. (2003). Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature Reviews Drug Discovery* 2, 214-221.
- Hassan, CM. & Peppas, N.A. (2000). Structure and Applications of Poly( vinyl alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freezing/thawing Methods. *Advances in Polymer Science* 153,38-65.
- Huang, J., Bu, L., Xie, J., Chen, K., Cheng, Z., Li, X. & Chen, X. (2010). Effects of nanoparticle size on celular uptake and liver MRI with PVP-coated iron oxide nanoparticles. *ACS Nano* 4, 7151-7160.
- Illés, E., Tombácz, E., Szekeres, M., Tóth, I.Y, Szabó, A. & Iván, B.(2015). Novel carboxylated PEG-coating on magnetite nanoparticles designed for biomedical applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 380, 132-139.
- Jokerst, J.V., Lobovkina, T., Zare, R.N. & Gambhir, S.S. (2011). Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine* 6, 715-728.
- Jollès, J. & Jollès, P. (1969). La structure chimique primaire du lysozyme du lait de Femme: établissement d'une formule développée provisoire. *Helvetica Chimica Acta* 52, 2671-2675.
- Langmuir, I. (1916). The constitution and fundamental proprieties of solids and liquids. Part i. Solids. *Journal of the American Chemical Society* 38, 2221-2295.

Laurent, S, Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Elst., L.V. & Muller, R.N. (2008). Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chemical Reviews* 108, 2064-2110.

Leslie-Pelecky, D.L. (1996). Magnetic Properties of Nanostructured Materials. *Chemistry of Materials* 8, 1770-1783.

Li, J. & Kao, J. (2003). Synthesis of Polyethylene Glycol (PEG) Derivatives and PEGylated-Peptide Biopolymer Conjugates. *Biomacromolecules* 4, 1055-1067.

Massart, R. (1981). The results of work on the preparation of aqueous magnetic liquids without using organic stabilizing agent is presented. *IEEE Transactions on Magnetics* 17, 1247-1248.

Martins, F.G., Andrade, J.F., Pimienta, A.C., Lourenço, L.M., Castro, J.R.M. & Balbo, V.R. (2005). Spectrophotometric study of iron oxidation in the iron (II)/thiocyanate/acetone system and some analytical applications. *Eclética Química* 300, 63-71.

McClelland, D.B. & van Furth, R. (1975). In vitro synthesis of lysozyme by human and mouse tissues and leucocytes. *Immunology* 28, 1099-1114.

Mendehall, G.D., Geng, Y. & Hwang, J. (1996). Optimization of Long-Term Stability of Magnetic Fluids from Magnetite and Synthetic Polyelectrolytes. *Journal of Colloid and Interface Science* 184, 519-526.

Moghimi, S.M., Hunter, A.C. & Murray, J.C. (2001). Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice. *Pharmacological Reviews* 53, 283-318.

Muppalaneni, S. & Omidian, H. (2013). Polyvinyl Alcohol in Medicine and Pharmacy: A Perspective. *Journal of Developing Drugs* 2,2-3.

Nadeem, M., Ahmad, M., Akhtar, M.S., Shaari, A., Riaz, S., Naseem, S., Masood, M. & Saeed, M.A. (2016). Magnetic Properties of Polyvinyl Alcohol and Doxorubicine Loaded Iron Oxide Nanoparticles for Anticancer Drug Delivery Applications. *Plos One* 11, 1-12.

Niedzielski, P., Zielinska-Dawidziak, M., Kozak, L., Kowalewski, P., Szlachetka, B., Zalicka, S. & Wachowia, W.(2014). Determination of Iron Species in Samples of Iron-Fortified Food. *Food Analytical Methods* 7, 2023-2032.

Nishikawa, S (1915). Structure of some crystal of the spinel group. *Proceedings of the Mathematical and Physical Society of Tokyo* 8, 199-209.

Okube, M. & Sasaki, S. (2014). Site-specific electronic structures of ferrimagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> measured by resonant X-ray magnetic scattering. *Journal of Applied Crystallography* 47, 1387-1394.

Owens, D.E. & Peppas, N.A. (2006). Oponization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 307, 93-102.

Pisciotti, M.L, Lima, E., Mansilla, M., Tognoli, V.E., Troiani, H.E., Pasa, A.A., Creczynski-Pasa, T.B., Silva, A.H., Gurman, P., Colombo, L., Goya, G.F., Lamagna, A. & Zysler, R.D. (2014). *In vitro* and *in vivo* experiments with iron oxide nanoparticles functionalized with DEXTRAN or polyethylene glycol for medical applications: Magnetic targeting. *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials* 102, 860-868.

Qiu, X-P. & Winnik, F. (2000). Preparation and characterization of PVA coated magnetic nanoparticles. *Chinese Journal of Polymer Science* 18, 535-539.

Senyi, A., Widder, K. & Czerlinski, G. (1978). Magnetic guidance of drug carrying microspheres. *Journal of Applied Physics* 49, 3578-3583.

Swaminathan, R., Ravi, V.K., Kumar, S., Kumar, M.V. & Chandra, N.(2011). Lysozyme: A model protein for amyloid research. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* 84, 63-111.

Teja, A.S., Koh, P.Y. (2009). Synthesis, proprieties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials* 55, 22-45.

Tombácz, E., Maizik, A., Horvát., Z.S. & Illés, E. (2006). Magnetite in aqueous medium: Coating its surface and surface coated with it. *Romanian Reports in Physics* 58, 281-286.

Tong R., Wang, Y., Yang, G., Ma, A., Sun, K., Yang, H. & Wang, J. (2015). Study of Preparation and Propierties on Polymer-modified Magnetic Nanoparticles. *South African Journal of Chemistry* 68, 99-104.

Tu, Z., Zhang, B., Yang, G., Wang, M., Zhao, F., Sheng, D. & Wang, J. (2013). Synthesis of poly(ethylene glycol) and poly(vinyl pyrrolidone) co-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticle as a pH-sensitive release drug carrier. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects* 436, 854-861.

Veisheh, O., Gunn, J. & Zhang, M. (2010). Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62, 284-304.

Widder, K.J., Senyel, A.E. & Scarpelli, G.D. (1978). Magnetic microspheres: a model system of specific drug delivery *in vivo*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 158, 141-146.

Widder, K.J., Morris, R.M., Poore, G.A., Howard, D.P. & Senyei, A.E. (1983). Selective targeting of magnetic albumin microspheres containing low-dose doxorubicin: Total remission in Yoshida sarcoma-bearing rats. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* 19, 135-139.

Yang, J., Zou, P., Yang, L., Cao, J., Sun, Y., Han, D., Yang, S., Wang, Z., Chen, G., Wang, B. & Kong, X. (2014). A comprehensive study on the synthesis and paramagnetic properties of PEG-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Applied Surface Science* 303, 425-432.

Zhang, Y., Kohler, N. & Zhang, M.(2002). Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials* 23, 1553-1561.