



GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Facultad de Ciencias Experimentales

Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente

Área de Química-Física

TRABAJO DE FIN DE GRADO

***Nanopartículas funcionalizadas como soporte para el
mantenimiento de la actividad de biomoléculas durante su
almacenamiento***

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

CURSO 2024-2025

Autora: María Blasco Andreu

Tutor: Felipe Hornos Adán

Co-tutor: Francisco Javier Gómez Pérez

RESUMEN

El uso de enzimas en aplicaciones biotecnológicas es cada vez mayor, lo que implica tanto el almacenamiento de dichas enzimas, como la preservación de su actividad biológica. La catalasa, cataliza reacciones de oxidación para proteger a las células de especies reactivas de oxígeno (ROS), oxidación de colorantes, entre otros. Esta enzima es inestable en disolución, lo cual conlleva a su agregación y por tanto pérdida de actividad, lo que se traduce en una gran pérdida económica. Por lo anteriormente comentado, se pretende estudiar el uso de nanopartículas magnéticas de magnetita (Fe_3O_4) recubiertas con polietilenimina (PEI) para adsorber y estabilizar la catalasa. Para ello se evaluaron diferentes estrategias, como el recubrimiento mediante la técnica de recubrimiento capa a capa con polielectrolitos como alginato, PAA y PEI, aunque ninguno logró formar una capa protectora estable, siendo el enzima liberado de la nanopartícula, y por lo tanto, no protegida. A pesar de que el enzima no ha podido ser encapsulado, el hecho de que se encuentre adsorbido sobre la nanopartícula, o en contacto directo con PEI, hace que se preserve la actividad con respecto a la catalasa libre en disolución. Esta metodología muestra un elevado potencial para el desarrollo de estrategias que permitan el almacenamiento a largo plazo de biomoléculas lábiles. Mostrando el potencial de estas estructuras para aplicaciones orientadas a la conservación de proteínas activas.

ABSTRACT

The use of enzymes in biotechnological applications is increasingly widespread, which involves both the storage of these enzymes and the preservation of their biological activity. Catalase catalyzes oxidation reactions to protect cells from reactive oxygen species (ROS), as well as the oxidation of dyes, among other functions. This enzyme is unstable in solution, which leads to aggregation and, consequently, loss of activity—resulting in significant economic losses. For these reasons, this study aims to investigate the use of magnetite (Fe_3O_4) magnetic nanoparticles coated with polyethylenimine (PEI) to adsorb and stabilize catalase. Different strategies were evaluated, including *layer-by-layer* (LbL) coating with polyelectrolytes such as alginate, PAA, and PEI. However, none of them succeeded in forming a stable protective layer, and the enzyme was released from the nanoparticle, leaving it unprotected. Although full encapsulation of the enzyme was not achieved, its adsorption onto the nanoparticle surface or direct interaction with PEI helped preserve its activity compared to free catalase in solution. This methodology demonstrates strong potential for developing strategies aimed at the long-term storage of labile biomolecules, highlighting the value of these structures for applications focused on the preservation of active proteins.

Palabras clave: nanopartícula, catalasa, polielectrolito, actividad enzimática, protección, almacenamiento.

ÍNDICE

1. Introducción.....	4
1.1. Nanopartículas.....	4
1.2. Adsorción de proteínas	6
1.3. Polielectrolitos.....	6
1.4. Catalasa	8
1.5. Disociación y estabilidad de proteínas multiméricas.....	9
2. Antecedentes y Objetivos	10
2.1. Antecedentes	10
2.2. Objetivos	10
3. Materiales y métodos	11
3.1. Síntesis de nanopartículas de Fe ₃ O ₄	11
3.2. Caracterización de nanopartículas	11
3.3. Catalasa	13
3.4. Polielectrolitos.....	15
3.5. Metodología de trabajo.....	16
4. Resultados y discusión.....	19
4.1. Caracterización de nanopartículas de Fe ₃ O ₄ @PEI	19
4.2. Protección por recubrimiento con polielectrolito mediante recubrimiento capa a capa	24
4.3. Actividad de la catalasa	27
5. Conclusiones	37
6. Proyecciones futuras.....	37
7. Bibliografía.....	39

1. Introducción

1.1. Nanopartículas

1.1.1. Concepto de nanopartícula

Las nanopartículas han existido en la naturaleza desde hace mucho tiempo, generadas por procesos como la erosión, la actividad volcánica y la acción de ciertos microorganismos. Su uso se remonta a la antigüedad, cuando se empleaban para reforzar cerámicas y como colorantes metálicos en vidrios y esmaltes. En el siglo XIX, Michael Faraday realizó estudios pioneros sobre la interacción de la luz con nanopartículas metálicas, dando inicio a la química coloidal y la nanotecnología [1]. Pero fue en el siglo XX cuando el premio Nobel de Física Richard Feynman en 1959 introdujo el concepto de nanotecnología [2]. Años después, en 1974, dicho término lo acuñó Norio Taniguchi [3]. En las últimas décadas, la nanobiotecnología ha avanzado rápidamente gracias a las propiedades físico-químicas únicas de las nanopartículas, que como su nombre indica, son partículas que se encuentran en la escala nanométrica y poseen un tamaño entre 1 y 100 nm [4]. Estas se distinguen por su alta relación superficie-volumen, ya que el tamaño de la partícula es inversamente proporcional a la energía libre superficial, es decir, al disminuir el tamaño de partícula, aumenta dicha energía, lo que mejora su reactividad química [5], así como sus propiedades térmicas y biológicas [1].

En cuanto a la síntesis de nanopartículas, se suelen sintetizar en solventes acuosos u orgánicos, dependiendo de su hidrofobicidad. A menudo se emplean surfactantes que estabilizan las nanopartículas y controlan su crecimiento. Algunos ejemplos son la síntesis por coprecipitación y descomposición térmica en el caso de nanopartículas magnéticas; la reducción química con citrato, comúnmente conocida como el método de Turkevich para producir nanopartículas de oro; y el método de inyección en caliente para puntos cuánticos semiconductores [4], [6].

En cuanto a su clasificación, las nanopartículas pueden clasificarse según varios criterios. Según su origen, pueden ser naturales, incidentales o diseñadas; por sus dimensiones, pueden ser unidimensionales, bidimensionales o tridimensionales; y según su composición química, existen nanopartículas de carbono (como fullerenos y nanotubos), nanopartículas de óxidos metálicos (como ZnO, SiO₂ o Fe₂O₃), puntos cuánticos (quantum dots), nanopartículas metálicas (como oro, plata o cobre) y nanopolímeros [4], [7].

1.1.2. Nanopartículas magnéticas

Las nanopartículas magnéticas se caracterizan principalmente por su capacidad de ser atraídas mediante un campo magnético externo. En los últimos años, su síntesis se ha desarrollado intensamente debido al creciente interés científico y a sus múltiples aplicaciones tecnológicas, como el transporte dirigido de fármacos, su uso como agentes de contraste en resonancia magnética (RM) o

para hipertermia magnética. Este interés también se debe a que son fáciles de producir, estables física y químicamente, biocompatibles y no tóxicas para el medio ambiente [8].

Se han llevado a cabo numerosas investigaciones con distintos tipos de óxidos de hierro en el campo de las nanopartículas magnéticas, debido a sus diversas propiedades y aplicaciones. Entre ellos destaca la hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), que es más estable en condiciones ambientales, actúa como semiconductor tipo n y se utiliza en catálisis, pigmentos y sensores de gases. La magnetita (Fe_3O_4) presenta una estructura espinela cúbica, en la que los iones Fe^{2+} y Fe^{3+} se distribuyen en sitios octaédricos y tetraédricos; esta forma se emplea principalmente en resonancia magnética (MR) y en sistemas de administración de fármacos. Por último, la maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), esta es una forma oxidada de la magnetita y también se utiliza en aplicaciones biomédicas [8], [9].

Para la síntesis de nanopartículas magnéticas existen diferentes métodos: método de coprecipitación, descomposición térmica, síntesis hidrotermal/solvotermal, sonólisis o métodos ultrasónicos, síntesis por microemulsión, síntesis biológica. En la preparación y almacenamiento de nanopartículas magnéticas, la estabilidad es esencial. Las nanopartículas de óxido de hierro (Fe_3O_4) tienen superficies hidrofílicas con una alta relación superficie-volumen, lo que provoca que las nanopartículas pequeñas se agreguen y formen grupos de mayor tamaño, para reducir la energía superficial [8]. Este comportamiento descrito está relacionado con el punto de carga cero (PZC) de las nanopartículas, este se encuentra alrededor de un pH de 6,7.

A valores de pH inferiores al PZC, la superficie es positiva y cuando el pH está por encima la carga es negativa. Por tanto, tanto a pH bajos como altos, la superficie de las nanopartículas de magnetita estará fuertemente cargada, ya sea positiva o negativamente. Por tanto a pHs alejados del PZC la partículas tienen una elevada estabilidad coloidal, siendo la repulsión electrostática suficiente para vencer la atracción van der Waals. Esta repulsión impide el colapso hidrofóbico, la agregación y, en consecuencia, la precipitación; favoreciendo así su estabilidad coloidal. En cambio, cuando el pH de la solución es próximo al punto de carga cero, la carga superficial de las partículas disminuye, y con ello también la repulsión electrostática. Esta reducción lleva por tanto a la aglomeración y la floculación [10].

Además, estas nanopartículas son propensas a la oxidación en presencia del oxígeno atmosférico por su alta actividad química [8]. Por estos motivos, es fundamental desarrollar una estrategia de protección que permita estabilizarlas químicamente y así mejorar su funcionalidad e interacción con biomoléculas. Este proceso consiste en recubrir las nanopartículas con compuestos orgánicos, como polímeros biocompatibles como polietilenglicol (PEG), dextrano, polietilenimina (PEI) y alginato (ALG) o con surfactantes como el oleato de sodio para mejorar su dispersión en medios líquidos [11], [12]. Por otra parte, también existen recubrimientos inorgánicos, como el sílice (SiO_2), los metales (Ag, Au) y el carbono [8], [9].

1.2. Adsorción de proteínas

1.2.1. Principios fisicoquímicos

Las proteínas tienden a acumularse sobre superficies, lo que puede ser tanto beneficioso como problemático. En biotecnología, este fenómeno se aprovecha para la purificación y separación de proteínas, así como para el almacenamiento o transporte de estas en diversas aplicaciones tanto biomédicas como industriales [13].

Las proteínas son macromoléculas anfífilas, por lo que su adsorción está determinada por fuerzas intermoleculares como las fuerzas de van der Waals, las interacciones hidrofóbicas, las interacciones de Coulomb (electrostáticas) y las restricciones de entropía y movilidad [13]. Una de las variables clave que influye en la adsorción de las proteínas es su punto isoeléctrico (pI), definido como el pH en el cual la proteína presenta una carga neta cero y, por tanto, se detiene su movilidad electroforética. Este valor depende principalmente de los pKa de los grupos ionizables de los aminoácidos cargados. Cuando el pH de la solución es superior al pI, la proteína se encuentra cargada negativamente; si el pH es inferior, su carga será positiva. Por tanto, controlar el pH del medio y conocer la carga neta de la proteína es fundamental para favorecer su adsorción, ya que esta se produce cuando la superficie y la proteína tienen cargas opuestas [14]. Uno de los mayores desafíos es predecir si las proteínas cambiarán su conformación tras adsorberse y, con ello, su actividad [13].

1.2.2. Mecanismos de interacción con superficies

Existen diversos factores que influyen en la adsorción de proteínas. Estos pueden ser: parámetros externos, como la temperatura, el pH, la fuerza iónica o la composición del medio; propiedades de la propia proteína, como el tamaño, la estabilidad estructural y la composición. Por ejemplo, proteínas como la lisozima tienen menor tendencia a cambiar su conformación tras adsorberse, mientras que proteínas como la catalasa pueden reorientarse y cambiar su conformación después de producirse la adsorción. Por último, propiedades de la superficie, como la energía superficial, la carga y la polaridad [15] juegan un importante papel en los procesos de adsorción. Aún no existe una teoría unificada sobre la adsorción de proteínas, pero se han desarrollado diversos modelos específicos. Estos son: modelos de interacciones electrostáticas (ecuación de Poisson-Boltzmann), modelos de isothermas de adsorción como los de Temkin y Freundlich [15] y modelos de adsorción secuencial aleatoria y modelos cinéticos de Langmuir [13].

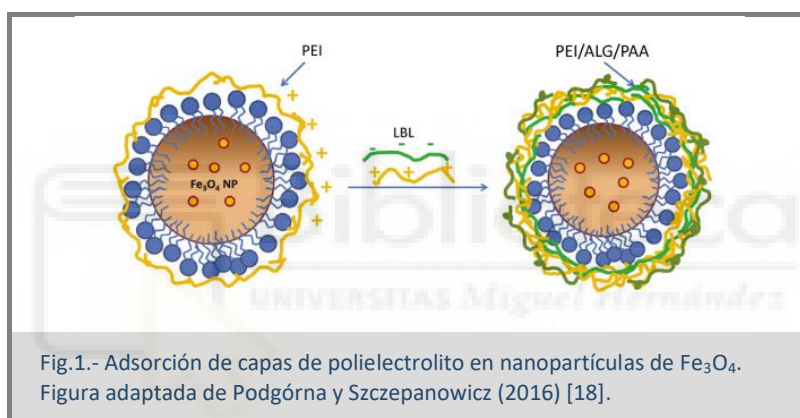
1.3. Polielectrolitos

1.3.1. Concepto general

Los polielectrolitos son polímeros cuya unidad repetitiva contiene grupos funcionales ionizables, lo que les permite disociarse en disoluciones acuosas. Se dividen en policationes, que presentan carga

positiva (como la polietilenimina (pei) o el quitosano), y en polianiones, que presentan carga negativa (como el alginato de sodio o el ácido hialurónico). Tanto su carga como propiedades clave como la adsorción, la interacción electrostática, la conformación estructural y la estabilidad coloidal, dependen del pH del medio en el que se encuentren [16].

Los polielectrolitos fuertes mantienen una carga constante en un amplio rango de pH, como por ejemplo el poliestireno sulfonato de sodio (PSS) o el poli(dialildimetilamonio) (PDADMAC). En cambio, los polielectrolitos débiles presentan una carga que depende del pH del medio. Entre estos se encuentran el alginato de sodio (ALG), la polietilenimina (PEI) o el poliacrilato de sodio (PAA) [17]. Algunas de las aplicaciones más relevantes de los polielectrolitos incluyen la encapsulación de fármacos, la ingeniería de tejidos y los sistemas sensibles a estímulos. Además, los polielectrolitos también se aplican en recubrimientos antimicrobianos, incorporando péptidos en sus películas, con el objetivo de inhibir el crecimiento microbiano en superficies biomédicas o alimentarias [17].



Los polielectrolitos son capaces de adsorberse a la superficie de la nanopartícula y dotarla de una gran densidad de carga superficial, lo que, además de hacerla muy funcional, le conferirle una gran estabilidad [18]. Además, pueden autoensamblarse mediante la técnica recubrimiento capa a capa (conocida como recubrimiento LbL se sus siglan en inglés *layer-by-layer*) (Fig. 1) la cual consiste en la adsorción alterna de polianiones y policationes formando películas de superficies cargadas, donde la estabilidad depende de la permeabilidad regulada por fuerza iónica y el número de capas [16], [17].

1.3.2. Tipos de polielectrolitos

Dos de los polielectrolitos más comunes que se emplean para el recubrimiento de nanopartículas son el alginato de sodio (ALG) y la polietilenimina (PEI), cada uno presenta cargas opuestas y características diferentes a pesar de tener la misma función en cuanto a dar estabilidad a la nanopartícula:

Alginato (ALG): El alginato es un polielectrolito biocompatible, biodegradable y bioadhesivo, lo que lo hace adecuado para aplicaciones farmacéuticas y biomédicas. Es de origen natural, se extrae principalmente de algas pardas (*Phaeophyceae*) como *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria*

japonica y *Macrocystis pyrifera*, así como de algunas bacterias del género *Pseudomonas* y *Azotobacter* [19]. Suele utilizarse en forma de alginato de sodio (soluble) o alginato de calcio (insoluble), ambas empleadas en el desarrollo de biomateriales [20].

Polietilenimina (PEI): La polietilenimina (PEI) es un polímero catiónico hidrófilo altamente cargado. Posee una alta capacidad de condensación y estabilización de ácidos nucleicos, formando estructuras conocidas como poliplexos. Existen dos estructuras químicas principales, PEI ramificado (BPEI), que contiene aminas primarias, secundarias y terciarias y PEI lineal (LPEI), que posee solo aminas secundarias [21]. Su toxicidad es baja, observándose efectos adversos solo a concentraciones muy superiores a las requeridas para transfección óptima [22].

1.4. Catalasa

1.4.1. Concepto general

La catalasa es una enzima compuesta por cuatro subunidades que coordinan un único grupo hemo esencial para su actividad enzimática [23]. Está presente en una amplia variedad de organismos procariotas y eucariotas, incluyendo organismos aeróbicos como bacterias, células vegetales y animales. En los seres humanos, se encuentra principalmente en los eritrocitos, así como en células del riñón y del hígado [24].

La catalasa se caracteriza por ser una enzima antioxidante encargada de descomponer el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (un subproducto que se genera constantemente en nuestras células durante diversos procesos metabólicos) en agua (H_2O) y oxígeno molecular (O_2) [23], [24]. De este modo, evita el daño celular provocado por el estrés oxidativo de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Esta reacción se lleva a cabo de la siguiente forma: $Catalasa + H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$ [25] El sitio activo de cada monómero incluye una región de unión a NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) y otra de unión a hierro (III), que es responsable de la actividad catalítica del enzima [26]. Además, en presencia de patógenos, algunos microorganismos son capaces de sintetizar catalasa para defenderse contra el sistema inmune, que utiliza H_2O_2 como mecanismo de ataque [27].

La actividad de la catalasa es de gran relevancia, ya que se ha relacionado con enfermedades como el cáncer, la diabetes, la arterosclerosis, las cataratas y el envejecimiento [24], [28]. Además, en microbiología, se emplea como prueba para diferenciar bacterias aeróbicas de anaerobios estrictos, ya que estos últimos carecen de catalasa [24].

1.4.2. Aplicaciones en la industria

En cuanto a sus aplicaciones, como se ha mencionado anteriormente, la catalasa actúa como un antioxidante natural, lo que permite estudiar el papel de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en procesos como la expresión génica y la apoptosis. También se ha utilizado para proteger frente al daño oxidativo de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos [25]. A nivel industrial, la catalasa tiene múltiples

usos, entre ellos: la eliminación del peróxido de hidrógeno presente en productos como la leche y el queso, el blanqueamiento de textiles y la evaluación de su efecto positivo sobre la viabilidad de mutantes de reparación de ADN en *E. coli*.

1.5. Disociación y estabilidad de proteínas multiméricas

Las proteínas con alta eficiencia catalítica han sido valoradas durante mucho tiempo en los campos industriales y farmacéuticos. Muchas de estas proteínas son multiméricas y presentan limitaciones que dificultan su aplicación, sobre todo debido a su baja estabilidad. Esta estabilidad puede verse afectada por la flexibilidad estructural y por interacciones electrostáticas desfavorables, lo que puede provocar la disociación de las subunidades, siendo este el primer paso en la inactivación de la proteína [29].

Por tanto, las proteínas multiméricas proporcionan un modelo interesante para investigar el autoensamblaje espontáneo de las estructuras de las proteínas y para estudiar las interacciones reguladoras entre subunidades [30]. Se ha demostrado que la estructura cuaternaria aporta un papel esencial en la estabilización de la conformación nativa de la proteína, por lo que la prevención de su disociación es esencial para conservar la función de estas enzimas complejas [29].

1.5.1. Disociación y agregación de la catalasa

La disociación de la catalasa es un factor relevante que, hasta el momento, no ha sido totalmente considerado en su mecanismo de acción a pH fisiológico [31]. La catalasa hepática bovina está compuesta por cuatro de aproximadamente 60 kDa cada una. Aunque estructuralmente todas las subunidades de la catalasa son idénticas y codificadas por un único gen, el enzima aparece en múltiples formas en los tejidos. Esta variabilidad no se debe a diferencias genéticas, sino a la inestabilidad del ensamblaje cuaternario de la proteína [30].

La inestabilidad de esta enzima bajo condiciones extremas, como variaciones de pH o temperatura, ha sido demostrada en diversos estudios [32]. En la mayoría de los casos, se ha observado su disociación en subunidades equivalentes a $M/4$, aunque también se ha demostrado la formación de subunidades correspondientes a $M/2$. En cuanto a su concentración, la óptima se sitúa entre 0.3–0.6 (mg/mL); concentraciones más altas favorecerán la agregación [31].

Bajo condiciones de pH extremadamente ácido, la catalasa comienza a disociarse en dos componentes al disminuir el pH por debajo de 4,0. Se ha demostrado que a un pH de 3,1 o inferior, la disociación es completa. Sin embargo, a pH 3,5, parte de la catalasa puede replegar al volver a pH 7,0, pero con una actividad catalítica reducida. A pH 2,7, la disociación es irreversible, y no se recupera ni la actividad ni la estructura nativa [33]. Además, se ha demostrado que las subunidades de catalasa, catalíticamente inactivas y producidas a pH alto, pueden reconstituirse para generar una enzima activa con características similares a las de la forma nativa [32].

2. Antecedentes y Objetivos

2.1. Antecedentes

La estabilidad de las proteínas terapéuticas es un factor clave en el desarrollo de medicamentos biológicos eficaces y seguros. Estas proteínas pueden sufrir degradaciones químicas y físicas a lo largo de la fabricación, almacenamiento y uso clínico. Las proteínas multiméricas suelen ser más termolábiles que las monoméricas debido a su tendencia natural a la disociación de subunidades inducidas tanto por calor como por cambios de pH o por la dilución del enzima.

Sin embargo, sus diferentes funciones (como la oxidación y la transaminación) las convierten en candidatas para aplicaciones en biotecnología industrial y biología sintética. El desarrollo de estrategias eficaces para mejorar su estabilidad estructural resulta de gran interés práctico. Actualmente, las estrategias más comunes se centran en mejorar las interacciones en la interfaz interna de las subunidades, mediante la introducción de mutaciones estabilizadoras que favorezcan la formación de enlaces disulfuro, interacciones hidrofóbicas o puentes salinos [29]. Los avances recientes han mejorado las estrategias que permiten controlar estos fenómenos, favoreciendo el desarrollo de fármacos proteicos más estables [34].

2.2. Objetivos

Teniendo en cuenta lo comentado en el epígrafe anterior acerca de la inestabilidad de las proteínas multiméricas, el presente Trabajo Fin de Grado se propone explorar la capacidad de polielectrolitos o de partículas magnéticas recubiertas de polielectrolitos para preservar la identidad biológica de estas enzimas, tomando la catalasa como modelo.

Los objetivos del proyecto pueden enumerarse de la siguiente forma:

- 1.- Caracterización de la adsorción de la catalasa a partículas de magnetita recubiertas de polietilenimina, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$, para formar el complejo $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}@$ catalasa.
- 2.- Estudiar actividad enzimática de la catalasa formando parte del complejo $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}@$ catalasa, comparándola con la correspondiente al enzima libre en disolución.
- 3.- Analizar la unión de catalasa al polielectrolito PEI y comparar la actividad del enzima formando parte del complejo con su actividad como proteína libre.
- 4.- Estudiar el efecto tanto de la formación de los complejos PEI-catalasa como $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}@$ catalasa sobre la desactivación del enzima en condiciones de alta dilución tras incubación prolongada a temperatura ambiente.
- 5.- Caracterizar el efecto de la formación de los complejos PEI-catalasa como $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}@$ catalasa sobre inactivación del enzima sometido a estrés térmico.

3. Materiales y métodos

3.1. Síntesis de nanopartículas de Fe_3O_4

Las partículas de magnetita, Fe_3O_4 , se obtuvieron siguiendo el método propuesto por Sugimoto [35], [36], basado en la precipitación de un hidróxido ferroso, $\text{Fe}(\text{OH})_2$, y su oxidación parcial con un oxidante suave tal como el ion nitrato, NO_3^- , en medio básico. El tamaño de las partículas resultantes puede modularse variando la relación molar entre los iones Fe^{2+} y OH^- .

Para ello, primero se disuelven 6,95 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ en 250 mL de agua previamente desgasificada (para evitar la oxidación del Fe^{2+} por el oxígeno disuelto) para alcanzar la concentración de 0,1 M. Por otro lado, se preparan 750 mL de una segunda disolución acuosa conteniendo 2.88 g de NaOH y 20.22 g de NaNO_3 . Seguidamente, ambas disoluciones se mezclan a temperatura ambiente con agitación magnética. Inmediatamente se observa la formación de $\text{Fe}(\text{OH})_2$ que, debido a su insolubilidad, precipita formando un gel de color verdoso. Tras 15 min de agitación para conseguir la adecuada homogenización, la dispersión resultante se introduce en un recipiente cerrado y se introduce en una estufa mantenida a 90 °C durante 18 h. El $\text{Fe}(\text{OH})_2$ es parcialmente oxidado para dar Fe_3O_4 mediante la acción del NO_3^- que actúa como agente oxidante. Seguidamente, la dispersión se enfría hasta alcanzar la temperatura ambiente y la dispersión se decanta magnéticamente para eliminar los reactivos sobrantes (NO_3^- y OH^- , fundamentalmente). La magnetita obtenida se somete a varios procesos de lavado y decantación magnética y se almacena, finalmente, como una dispersión acuosa.

3.1.1. Recubrimiento de las nanopartículas de Fe_3O_4 con PEI

Las partículas magnéticas obtenidas tienen un punto de carga nula (equivalente al punto isoeléctrico) cercano a 7 [36]. Para aumentar su estabilidad coloidal y facilitar que puedan adsorber proteínas de carga opuesta, fueron recubiertas con PEI.

El procedimiento comenzó con la adición de 1 L de una disolución acuosa que contenía 10 g de PEI. La disolución se incubó a temperatura ambiente durante 2 h bajo agitación magnética vigorosa. El pH de la disolución resultante se ajustó a 7.0. La dispersión acuosa de Fe_3O_4 (1 g) obtenida anteriormente se añadió gota a gota a la disolución de PEI bajo condiciones de agitación magnética ajustando el pH nuevamente a 7.0. La dispersión se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 3 h, siendo sometida a decantación magnética y sucesivos ciclos de decantación y lavado con agua.

3.2. Caracterización de nanopartículas

3.2.1. Tamaño

El tamaño de las nanopartículas una vez sintetizadas se midió mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz o *Dynamic Light Scattering* (DLS), utilizando en este caso un equipo Zetasizer

Malvern. Esta técnica mide la luz láser dispersada debido al movimiento browniano simultáneo de un gran número de partículas en solución. De este modo, las partículas de mayor tamaño se moverán más lentamente que aquellas de menor tamaño. Esto implica que la intensidad de la luz dispersada por las partículas grandes variará más lentamente en el tiempo que la dispersada por las partículas pequeñas [37].

La medición clave en DLS es la función de autocorrelación temporal (*Autocorrelation Function, ACF*), la cual refleja la variación de la intensidad de la luz dispersada por las partículas en suspensión a lo largo del tiempo. Los cambios en dicha intensidad están determinados por la tasa de decaimiento de las fluctuaciones, la cual, a su vez, está relacionada con la constante de difusión media aparente de las partículas.

Finalmente, para calcular el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas, se utiliza esta constante de difusión en la ecuación de Stokes-Einstein (ecuación 1) [38].

$$d(H) = \frac{k \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D} \quad (1)$$

Donde k es la constante de Boltzmann (1.380649×10^{-23} J/K), T es la temperatura expresada en Kelvin, η es la viscosidad dinámica del medio y D es el coeficiente de difusión.

Para medir el tamaño de las nanopartículas con el equipo Nano-Zetasizer, en primer lugar, se debe sonicar la muestra para evitar las agregaciones presentes. A continuación, se añadirán 1200 μL de la muestra que se encuentra a una concentración de 0,01 mg/mL a una cubeta Malvern con modelo de celda DTS1070. Una vez realizada la medición, la luz dispersada presenta una variación temporal en su intensidad, lo cual se emplea para calcular la distribución de tamaños de las partículas presentes en la muestra analizada. La intensidad de la luz dispersada por una partícula es proporcional a la sexta potencia de su diámetro, según la aproximación de Rayleigh.

3.2.2. Potencial zeta

El potencial zeta, también llamado potencial electrocinético, es una medida de la magnitud de la atracción o repulsión electrostática que existe entre partículas al ser sometidas a campos eléctricos crecientes. Su medición aporta información sobre fenómenos como la dispersión, agregación o floculación. Al medir el potencial zeta, se está evaluando el potencial eléctrico en el plano deslizante de un sistema de partículas. Este plano se define por los contraiones que viajan junto a la partícula, los cuales se vuelven más difusos a medida que se alejan de su superficie [37].

En este caso, el Malvern Zetasizer ZS DLS utiliza la celda DTS1070. Los electrodos de cobre situados a ambos lados permiten aplicar un campo eléctrico externo a los extremos de la cubeta, lo que posibilita medir la movilidad electroforética y, a partir de ella, calcular el potencial zeta.

Este potencial no es una propiedad de la partícula en sí, sino del sistema completo, es decir, de la partícula y del medio en el que se encuentra dispersa. Cambios en el medio, como el tipo y la concentración de iones, así como el pH, afectan el valor del potencial zeta.

3.2.3. Concentración de Fe_3O_4

Para determinar la concentración de magnetita presente en la alícuota de Fe_3O_4 , se llevan a cabo dos experimentos complementarios entre sí. Por un lado, se obtiene el peso del residuo seco de la nanopartícula y, por otro lado, se determina el contenido de Fe_3O_4 en la nanopartícula recubierta ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$) previa digestión de la misma con HCl.

El experimento del peso del residuo seco se realizará por triplicado. En primer lugar, se pesarán tres tubos de 2 mL vacíos. A continuación, se añadirá 1 mL del stock de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ en cada uno, previamente sonicadas, se decantarán con un imán y tras eliminar el sobrenadante, se dejarán durante toda la noche a 120 °C para que el disolvente se evapore por completo, quedando únicamente el residuo seco. Una vez pesados nuevamente los tres tubos, se restará el peso vacío inicial de cada uno y se calculará el promedio de las tres medidas.

En el experimento para determinar el contenido de Fe_3O_4 presente en la $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$, primero se preparó una predilución (disolución A) que contenía 100 μL de la muestra de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ y 900 μL de HCl 5 M. Esto provoca la disolución de la magnetita en sus iones componentes, Fe^{2+} y Fe^{3+} . A partir de esta primera disolución A, se preparó otra (disolución B) añadiendo 200 μL de la disolución A y 1800 μL de agua. Por último, se preparó una disolución C, a la cual se añadieron 200 μL de la disolución B, 200 μL de hidroxilamina y 1600 μL de tampón de ácido acético a pH 4,5, obteniéndose en total un factor de dilución de 1000. Gracias a la hidroxilamina, se consigue la reducción del ion Fe^{3+} a Fe^{2+} .

Una vez preparada esta disolución C, se adicionó 1,10-fenantrolina, un reactivo incoloro que, al reaccionar con el ion Fe^{2+} , forma un complejo de color rojizo. En este caso, las muestras se miden a una longitud de onda de 477 nm, la absorbancia de cada muestra es necesaria para calcular la concentración de Fe^{3+} , dividiendo dicha absorbancia entre el coeficiente de extinción molar para una longitud de onda de 477 nm, siendo este 15,148 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Tras esto, la concentración de Fe^{3+} se representa frente a la relación entre el volumen inicial y el total de cada muestra. A partir de aquí, extrapolar en la curva de calibrado para obtener la concentración de Fe y por tanto de magnetita en la muestra inicial.

3.3. Catalasa

La catalasa es un tetrámero de un peso molecular de 240 kDa (Fig. 2) que está compuesto por 4 subunidades iguales, cada una con un peso molecular de 60 kDa. Cada subunidad contiene hierro unido

a un grupo protohemo IX. Además, el enzima se une fuertemente al NADP, que se encuentra en estrecha proximidad al grupo hemo. Su punto isoelectrico se encuentra en un pH de 5,4, la actividad se mantiene constante en un rango de pH de 4,0 a 8,5.

La catalasa del hígado bovino empleada en este caso procede de Sigma y se presenta como una suspensión de proteína cristalina en agua. La liofilización de la catalasa produce la pérdida de gran parte de su actividad enzimática (entre en 70 y el 90 %) por lo que la dispersión

de catalasa cristalina mantiene una elevada actividad (entre 10.000 a 40.000 unidades/mg proteína a un pH de 7,0).

El coeficiente de extinción que vamos a emplear en todos los experimentos es de $3,65 \text{ (mg/mL)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, a una longitud de onda de 276 nm.

3.3.1. Método de preparación

La catalasa se encuentra en una suspensión de cristales en agua que contiene un 0,1 % (p/v) de timol como conservante. Para trabajar con la catalasa se sigue un protocolo como el que se muestra en la Fig. 3. Primero se debe eliminar el timol presente. Para ello, se centrifuga la disolución durante aproximadamente 10 minutos, esto hace que los cristales de catalasa precipiten. A continuación, se descarta el sobrenadante, se resuspenden los cristales en agua y se centrifuga nuevamente. Posteriormente, el pellet se vuelve a resuspender en agua y se ajusta su pH hasta 7. Finalmente, para disolver los cristales, se incuba la suspensión durante dos horas y media con agitación suave a 30 °C. Luego, se realiza una última centrifugación para eliminar posibles restos de cristales no disueltos. Una vez han sido eliminados esos cristales se cuantifica la concentración de catalasa midiendo su absorbancia a 276 nm.

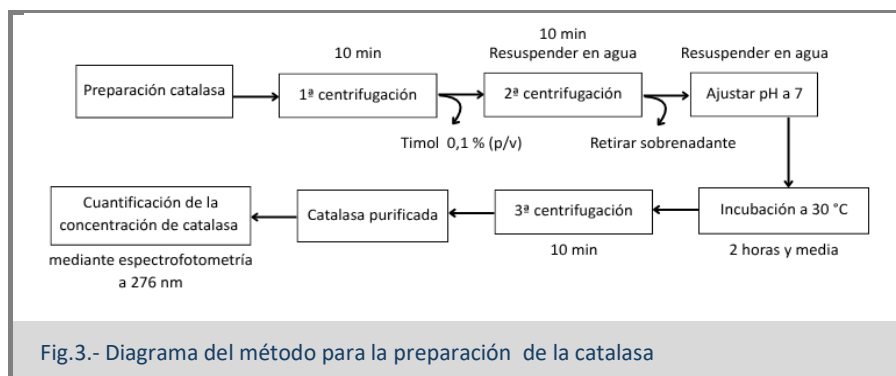


Fig.3.- Diagrama del método para la preparación de la catalasa

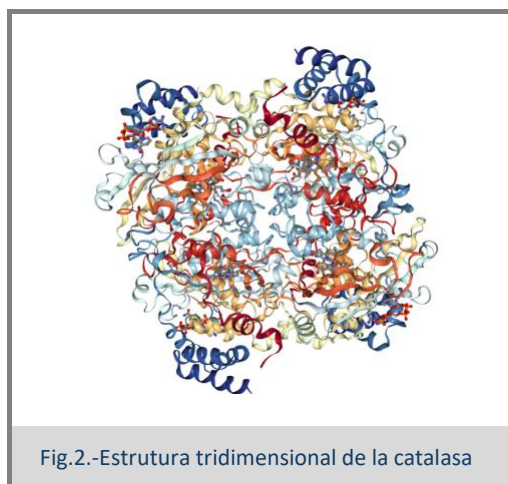


Fig.2.-Estructura tridimensional de la catalasa

3.4. Polielectrolitos

En este apartado se detallará información sobre la estructura y las características químicas de los polielectrolitos empleados en los experimentos que se presentarán posteriormente en el apartado de resultados.

3.4.1. Alginato (ALG)

Se trata de una clase de biopolímeros dispuestos linealmente que comprenden residuos de ácido 1,4-β-D-mannurónico (bloques M) y ácido 1,4-α-L-gulurónico (bloques G) ordenados en secuencias de bloques idénticos (MM, GG) o heterogéneos (MG) (Fig. 4). El alginato posee un peso molecular de 216.12 g/mol. Además, las soluciones alginato tienen una viscosidad

máxima a pH 3.0-3.5 debido al enlace de hidrógeno de los grupos carboxilato que forman la columna vertebral de alginato [39].

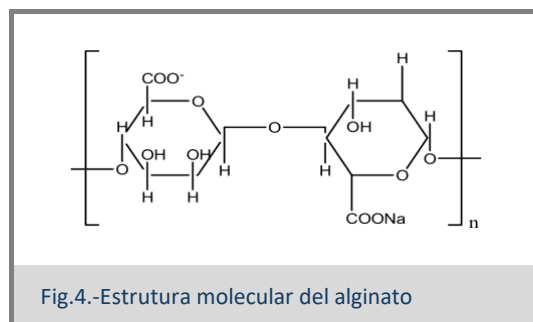


Fig.4.-Estructura molecular del alginato

3.4.2. Poliacrilato de sodio (PAA)

El poliacrilato de sodio (PAA) se trata de un polímero aniónico que presenta un grupo carboxilato con Na⁺ como contracatión (Fig. 5). Su fórmula molecular es [CH₂CH(CO₂Na)]_n y es altamente hidrofílico, capaz de formar geles. Puede absorber hasta hasta 300-800 veces su peso en agua. Se encuentra normalmente en forma de líquido viscoso y posee una densidad de 1,3 g/mL a 25 °C.

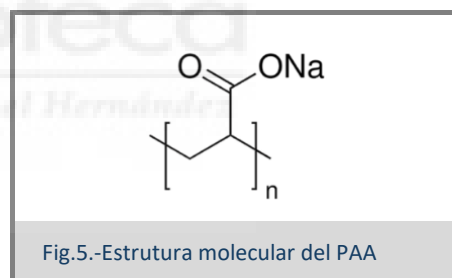


Fig.5.-Estructura molecular del PAA

3.4.3. Polietilenimina (PEI)

La polietilenimina (PEI) es un polímero altamente ramificado, cada tercer átomo siendo un nitrógeno protonable. Posee un peso molecular de 43,1 g/mol y su fórmula molecular es H(NHCH₂CH₂)_nNH₂ (Fig. 6). Debido a los numerosos grupos amino presentes en la molécula, posee una densidad de carga positiva elevada, también gracias a estos grupos anima primaria y secundaria

pueden unirse de manera eficiente a ciertos fármacos, ácidos nucleicos y otros restos funcionales [40]. Además, posee un efecto tampón dentro de un amplio rango de pH, convirtiéndose en una esponja de protones, lo que le permite amortiguar la acidez.

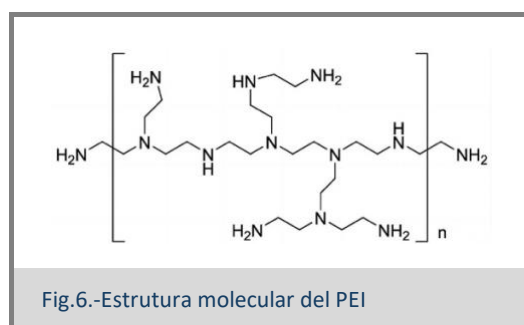


Fig.6.-Estructura molecular del PEI

3.5. Metodología de trabajo

A continuación, se expondrá la metodología principal empleada en la mayoría de los experimentos. En el apartado de resultados se detallará cómo se ha obtenido dicha información y cuáles son los resultados.

3.5.1. Determinación de la $q_{m\acute{a}x}$

Para determinar la capacidad máxima de adsorción de catalasa por parte de las nanopartículas de $Fe_3O_4@PEI$, se prepararon varios tubos Eppendorf con una concentración constante de catalasa (ligando), mientras que la concentración de nanopartículas se incrementó progresivamente. Las muestras se incubaron bajo agitación durante aproximadamente 18 horas, con el objetivo de favorecer la interacción y adsorción de la catalasa sobre las nanopartículas. Finalizada la incubación, las nanopartículas magnéticas se separaron mediante decantación utilizando un imán. Para determinar la concentración de catalasa libre restante en el sobrenadante tras la separación, se midió el espectro de absorción de todas las muestras en un espectrofotómetro desde 400 nm a 270 nm, sobre el cual se extrajo el valor máximo a la longitud de onda de 276 nm, longitud de onda a la cual está tabulado el coeficiente de extinción de la catalasa.

La masa total de la catalasa corresponderá a la masa soluble de la catalasa (masa de catalasa libre en el sobrenadante) y la masa adsorbida a la nanopartícula:

$$(m_{ligando})_{total} = (m_{ligando})_{soluble} + (m_{ligando})_{adsorbida} \quad (2)$$

Despejamos la masa de catalasa libre (soluble):

$$(m_{ligando})_{libre} = (m_{ligando})_{total} - (m_{ligando})_{adsorbida} \quad (3)$$

A continuación, llamaremos $q_{m\acute{a}x}$ a la masa de catalasa adsorbida por unidad de masa de partícula:

$$q_{m\acute{a}x} = \frac{(m_{ligando})_{adsorbida}}{m_{Fe_3O_4@PEI}} \quad (4)$$

Se despeja $(m_{ligando})_{adsorbida}$ y se obtiene lo siguiente:

$$(m_{ligando})_{adsorbida} = q_{m\acute{a}x} \cdot m_{Fe_3O_4@PEI} \quad (5)$$

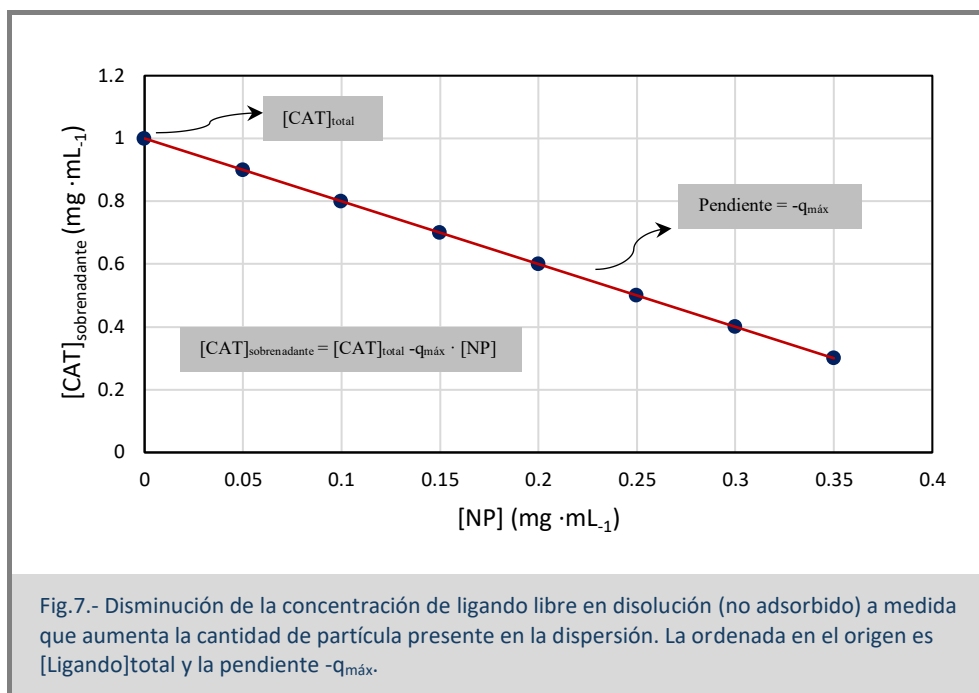
Se sustituye en ec. 3:

$$(m_{ligando})_{libre} = (m_{ligando})_{total} - q_{m\acute{a}x} \cdot m_{Fe_3O_4@PEI} \quad (6)$$

Finalmente, se divide por el volumen de la disolución:

$$[Ligando]_{libre} = [Ligando]_{total} - q_{m\acute{a}x} \cdot [Fe_3O_4@PEI] \quad (7)$$

Por tanto, representando la concentración de proteína (catalasa) presente en el sobrenadante frente a la concentración de partícula en la dispersión, se obtiene una línea recta cuya pendiente es $-q_{m\acute{a}x}$, tal y como refleja la Fig. 7



3.5.2. Medida actividad de catalasa

La actividad específica de la catalasa se refiere a la actividad enzimática por miligramo de proteína. Una unidad de catalasa es la cantidad de enzima que descompone 1,0 μmol de H_2O_2 por minuto a pH 7,0 y 25 °C. La catalasa es una enzima antioxidante omnipresente que degrada el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Esta actividad es siempre directamente proporcional a la tasa de disociación del peróxido de hidrógeno. La actividad de la catalasa puede calcularse mediante diferentes métodos; en este caso se emplearon dos.

3.5.2.1. Método espectrofotométrico

En este método, se determinó la actividad específica en unidades/mg/mL midiendo la cinética de la reacción entre la catalasa y el peróxido de hidrógeno mediante espectrofotometría. El método es el más común para medir la actividad de la catalasa es el espectrofotométrico en el ultravioleta, que se basa en monitorear el cambio de absorbancia a 240 nm (longitud de onda en la que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) presenta un coeficiente de extinción molar de $43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) utilizando altas concentraciones (alrededor de 20 mM) de peróxido de hidrógeno [24].

Para calcular la actividad específica de la muestra, se añadieron a cada tubo Eppendorf concentraciones decrecientes de catalasa (de $1,03 \times 10^{-4}$ a $2,56 \times 10^{-5}$ mg/mL) junto con un volumen constante de 1 mL de peróxido de hidrógeno en tampón Hepes 0,05 M a pH 7, completando con agua hasta un volumen final de 3 mL. Una vez adicionados los reactivos, la catalasa comienza a descomponer el H_2O_2 en agua y oxígeno, lo que provoca una disminución en la absorbancia a 240 nm. Se midió la absorbancia de cada tubo durante 60 segundos en el espectrofotómetro, y a partir de estos datos se

obtuvo la pendiente de cada recta. Finalmente, con este dato, se puede calcular la actividad específica, AE, de cada muestra mediante la siguiente ecuación:

$$AE = \frac{\text{Unidades}}{\text{mg catalasa}} = \frac{\frac{\Delta A_{240}}{\text{min}}}{\frac{43,6 \times \text{mg de catalasa}}{V_{\text{total}} (\text{mL})}} \quad (8)$$

Una vez calculada la actividad específica de cada muestra, el valor obtenido será un promedio de los valores obtenidos para cada concentración de enzima.

3.5.2.2. Un ensayo simple para medir la actividad de la catalasa: un enfoque visual

En el siguiente experimento se emplea un ensayo que combina la simplicidad y facilidad del enfoque cualitativo para medir la actividad de la catalasa. Este consiste en realizar una curva de calibrado a partir de la actividad específica previamente calculada. Para ello, se preparan distintos tubos Eppendorf con diferentes concentraciones de catalasa, cada uno de los cuales presentará una actividad correspondiente a su concentración.

A continuación, en un tubo de vidrio se añadirán 100 μL de uno de los tubos que contienen catalasa previamente preparados (repitiendo el procedimiento para cada una de ellos), 100 μL de peróxido de hidrógeno al 30% y Triton X-100. Lo que ocurrirá es que, se producirán burbujas de oxígeno generadas por la descomposición del peróxido de hidrógeno por la catalasa las cuales están atrapadas por el tensioactivo Triton X-100. Como resultado, las burbujas quedarán retenidas en forma de espuma. La altura de esta espuma en el tubo de ensayo se medirá para cuantificar la actividad de la catalasa [27]. Una vez medida la altura de la espuma en cada tubo, se representa dicha altura (mm) frente a la actividad específica (unidades/mg). De este modo, se obtiene una curva de calibrado que podrá utilizarse en experimentos futuros para determinar la actividad enzimática conociendo la altura de la espuma y la concentración del stock de catalasa. Esto es fundamental para poder determinar la actividad de el enzima cuando está unido con la nanopartícula, ya que no podríamos determinar la actividad mediante espectrofotometría debido a que las nanopartículas dispersarían toda la luz que les llega a la muestra.

4. Resultados y discusión

En este apartado se presentan los resultados de cada experimento junto con su correspondiente discusión. Se ha optado por combinar ambos elementos porque la mayoría de los experimentos están interrelacionados, y el razonamiento de cada uno se basa en los resultados obtenidos en los experimentos precedente. Por ello, exponerlos de forma conjunta no solo facilita su comprensión, sino que también ayuda a seguir el desarrollo del trabajo de forma lógica y continua, sin romper el hilo, y dejando más claro cómo se van construyendo las conclusiones a partir de los resultados.

4.1. Caracterización de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$

A la hora de trabajar con nanopartículas, lo primero que se debe hacer tras sintetizarlas, es caracterizarlas, esto nos permitirá saber en qué condiciones trabajar posteriormente. A continuación se expondrán los resultados obtenidos sobre la caracterización de las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$.

4.1.1. Tamaño

El tamaño del stock de nanopartículas sintetizado medido mediante el método de dispersión dinámica de la luz o *Dynamic Light Scattering* (DLS), empleando el equipo Nano-Zetasizer (apartado 3.2.1.) , da un valor de $206,6 \pm 1,6$ nm. Este tamaño saldría del intervalo considerado con nanopartícula, aunque algunos autores consideran como nanopartícula aquellas cuyo tamaño está por debajo de 500 nm [41]. En cualquier caso, se trata de partículas de tamaño submicrométrico con una polidispersidad pequeña.

4.1.2. Potencial zeta

El potencial obtenido en el Malvern Zetasizer ZS DLS utilizando la celda DTS1070, tal y como se indica en el apartado de materiales y métodos (apartado 3.2.2.) fue de $46,8 \pm 1,7$ mV. Se trata de un valor coherente, ya que las nanopartículas están recubiertas de PEI, un polielectrolito de naturaleza catiónica. Además, por la magnitud del dato de potencial se puede afirmar que el sistema es coloidalmente estable, no decantando por gravedad. En general, se considera que una muestra de nanopartículas es coloidalmente estable si su potencial Z se encuentra fuera del intervalo ± 20 mV, dependiendo del signo de su carga superficial.

4.1.3. Concentración

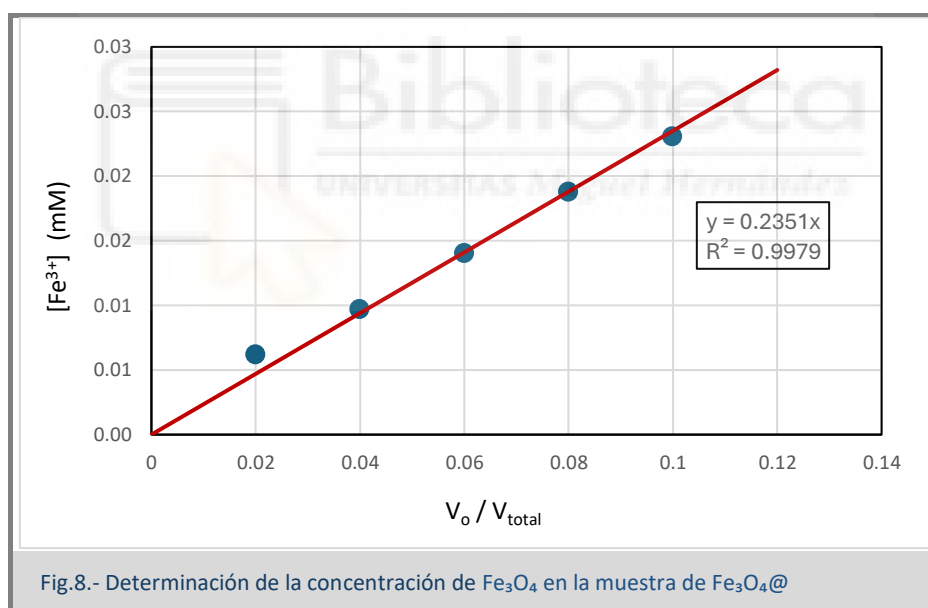
Para determinar la concentración de las nanopartículas se realizan dos experimentos, en el primero, se determinará la cantidad de residuo seco de la muestra, es decir la concentración de la nanopartícula completa, teniendo en cuenta el recubrimiento de PEI. En el segundo experimento, se determinará la cantidad de magnetita (Fe_3O_4) presente en las nanopartículas. Con estos dos datos se podrá obtener cuanta cantidad pertenece al recubrimiento y cuanta a la magnetita.

4.1.3.1. Peso de residuo seco

Tras realizar el método explicado en el apartado 3.2.3., el promedio de la concentración de los tres tubos fue de 32,22 mg/mL.

4.1.3.2. Determinación de la concentración de Fe_3O_4 del stock de nanopartículas

A continuación, se determina la cantidad de magnetita (Fe_3O_4) presente en las nanopartículas con las que estamos trabajando ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$). Para ello, se obtiene una relación de concentración de Fe^{3+} frente a la cantidad normalizada de la muestra, tras medir la absorbancia de las muestras (Fig. 8) (apartado 3.2.3). La ecuación de la recta que se obtiene es $y = 0,2351x$, siendo la pendiente $m = 0,24$, esta pendiente es la concentración de Fe^{3+} en mM presente en la muestra, para obtener la concentración de magnetita, lo primero que se debe hacer es pasar a molar, obteniendo así una concentración de Fe^{3+} de $2,35 \cdot 10^4 \text{ M}$ presente en la disolución C. Para saber cual es la concentración de Fe^{3+} en el stock de nanopartícula, se multiplica ese valor por el factor de dilución (en este caso 1000), tras esto, se divide entre tres ya que la magnetita presenta 3 átomos de hierro, dando una concentración del stock de Fe_3O_4 de 0,078 M, Por último, se determina la concentración en mg/mL dando como resultado 18,14 mg/mL.

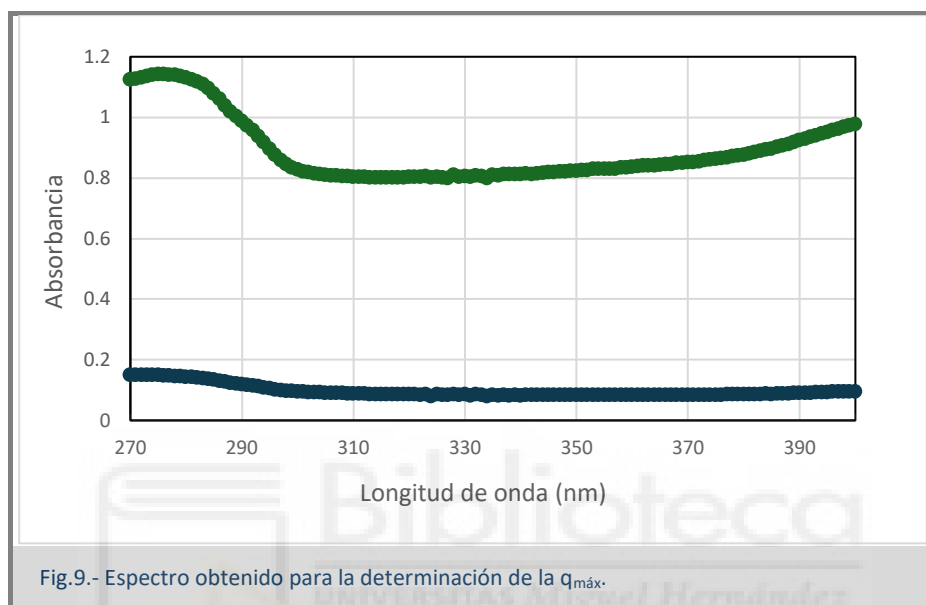


Por tanto, sabiendo que la concentración del residuo seco de la nanopartícula es 32,22 mg/mL y la de la magnetita es 18,14 mg/mL. Se estableció que el 56 % en masa de las partículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ se trató de Fe_3O_4 , mientras que el 44 % restante correspondía a PEI presente en la partícula magnética (14,08 mg/mL).

4.1.4. Determinación de la $q_{\text{máx}}$

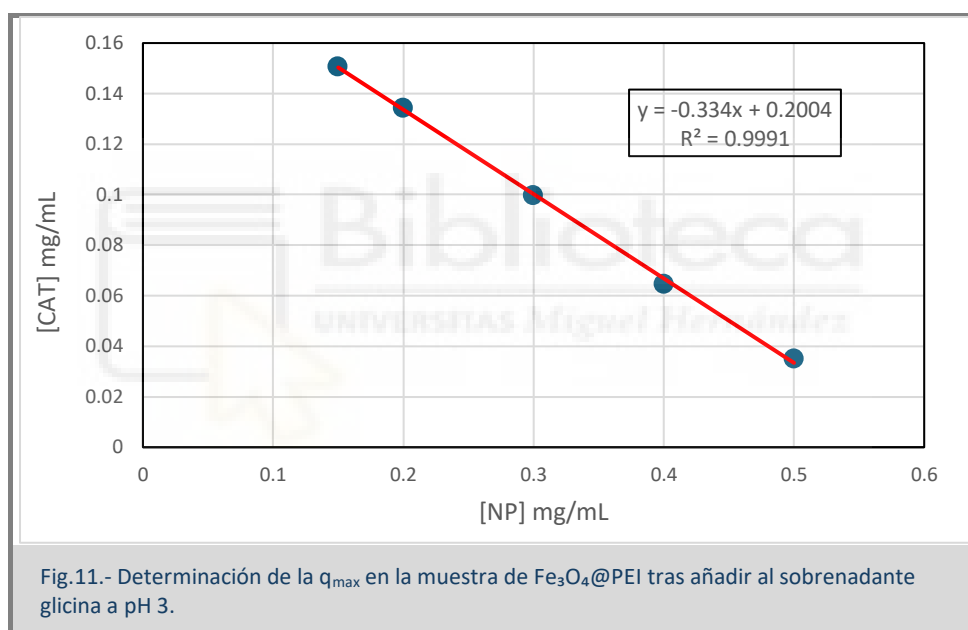
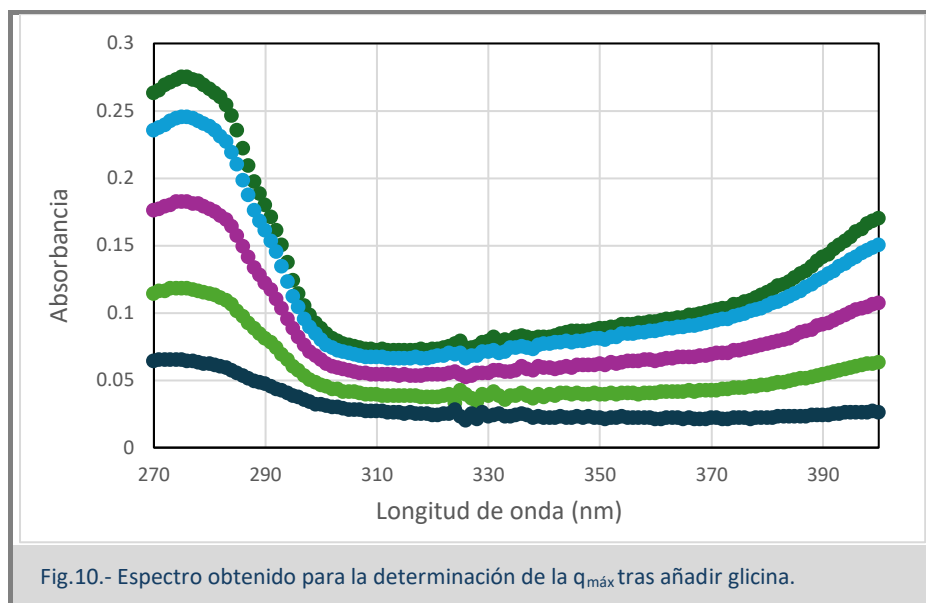
Para determinar y plantear experimentos posteriores, es importante saber cuál es la capacidad máxima de adsorción de catalasa por parte de las nanopartículas en mg por mg de nanopartícula. Para ello se plantea el experimento de tal forma como se ha explicado en el apartado 3.5.1. de materiales

y métodos. Al tratarse de la catalasa, sabiendo que su punto isoeléctrico se encuentra a un pH de 5,4, se trabajará en condiciones de pH 7 para que la proteína quede cargada negativamente y de esta forma, favorecer la unión con las nanopartículas recubiertas de PEI, las cuales estarán cargadas positivamente. Al medir la absorbancia de las muestras a 276 nm y representar el espectro, se observa la presencia de dispersión (Fig. 9). La dispersión es detectable a valores de absorbancia relativamente grandes entre longitudes de onda de 320 y 350nm, donde ni los grupos aromáticos de la proteína absorben luz, ni el grupo hemo de la misma, el cual presenta un máximo a 405 nm.



Es importante tener en cuenta que cuando se trabaja con nanopartículas, es posible que en el sobrenadante haya catalasa unida a PEI libre formando coacervados, pudiendo ser estos solubles o insolubles. Esto provoca que se disperse la luz y no se obtenga el resultado esperado tal y como se vería en la figura 9. Para solucionar este problema, se trata el sobrenadante cada uno de los tubos de muestra con glicina a pH 3. Con esto conseguimos que la proteína adquiera carga neta positiva ($pH < pI$), haciendo que la proteína se disocie del polielectrolito, PEI, que tendrá también carga positiva a este pH. De esta forma, se evita la formación de complejos insolubles catalasa – PEI responsables de la turbidez de la muestra (y del incremento de la absorbancia aparente de la muestra no relacionado con la concentración de proteína). De este modo, la muestra no presenta turbidez y la absorbancia que obtengamos sí refleja la concentración real (Fig. 10).

Después de este paso, se vuelve medir la absorbancia de las muestras a 276 nm y teniendo en cuenta el coeficiente de extinción de la catalasa a esta longitud de onda ($3,65 \text{ (mg/mL)}^{-1}\text{cm}^{-1}$), se calcula la concentración correspondiente de catalasa. Tras esto, se representará la concentración de catalasa en el sobrenadante frente a la concentración de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ en disolución (Fig. 11) donde la pendiente obtenida será $-q_{máx}$, por lo que la $q_{máx}$ que se considerará válida y que se presentará en experimentos posteriores será de $0,334 \text{ mg/mg}$ de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$.

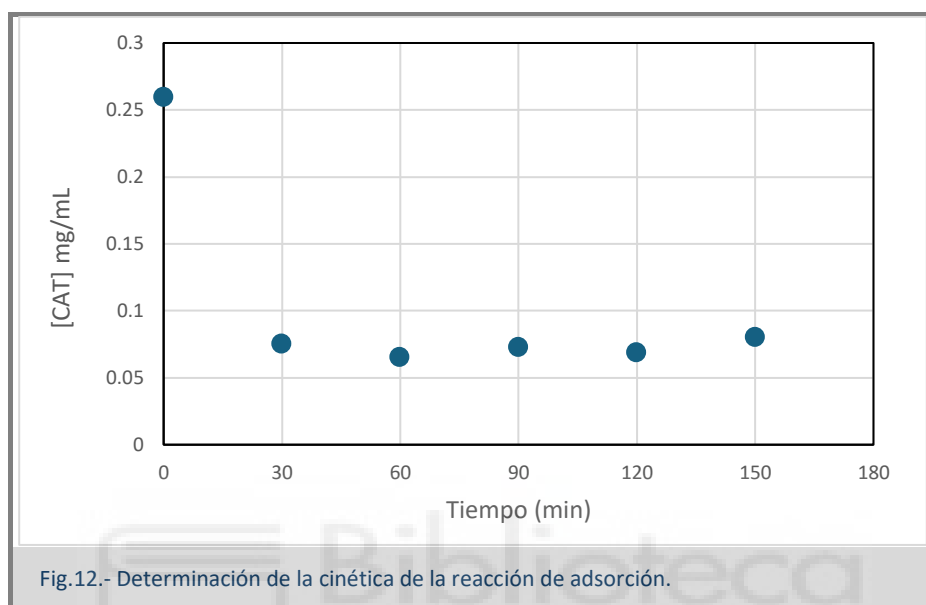


Como se discutió en el apartado de Materiales y Métodos, la pendiente de la correlación lineal entre la concentración de catalasa libre en el sobrenadante (no adsorbida a la partícula) y la concentración total de partícula magnética representa $-q_{\max}$, la masa máxima de proteína que es capaz de adsorber 1 mg de nanopartícula (en este caso 0,334 mg de catalasa por mg de $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEI$).

4.1.5. Cinética de adsorción de la catalasa a las $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEI$

Una vez conocida la $q_{\max}$ entre la catalasa y las nanopartículas, se determinó la cinética de la reacción de adsorción, es decir, cuánto tiempo tardan las nanopartículas en adsorber toda la cantidad de catalasa posible dentro de los parámetros de la $q_{\max}$. Esto es importante, ya que agilizará futuros experimentos en los que haya que incubar la catalasa junto a las nanopartículas. Para ello, se preparan diferentes tubos Eppendorf con las mismas concentraciones tanto de catalasa como de nanopartículas.

A continuación, se mide la absorbancia del sobrenadante empezando a tiempo 0 para tener un punto control donde se encuentre toda la catalasa sin adsorber, y por tanto, presente en el sobrenadante; después cada media hora durante un periodo de dos horas, y se obtiene la concentración de catalasa presente en cada tiempo. Este resultado viene recogido en la Fig. 12. La gráfica que se obtiene tras este experimento es la siguiente:



Como se puede observar en la Fig. 12, en la primera media hora toda la catalasa ha sido adsorbida sobre las nanopartículas, ya que se observa una bajada en la concentración en el sobrenadante acorde a la $q_{\text{máx}}$ de la que hemos hablado anteriormente. Se puede determinar que está toda la catalasa adsorbida a la nanopartícula ya que la concentración de catalasa que se añade es de 0,26 mg/mL y la de nanopartícula es 0,5 mg/mL, teniendo en cuenta que la $q_{\text{máx}}$ presenta un valor de 0,33 mg/mg de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$, se debería adsorber 0,165 mg/mg de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$. Por tanto, en el sobrenadante se obtendría una concentración de catalasa de: $0,26 - 0,165 = 0,095$ mg/mL, en este caso el valor obtenido es alrededor de 0,08 mg/mL, es decir, un valor aún menor. Dentro del error experimental, es aceptable, demostrando así que la catalasa está completamente adsorbida en los 30 primeros minutos. A partir de este tiempo, la concentración en disolución permanece constante, por lo que estimamos que con una hora de incubación el proceso de adsorción ha alcanzado el equilibrio, y por tanto no sería necesario dejar toda la noche en incubación, por lo que el tiempo que se deja en contacto para que se lleve a cabo el proceso de adsorción del enzima disminuye drásticamente.

4.1.6. Medida del potencial Z del sistema $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}@\text{CAT}$ de la $q_{\text{máx}}$

Es importante conocer el potencial asociado a la nanopartícula una vez que la catalasa ha sido adsorbida, ya que esto permite determinar la carga superficial global del sistema con el que trabajamos

y, en consecuencia, establecer las condiciones más adecuadas para aplicar un recubrimiento protector que garantice su estabilidad con el objetivo de poder almacenar y proteger la catalasa.

En este experimento se analizarán dos casos: en el primer caso, se trabajará con un 50 % de $q_{m\acute{a}x}$, por lo que se espera que toda la catalasa esté completamente adsorbida a la nanopartícula. En consecuencia, el potencial medido debe ser positivo al medir el pellet resuspendido, dado que la superficie de PEI no está completamente saturada, es de esperar que la carga global del sistema una vez adsorbida la catalasa sea positiva.

Al medir el potencial del pellet resuspendido se obtuvo un potencial de 6,07 mV. Con esto se puede concluir que, al estar toda la catalasa adsorbida y por tanto presentar un potencial positivo en estas condiciones, lo ideal sería para el recubrimiento un polielectrolito con densidad de carga negativa. Para el segundo caso, se trabajará con un 200 % de $q_{m\acute{a}x}$, lo que indica que, una vez finalizado el tiempo de adsorción y decantada la muestra, seguirá habiendo catalasa libre en el sobrenadante. Al medir únicamente el pellet resuspendido, se esperará que la carga sea negativa, ya que si la superficie se satura con catalasa, debería de quedar una densidad de carga negativa.

Al medir solo el pellet una vez resuspendido, se obtiene un potencial positivo de 6,6 mV, muy similar al caso anterior. Esto puede ser debido a que la catalasa podría no presentar una distribución isotrópica de las cargas, lo que permitiría proteína se orientase de forma que la mayor densidad de carga negativa estuviese en contacto con la superficie, mientras que otra parte con densidad de carga positiva se expusiese al medio. A pesar de que en ambos casos se obtienen valores de potencial superficial positivo, no son comparables, ya que el sistema no es coloidalmente estable al encontrarse en un rango entre -20 y 20 mV, lo que lo hace muy poco reproducible. Aun así, en ambos casos lo ideal sería emplear polielectrolito catiónico para recubrir el sistema $Fe_3O_4@PEI@CAT$, ya que, la carga neta es positiva.

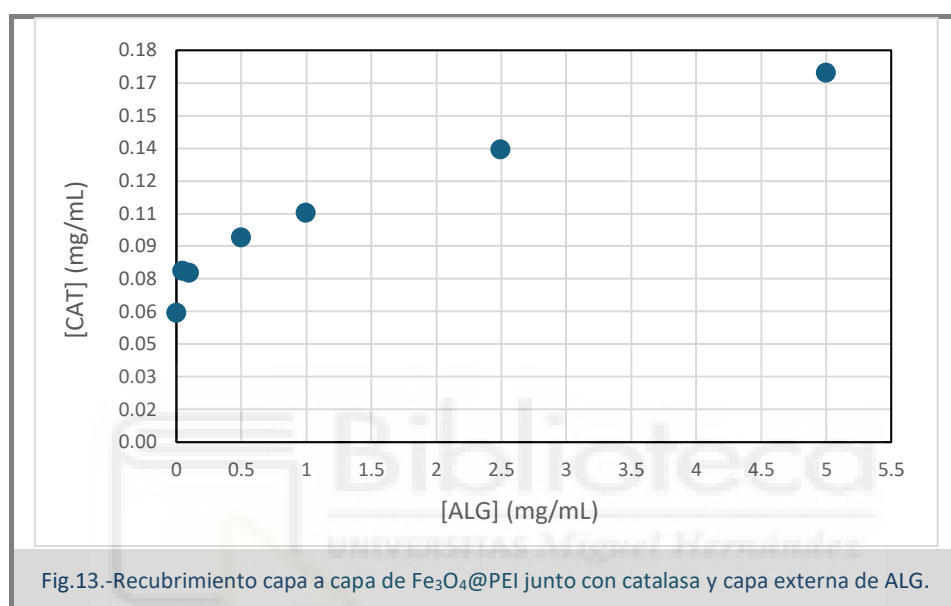
4.2. Protección por recubrimiento con polielectrolito mediante recubrimiento capa a capa

Un método de protección muy eficaz consiste en rodear la nanopartícula de $Fe_3O_4@PEI$, una vez unida la catalasa, con un polielectrolito que se una a la proteína con el fin de protegerla y que preserve su actividad. Para los experimentos que se exponen a continuación se emplearán diversos polielectrolitos para determinar la estabilidad del complejo una vez unidos a la catalasa.

4.2.1. Recubrimiento capa a capa entre $Fe_3O_4@PEI$ y alginato

Tras medir el potencial del complejo de catalasa unida a $Fe_3O_4@PEI$ y determinar un potencial positivo, se empleará un polielectrolito con carga negativa como capa externa para formar una estructura recubierta capa a capa con la nanopartícula unida a la catalasa. En este caso, el polielectrolito seleccionado es el alginato (ALG), que se unirá a las cargas positivas expuestas en la superficie de la

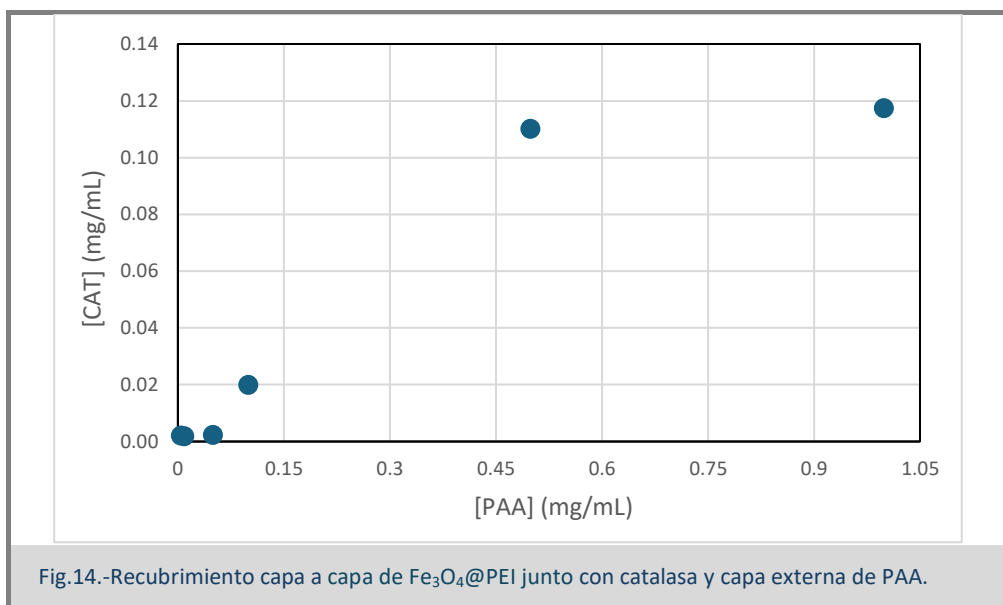
catalasa. Para ello, se dejarán incubando durante una hora, en condiciones de $q_{\text{máx}}$, varios tubos que contienen la nanopartícula con la catalasa. Posteriormente, se decantará y se retirará el sobrenadante; el pellet se resuspenderá en disoluciones con concentraciones crecientes de alginato. El objetivo es comprobar si, tras la incubación y posterior centrifugación, no aparece catalasa en el sobrenadante una vez medida en el espectrofotómetro, lo que indicaría que ha quedado protegida bajo la estructura de recubrimiento capa a capa y por tanto, el complejo es estable. Los resultados obtenidos tras medir el sobrenadante de los tubos y representar la concentración de catalasa libre en el sobrenadante frente a la de alginato en la muestra son los siguientes (Fig. 13).



Se observa que, al aumentar la concentración de alginato, también se incrementa la concentración de catalasa detectada en el sobrenadante. Este fenómeno sucede gracias a la alta afinidad que existe entre el alginato y PEI, por lo que el alginato competirá con la catalasa por la superficie de la nanopartícula, quedando el enzima desplazado al medio. Por tanto, se puede determinar que la estructura de capa a capa empleando el polielectrolito alginato como capa externa no proporciona los resultados de protección esperados.

4.2.2. Recubrimiento capa a capa entre $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ y PAA

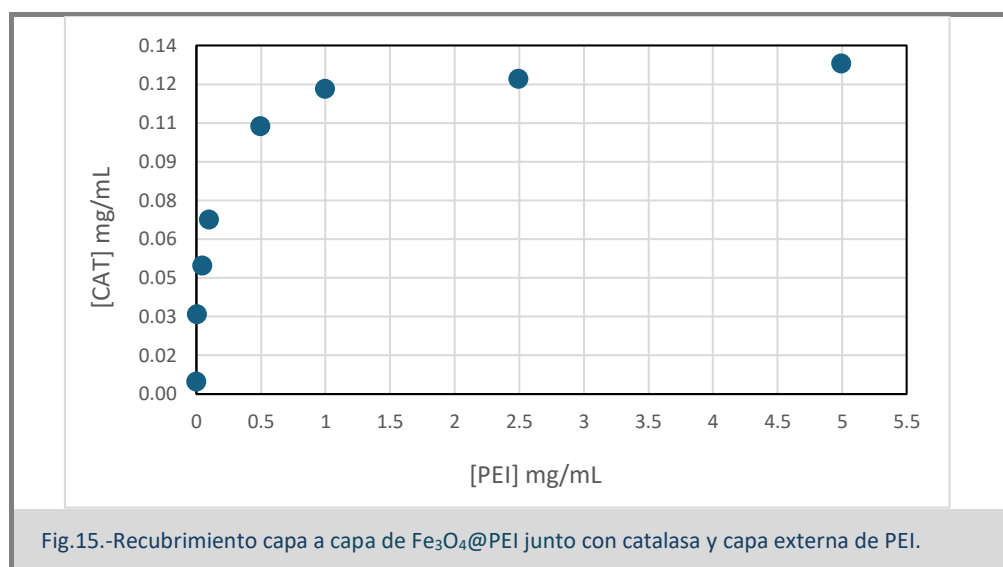
Tras comprobar que el alginato no es capaz de formar el recubrimiento capa a capa con la catalasa adsorbida a la nanopartícula, debido a su elevada afinidad por esta, se plantea repetir el experimento utilizando otro polielectrolito aniónico, con el objetivo de comprobar si es capaz de formar el complejo estable. Tras medir la absorbancia del sobrenadante, la catalasa en el sobrenadante obtenida se representa frente a la cantidad de PAA en cada tubo de muestra (Fig. 14). En este caso, se probaron concentraciones de polielectrolito mucho menores que para el caso del alginato.



Al igual que con el alginato, el PAA también desplaza la catalasa de la superficie, incluso utilizando 5 veces menos concentración con respecto al alginato. Como consecuencia, el PAA tampoco se puede emplear como polielectrolito para formar una estructura de recubrimiento capa a capa.

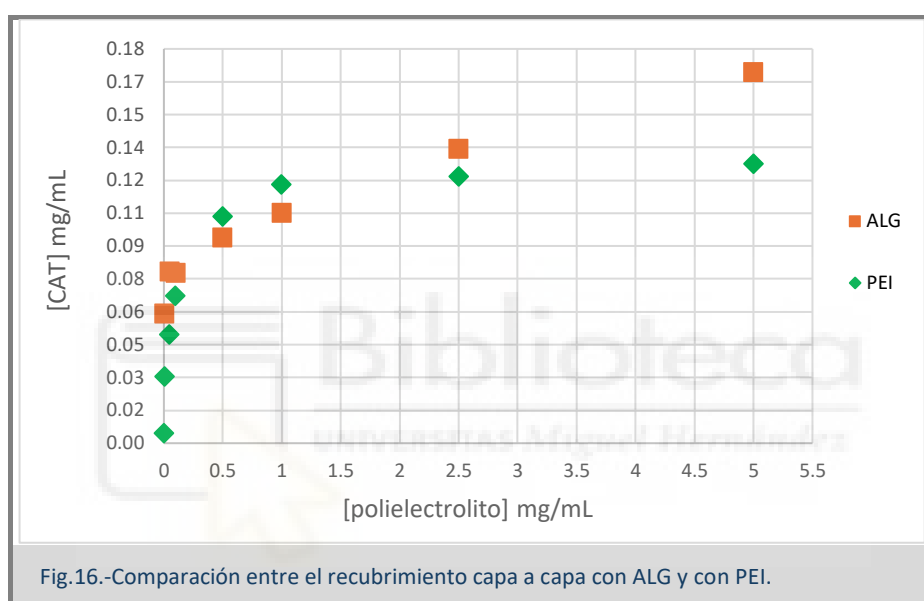
4.2.3. Recubrimiento capa a capa entre $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@PEI}$ y PEI

Tras intentar realizar la estrategia de recubrimiento capa a capa con dos polielectrolitos diferentes, ambos con carga negativa, se decidió cambiar de enfoque y emplear un polielectrolito con carga positiva, el PEI, con el objetivo de observar su comportamiento una vez unido a la catalasa. Para este experimento se empleará la misma metodología y el mismo razonamiento que en los experimento anteriores. Tras la centrifugación, se midió el sobrenadante y se representó la $[\text{CAT}]_{\text{libre}}$ frente a la concentración de PEI añadida, obteniéndose la siguiente gráfica (Fig. 15)



En este caso, ocurre que la interacción del PEI libre con la catalasa resulta más estable que la interacción de esta con la superficie de la nanopartícula a medida que aumenta la concentración de PEI. Como consecuencia, el PEI desplaza a la catalasa, formando agregados solubles. Para obtener una visión más general, se presentan en la siguiente gráfica (Fig. 16) los resultados del recubrimiento mediante la técnica de recubrimiento capa a capa en ambos casos.

Tal como se ha mencionado anteriormente, puede observarse que en ambos se produce el mismo comportamiento, y que en ningún caso probado se produce la protección del enzima, por lo que finalmente se testará si la propia inmovilización sobre la superficie es suficiente como para hacer que la proteína permanezca estable durante largos períodos de tiempo, o en condiciones que puedan desestabilizar al enzima.



4.3. Actividad de la catalasa

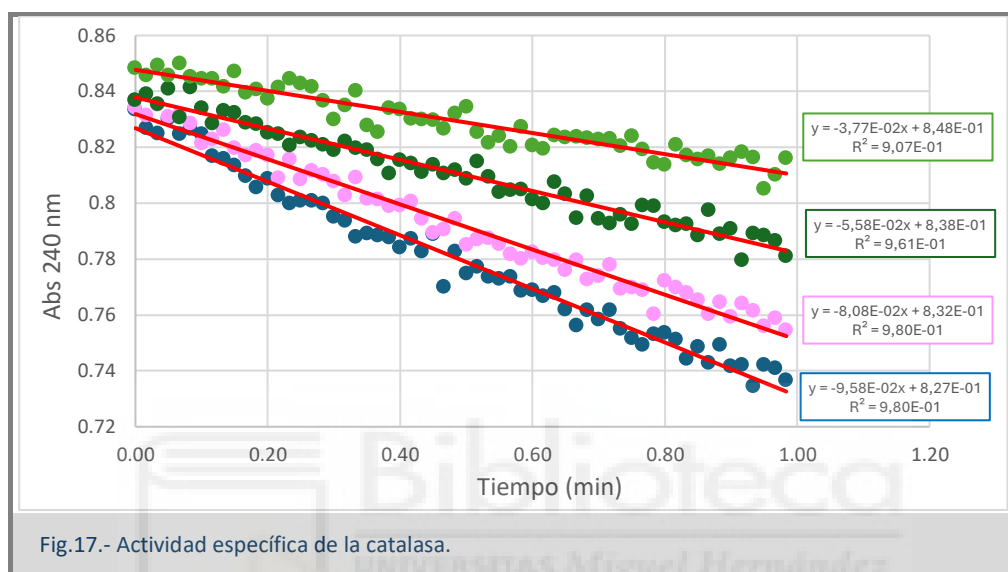
Tras la recopilación de los datos e información obtenidos en los experimentos anteriores, se puede proceder a diseñar los ensayos que permitirán evaluar si la catalasa, expuesta a diferentes métodos de tratamiento, es capaz de mantener su actividad bajo determinadas condiciones, como la incubación a temperatura ambiente en condiciones de alta dilución tras ser sometida a estrés térmico. El objetivo de estos estudios será el diseño de metodologías que optimicen la retención de la actividad biológica del enzima durante su almacenamiento.

4.3.1. Actividad específica de la catalasa

Es fundamental conocer la actividad específica del stock de catalasa con el que se va a trabajar, expresada en unidades/mg, para poder diseñar futuros experimentos. Para ello, se utilizará el método espectrofotométrico para medir la cinética de la reacción de descomposición del peróxido de

hidrógeno (H_2O_2) en agua (H_2O) y oxígeno (O_2), la cual, como se ha mencionado anteriormente, está catalizada por la catalasa, que actúa como una enzima oxidante.

El procedimiento experimental se detalla en el apartado 3.5.2.1. de Materiales y Métodos. En este, se añadirán cantidades crecientes de catalasa, manteniendo constante la concentración de H_2O_2 , con el objetivo de observar cómo varía la velocidad de reacción al aumentar la concentración de enzima. La cinética de descomposición se medirá durante un minuto. A continuación, se presentan los resultados obtenidos en el espectrofotómetro (Fig. 17).



Tras realizar las cuatro medidas, se observa un aumento en las pendientes de las rectas obtenidas, esto se corresponde con un incremento en la concentración de catalasa en la disolución final en cada experimento. Lo que confirma que, a medida que aumenta la concentración de enzima, la descomposición del peróxido de hidrógeno se produce a mayor velocidad, esto se refleja en un incremento en la pendiente.

Tras calcular la actividad específica de cada muestra empleando la fórmula (8), se hace un promedio de las cuatro, donde el valor de actividad específica obtenida es de 26065 unidades/(mg/mL) de catalasa, esta entra dentro del rango del fabricante (10000-40000 unidades/mg de proteína).

4.3.2. Curva de calibrado de la actividad de la catalasa

Como se comentó anteriormente, cuando el enzima se encuentra inmovilizado sobre una nanopartícula no es posible el uso de métodos ópticos, ya que la dispersión por parte de las nanopartículas va a saturar el detector del espectrofotómetro, por ello se recurre a determinar la actividad mediante el método de la espuma descrito en el apartado 3.5.2.2. de Materiales y Métodos.

Esta curva permitirá estimar la actividad enzimática de nuevas muestras simplemente midiendo la altura de la espuma generada en la reacción de descomposición de H_2O_2 en H_2O y O_2 (Fig. 18) . Para

construirla, se medirá la altura de espuma generada en distintos tubos con concentraciones crecientes de catalasa, conociendo previamente la actividad de cada muestra calculada a partir de la actividad específica del stock determinado mediante medida espectrofotométrica. Para que se produzca la reacción, es necesario añadir en un tubo de cristal 100 μ L de peróxido de hidrógeno al 30 %, 100 μ L de Triton X-100 y 100 μ L de la muestra de catalasa. El Triton X-100 actúa estabilizando las burbujas de oxígeno generadas durante la reacción de descomposición del peróxido que dando lugar a una espuma cuyo volumen resulta ser proporcional a la cantidad total de oxígeno liberado. Tras añadir los reactivos, se observa la formación de columnas de espuma cuya altura está directamente relacionada con la cantidad de enzima activa presente en la muestra (Fig. 18).



Fig.18.-Espuma producida de la reacción de degradación del peróxido de hidrógeno en presencia de catalasa y detergente Tritón X-100.

Este ensayo se repite por triplicado para estimar valores más exactos, por lo que la curva de calibrado obtenida tras hacer el promedio de los tres aplicando su correspondiente barra de error es la que se muestra en la figura 19.

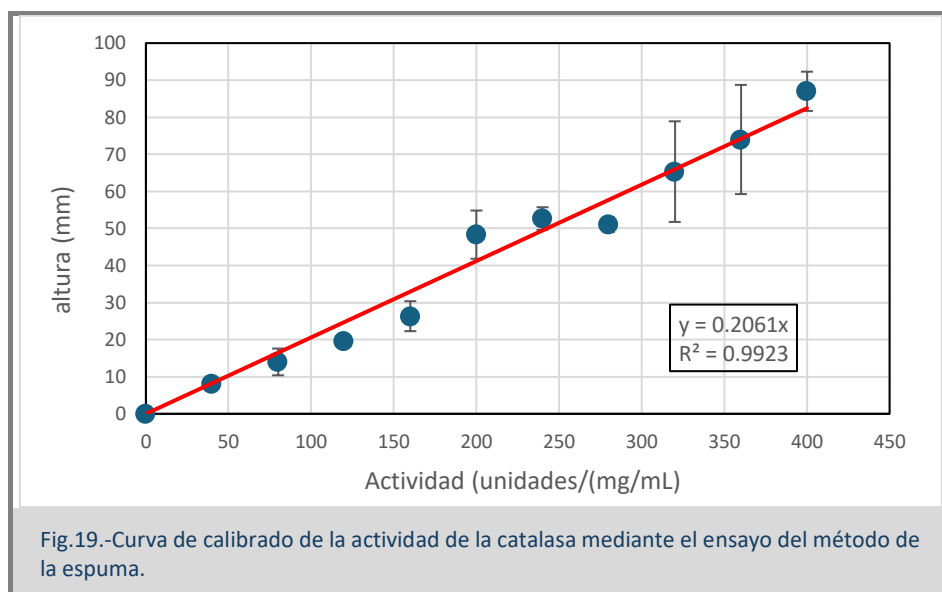


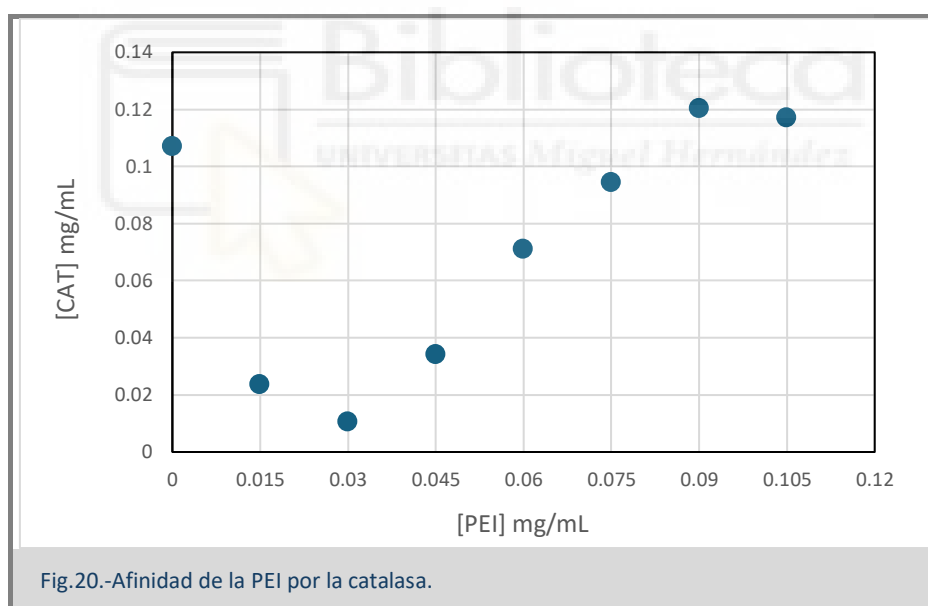
Fig.19.-Curva de calibrado de la actividad de la catalasa mediante el ensayo del método de la espuma.

4.3.3. Unión de catalasa y polietilenimina (PEI)

Tal y como se ha observado en experimentos anteriores (apartado 4.2.3.), el PEI presenta afinidad por la catalasa libre, llegando incluso a desplazarla de la superficie de la nanopartícula. Por ello, resulta interesante estudiar si el PEI libre puede conferirle cierta protección y actuar como un método eficaz de almacenamiento. Para ello, es necesario determinar previamente la cantidad máxima de PEI que puede unirse a la catalasa. Este dato será clave para el diseño de futuros experimentos.

En el siguiente experimento, se prepararon varias muestras conteniendo la misma cantidad de catalasa y una concentración creciente de PEI en cada tubo. A continuación, se centrifugarán las muestras y se medirá el sobrenadante a una longitud de onda de 276 nm en el espectrofotómetro. Esto permitirá comprobar si el PEI ha logrado formar un coacervado con la catalasa que pueda ser eliminada por centrifugación. Por tanto, la absorbancia del sobrenadante se relaciona directamente con la concentración de catalasa no unida a PEI y permite, cuando se representa frente a la concentración total de PEI, determinar la $q_{\text{máx}}$ para la interacción PEI-catalasa.

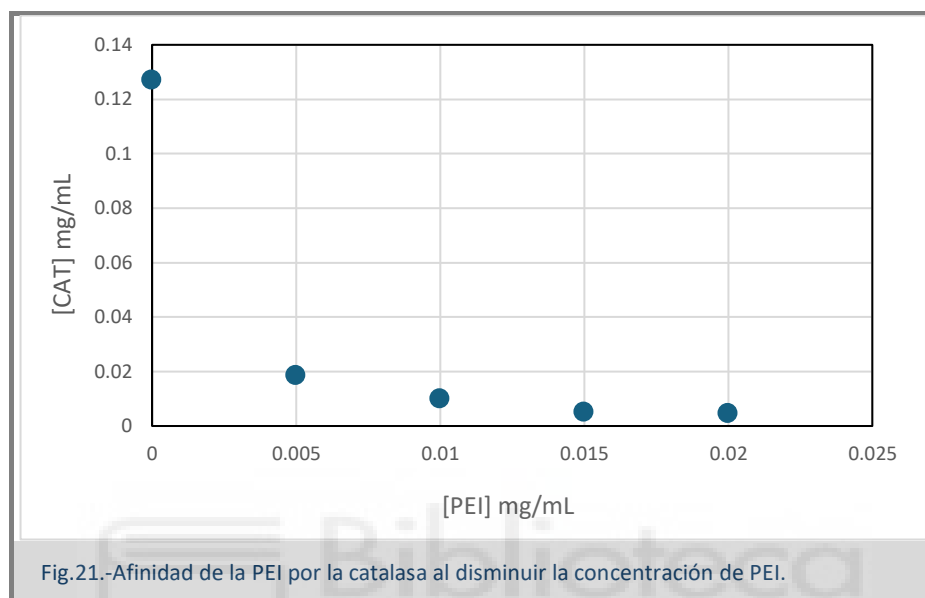
Al representar gráficamente la concentración de catalasa en el sobrenadante frente a la concentración de alginato en cada tubo, se obtiene el siguiente resultado (Fig. 20).



Tras observar la gráfica (Fig. 20) , se puede ver cómo a bajas concentraciones de PEI (< 0,03 mg/mL), buena parte de la catalasa forma un complejo insoluble con el polielectrolito. Sin embargo, al superar una cierta concentración de PEI (>0,03 mg/mL) se observa un aumento de la cantidad de catalasa soluble. Este comportamiento parecería indicar que tras alcanzarse la compensación de cargas entre la proteína y el polielectrolito (alrededor de 0,03 mg de PEI/mL), el exceso de PEI respecto del estequiométricamente necesario hace que se forman complejos catalasa – PEI que son solubles en agua. Este hecho puede explicarse debido a que los complejos formados con exceso de PEI mantiene

un buen número de cargas positivas expuestas al disolvente lo aumenta su solubilidad mediante interacciones ión – dipolo con las moléculas de agua.

Para determinar mejor, la relación entre PEI y catalasa necesaria para que no se formen dichos complejos catalasa – PEI solubles y se pueda obtener un sistema nanoestructurado, se lleva a cabo la misma titulación pero en un rango de menor concentración, obteniéndose el resultado presente en la gráfica de la figura 21.



El resultado obtenido es una disminución de la concentración de catalasa en el sobrenadante a medida que aumentamos la concentración de PEI. Por tanto, la concentración de PEI máxima que podría emplearse debería estar comprendida entre 0,005 y 0,02 mg/mL, para que la catalasa (0,11 mg/mL) quede mayoritariamente atrapada.

4.3.4. Cinética de la actividad de la catalasa

Una vez definida la curva de calibrado, conocida la actividad específica del stock de catalasa y la concentración máxima de PEI que es capaz de unirse a la catalasa, se puede plantear uno de los experimentos principales basado en los ensayos previos. Es conocido que una de las principales causas de desactivación de las enzimas multiméricas es la disociación de sus monómeros cuando la proteína se encuentra en condiciones de alta dilución (las concentraciones habituales para su función catalítica).

Con objeto de estudiar el efecto de la formación del complejo catalasa – PEI y la adsorción del enzima a la partícula de magnetita recubierta de PAI, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}@$ catalasa) se estudió la cinética de la actividad de la catalasa a 30°C bajo diferentes condiciones: catalasa libre, catalasa unida a PEI y catalasa unida a la nanopartícula $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$. El objetivo es determinar si alguna de estas condiciones aporta una mayor estabilidad (preservando su actividad) al enzima frente al tiempo, en comparación con su forma libre. Si se obtiene dicho resultado, esta estrategia podría resultar de interés para

aplicaciones industriales o científicas en las que se necesite conservar una proteína activa durante periodos prolongados.

Para este ensayo se preparan, por triplicado, tres tubos Eppendorf de 2 mL con catalasa libre, otros tres con catalasa en presencia de PEI con la relación previamente determinada y otros tres con catalasa unida a nanopartículas, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$, donde la proteína se ha adsorbido por completo. En el caso de la catalasa adsorbida a las nanopartículas, al conocer el valor de $q_{\text{máx}}$, se utilizará una concentración de catalasa inferior a este valor para asegurar que todo el enzima quede adsorbido sobre la nanopartícula y no quede catalasa libre en el sobrenadante. Además, se incluirá un tubo control en las mismas condiciones, se medirá el sobrenadante al inicio y al final del experimento para comprobar que toda la catalasa esté adsorbida inicialmente y confirmar que permanece adsorbida al finalizar el ensayo.

Una vez preparados, se deja incubar el tubo con nanopartículas durante 30 minutos, ya que en experimentos anteriores se determinó, mediante el estudio de la cinética de adsorción, que en ese tiempo toda la catalasa ya se encuentra adsorbida. Para determinar la actividad de la catalasa presente en cada muestra en distintos días, se realizarán las mediciones mediante el método de la espuma, siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado correspondiente al ensayo de la curva de calibrado de la actividad de la catalasa (apartado 3.5.2.2.). Donde medirán los tres tubos correspondientes a cada una de las tres condiciones experimentales (Fig. 22).

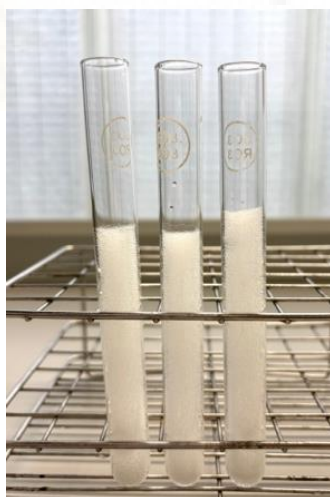
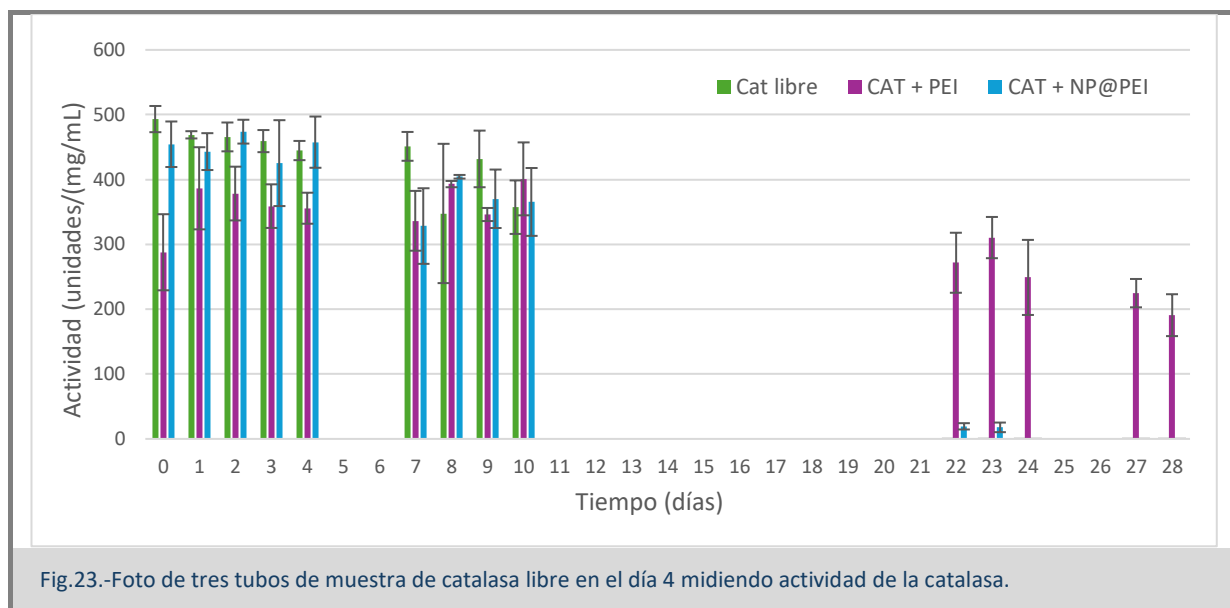


Fig.22.-Foto de tres tubos de muestra de catalasa libre en el día 4 midiendo actividad de la catalasa.

Estos datos se van recopilando a lo largo de 28 días, y los resultados se muestran en el siguiente gráfico de barras de la figura 23.



En los resultados se puede observar que, durante los primeros 10 días, la actividad enzimática medida en los tres grupos se mantiene prácticamente constante, incluso en algunos casos la catalasa libre muestra una actividad superior. Sin embargo, conforme transcurren los días, se puede observar como la actividad en la catalasa libre alcanza un valor nulo a partir del día 22, lo que indica su posible disociación, y en consecuencia, desnaturalización. Al perder su estructura tridimensional, el enzima deja de ser activo. En cambio, los resultados mostrados en la Fig. 23 indican que la catalasa unida a PEI mantiene su actividad hasta el final del ensayo (28 días), preservando prácticamente el 50 % de la actividad inicial pasado un mes de incubación. Esto se debe a que el PEI interacciona electrostáticamente con la catalasa, formando una capa protectora, como se ha demostrado en experimentos anteriores. Esta interacción estabiliza la conformación nativa de la proteína, inhibiendo tanto la disociación del enzima en sus monómeros como su agregación evitando, por tanto, su inactivación. Por tanto, la combinación de catalasa con PEI podría ser útil para conservar al enzima y se podría probar en otros medios o condiciones para ver si es capaz de mantener la catalasa activa.

Para el caso de la catalasa unida a las nanopartículas, se puede comprobar que al igual que la catalasa libre, los 10 primeros días presenta una actividad elevada, sin embargo a partir del día 22 la actividad ya es prácticamente inexistente. Sin embargo, existen fundadas sospechas que la incapacidad de detectar actividad enzimática de la catalasa formado parte del complejo $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}@$ catalasa tiene más que ver con un artefacto experimental que con la efectiva inactivación del enzima. Se observa una creciente tendencia debido a que al unirse la catalasa a la magnetita recubierta de PEI se produce la compensación de cargas de las superficies interaccionantes, la partícula resultante tiene una densidad de carga superficial muy pequeña lo que hace que aumente su carácter hidrofóbico. Como consecuencia, se observa una creciente tendencia de la partícula $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}@$ catalasa a adsorberse sobre la superficie de los tubos de polipropileno en los que se realizó la incubación. Esto se comprobó

con el tubo de control, el cual se preparó para medir la absorbancia del sobrenadante tras decantar el tubo en el día 0 y en el día 28 del experimento, para comprobar que durante todo el tiempo la catalasa seguía adsorbida a la $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$. Este tubo se preparó a las mismas concentraciones y volúmenes que el resto, la única diferencia que presentaba frente a los demás fue que contenía la mitad del volumen (1 mL) para la misma cantidad de nanopartículas, ya que se extrajo 1 mL en el día 0 para medir el sobrenadante. Sin embargo, en el día 28 seguía siendo homogéneo, es decir, no se habían pegado las nanopartículas a la pared del tubo. Al aplicar el método de la espuma ese mismo día, se vio que sí aparecían burbujas, lo que indica la presencia de catalasa activa. De hecho, dio un valor de 291 unidades de actividad, un valor muy superior al del mismo día obtenido con la muestra de catalasa con PEI que dio 191, es decir, el doble de actividad. La posible causa de este problema podría estar en las paredes hidrofóbicas de los tubos Eppendorf. Por resultados previos, nuestro sistema una vez que se une la catalasa presentaba carga positiva, por lo que podría interactuar con las paredes del tubo, quedándose adsorbido.

Por tanto, se puede confirmar que las nanopartículas son capaces de almacenar la catalasa preservando su actividad. Sin embargo, sería necesario encontrar un medio de almacenamiento con otros componentes y controlar las condiciones experimentales. Si esto no se soluciona, lo ideal sería probar con otro tipo de nanopartículas que presenten propiedades superficiales distintas, especialmente sus interacciones electrostáticas, para evitar adsorción con las paredes del tubo. En cuanto al PEI, se ha demostrado que es capaz de mantener la proteína activa en condiciones ambientales durante un periodo prolongado de tiempo.

4.3.5. Cinética de la actividad de la catalasa aumentando la temperatura

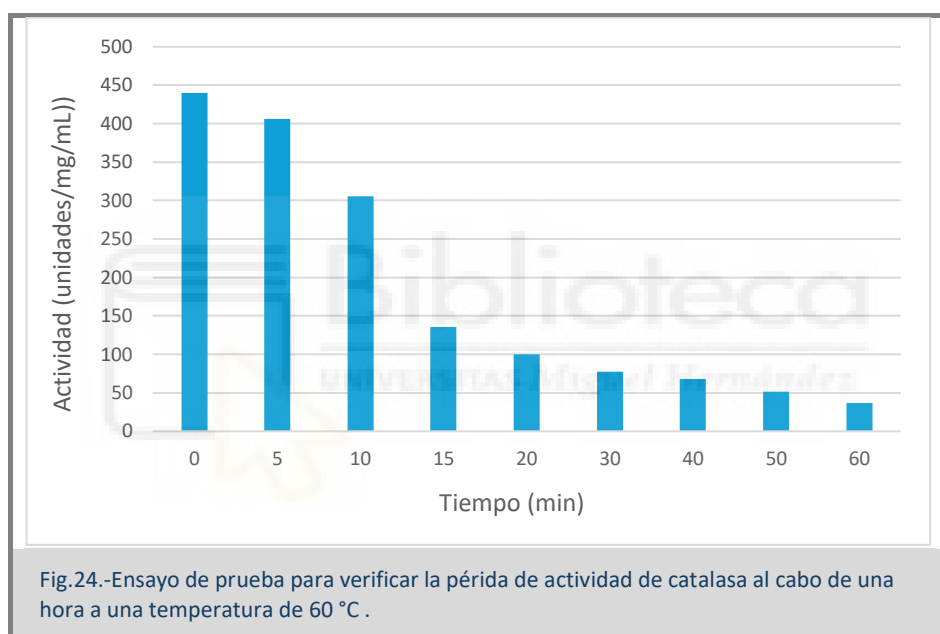
Una vez comprobada la capacidad del polielectrolito PEI y de las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ para almacenar y preservar la actividad enzimática en condiciones ambientales durante largos periodos de tiempo, esta capacidad vuelve a ponerse a prueba, esta vez sometiendo las muestras de diferentes condiciones a una temperatura de 60 °C durante una hora. El objetivo es continuar estudiando si estos sistemas serían métodos eficaces para mantener la actividad enzimática, por lo que se exponen a distintas condiciones adversas para comprobarlo. Si, además de ser resistentes al paso del tiempo, también lo fueran frente a otros factores como el aumento de temperatura, la utilidad que se les podría dar sería mucho mayor.

Para este ensayo, se empleará el mismo método utilizado hasta ahora para determinar la actividad: el método de la espuma. La actividad enzimática se medirá cada pocos minutos con el fin de observar cómo va disminuyendo en las tres condiciones establecidas previamente.

4.3.5.1. Prueba control

Para determinar si la temperatura a la que se va a realizar el experimento es la adecuada, es necesario llevar a cabo un ensayo previo utilizando únicamente catalasa libre. El objetivo es comprobar si, a medida que transcurre el tiempo a 60 °C, el enzima comienza a desnaturalizarse y pierde su actividad.

Es importante resaltar que el calentamiento de la catalasa a temperaturas cercanas o superiores a su temperatura de desplegamiento (alrededor de 60 °C en estas condiciones) supone el desplagamiento de la proteína y su posterior desnaturalización irreversible como consecuencia fundamentalmente de la agregación de la proteína desde estados parcialemnte deplagados. Como se observa en la Figura 24, la actividad de la catalasa disminuye alrededor de un 90 % tras su incubación a 60 °C. Es importante reseñar que la actividad específica es proporcional a la cantidad de enzima activa en cada momento.



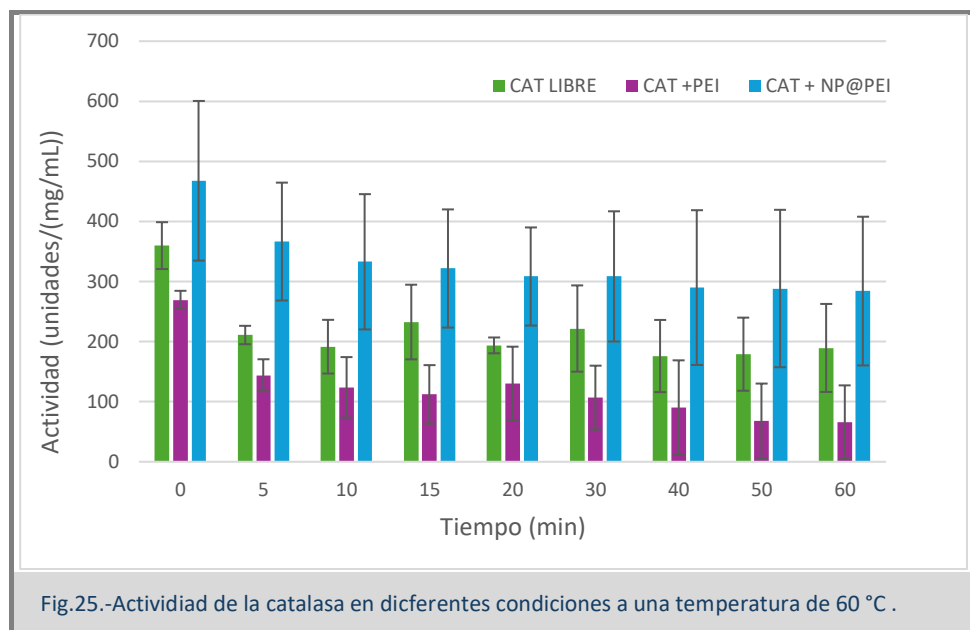
Tal y como se esperaba, se puede observar una notable disminución de la actividad de la catalasa a medida que transcurre el tiempo. Por tanto, se puede realizar el experimento planteado.

4.3.5.2. Ensayo

Una vez realizada la prueba con catalasa libre, se procede a plantear las tres condiciones del experimento anterior: catalasa libre, catalasa unida a PEI (PEI-catalasa) y catalasa unida a nanopartículas ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}@$ catalasa). Este experimento se llevará a cabo por triplicado (3 días diferentes) y durante 60 minutos. Posteriormente, se calculará el promedio de cada una de las condiciones, medidas en distintos tiempos.

Los resultados se muestran en la Fig. 25. Se observa claramente que la columna correspondiente a la catalasa unida a las nanopartículas, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}@$ catalasa, mantiene una actividad superior a la correspondiente a la proteína libre. Por tanto, se demuestra el efecto protector de la adsorción de la

catalasa para formar las partículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@PEI@catalasa}$, permitiendo el mantenimiento de un nivel de actividad mayor que el observado para el enzima libre.



En cuanto al complejo PEI-catalasa, presenta los valores de actividad más bajos, incluso por debajo de los obtenidos con la catalasa libre. Sin embargo, al revisar el experimento anterior (en el que se evaluaba la actividad de la catalasa a lo largo de varios días) se observa que el PEI sí logra mantenerla de forma más efectiva al incubarla a largo plazo. En cambio, al aumentar la temperatura en este nuevo ensayo, el polielectrolito parecería tener un efecto negativo sobre la actividad de la proteína sometida a estrés térmico. Pudiera ser que la catalasa se desnaturalizase parcialmente al ser calentada y que la flexibilidad del PEI estabilizase el estado desnaturalizado del enzima. Esto se debe a que cuando existen condiciones térmicas adversas, las proteínas como la catalasa necesitan cierta movilidad para reorganizar su estructura. Si esta reestructuración se limitara por la unión al polielectrolito, esto podría favorecer la inactivación térmica en lugar de prevenirla, o incluso inducir interacciones no específicas que puedan desestabilizar su conformación nativa cuando aumenta la temperatura.

Por tanto, la mayor actividad observada en la catalasa libre demuestra que, en ausencia del polielectrolito, el enzima conserva una mayor libertad conformacional para tolerar el estrés térmico. Así, se puede concluir que, aunque el PEI ofrece ventajas en la conservación de la actividad enzimática a largo plazo, no resulta eficaz como método de almacenamiento y protección bajo condiciones de temperatura elevada. En cambio, las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@PEI@catalasa}$ parecen demostrar que sí presentan efecto protector y de almacenamiento tanto a largo plazo como aumentando la temperatura.

5. Conclusiones

- 1.- Tanto las partículas de magnetita recubierta de PEI, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$, como el polielectrolito libre, PEI, son capaces de adsorber catalasa a pH fisiológico.
- 2.- La catalasa muestra un elevado nivel de actividad tanto cuando forma complejos con el PEI, catalasa-PEI, como cuando se encuentra adsorbida a las partículas de magnetita, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}@$ catalasa.
- 3.- Durante el almacenamiento del enzima durante periodos prolongados de tiempo a temperatura ambiente, la catalasa libre disminuye su actividad quedando completamente inactivada pasados 20 días.
- 4.- La formación del complejo PEI-catalasa tiene un efecto protector manteniendo de forma efectiva la actividad de la catalasa observándose el mantenimiento de alrededor del 50 % de su actividad inicial tras 28 días de almacenamiento.
- 5.- Los resultados obtenidos para la catalasa unida a las nanopartículas de magnetita, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}@$ catalasa, se vieron enmascarados por la adsorción de las partículas resultantes a la superficie de los tubos de polipropileno. Resultados cualitativos parecen indicar el mantenimiento de parte de la actividad tras el almacenamiento aunque la hidrofobicidad de las partículas impidió obtener un resultado cuantitativo.
- 6.- La adsorción de la catalasa a las partículas de magnetita, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}@$ catalasa, permite mantener una elevada actividad del enzima sometido a estrés térmico (más del 60 % de su actividad inicial tras 1 h de incubación a 60 °C), significativamente mayor que la observada para la catalasa en disolución.
- 7.- La formación de complejos entre el PEI y la catalasa, PEI-catalasa, tiene un efecto negativo sobre el mantenimiento de la actividad del enzima sometida a estrés térmico.

6. Proyecciones futuras

Por todos estos motivos, y con el objetivo de alcanzar un efecto real de almacenamiento y protección de la catalasa, sería conveniente plantear una serie de modificaciones tanto en las condiciones del experimento como en los materiales y métodos empleados.

En primer lugar, para mejorar el sistema de protección basado en el método de recubrimiento capa a capa, sería recomendable probar con polímeros neutros, ya que tanto polielectrolitos catiónicos como aniónicos no han dado buen resultado. Entre ellos se podría probar el polietilenglicol (PEG), ampliamente usado para modificar la superficie de una nanopartícula (PEGilación) con el objetivo de

mejorar su capacidad para ser utilizada en *drug delivery* [42]. Así podría proteger el enzima sin llegar a desplazarlo de la superficie de la nanopartícula.

Por otro lado, se ha visto que uno de los principales problemas es la adsorción a las paredes de los tubos Eppendorf, cuando el enzima ha sido adsorbido sobre la nanopartícula. Para ello, se podrían utilizar tubos comerciales de *low binding*, o tratar la superficie de los tubos con direntes polielectrolitos de tal forma que no se produzca dicha adsorción.

Además, sería interesante realizar experimentos bajo condiciones extremas de pH, especialmente alrededor de pH 3, donde la catalasa tiende a disociarse, con el fin de comprobar si los métodos empleados son realmente capaces de estabilizar el enzima y preservar su estabilidad.

En conjunto, estas estrategias podrían mejorar considerablemente la eficacia de los métodos de protección de la catalasa, así como completar el estudio que permita su almacenamiento prolognado en el tiempo para mantener su actividad biológica.



7. Bibliografía

- [1] F. J. Heiligt y M. Niederberger, «The fascinating world of nanoparticle research», *Mater. Today*, vol. 16, n.º 7-8, pp. 262-271, jul. 2013, doi: 10.1016/j.mattod.2013.07.004.
- [2] R. P. Feynman, «There's plenty of room at the bottom: An invitation to enter a new field of physics», *Resonance*, vol. 16, n.º 9, pp. 890-905, 1960, doi: 10.1007/s12045-011-0109-x.
- [3] N. Taniguchi, «On the Basic Concept of "Nano-Technology"», London 1974.
- [4] A. López-Serrano, R. M. Olivas, J. S. Landaluze, y C. Cámara, «Nanoparticles: a global vision. Characterization, separation, and quantification methods. Potential environmental and health impact», *Anal Methods*, vol. 6, n.º 1, pp. 38-56, 2014, doi: 10.1039/C3AY40517F.
- [5] J. A. Rodríguez y M. Fernández-García, «SYNTHESIS, PROPERTIES, AND APPLICATIONS OF OXIDE NANOMATERIALS».
- [6] R. A. Sperling y W. J. Parak, «Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles», *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 368, n.º 1915, pp. 1333-1383, mar. 2010, doi: 10.1098/rsta.2009.0273.
- [7] R. Chaudhary, K. Nawaz, A. K. Khan, C. Hano, B. H. Abbasi, y S. Anjum, «An Overview of the Algae-Mediated Biosynthesis of Nanoparticles and Their Biomedical Applications», *Biomolecules*, vol. 10, n.º 11, p. 1498, oct. 2020, doi: 10.3390/biom10111498.
- [8] W. Wu, Z. Wu, T. Yu, C. Jiang, y W.-S. Kim, «Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications», *Sci. Technol. Adv. Mater.*, vol. 16, n.º 2, p. 023501, abr. 2015, doi: 10.1088/1468-6996/16/2/023501.
- [9] W. Wu, Q. He, y C. Jiang, «Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies», *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 3, n.º 11, p. 397, nov. 2008, doi: 10.1007/s11671-008-9174-9.
- [10] Á. Valls-Chivas, J. Gómez, J. I. García-Peiro, F. Hornos, y J. L. Hueso, «Enzyme–Iron Oxide Nanoassemblies: A Review of Immobilization and Biocatalytic Applications», *Catalysts*, vol. 13, n.º 6, p. 980, jun. 2023, doi: 10.3390/catal13060980.
- [11] A. Akbarzadeh, M. Samiei, y S. Davaran, «Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine», *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 7, n.º 1, p. 144, dic. 2012, doi: 10.1186/1556-276X-7-144.
- [12] J. Nowak-Jary y B. Machnicka, «Pharmacokinetics of magnetic iron oxide nanoparticles for medical applications», *J. Nanobiotechnology*, vol. 20, n.º 1, p. 305, dic. 2022, doi: 10.1186/s12951-022-01510-w.
- [13] V. Hlady y J. Buijs, «Protein adsorption on solid surfaces», *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 7, n.º 1, pp. 72-77, feb. 1996, doi: 10.1016/S0958-1669(96)80098-X.
- [14] L. P. Kozłowski, «IPC – Isoelectric Point Calculator», *Biol. Direct*, vol. 11, n.º 1, p. 55, dic. 2016, doi: 10.1186/s13062-016-0159-9.
- [15] M. Rabe, D. Verdes, y S. Seeger, «Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces», *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 162, n.º 1-2, pp. 87-106, feb. 2011, doi: 10.1016/j.cis.2010.12.007.
- [16] T. Kruk, K. Chojnacka-Górka, M. Kolasinska-Sojka, y S. Zapotoczny, «Stimuli-responsive polyelectrolyte multilayer films and microcapsules», *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 310, p. 102773, dic. 2022, doi: 10.1016/j.cis.2022.102773.
- [17] J. Potaś y K. Winnicka, «The Potential of Polyelectrolyte Multilayer Films as Drug Delivery Materials», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, n.º 7, p. 3496, mar. 2022, doi: 10.3390/ijms23073496.
- [18] K. Podgórna y K. Szczepanowicz, «Synthesis of polyelectrolyte nanocapsules with iron oxide (Fe₃O₄) nanoparticles for magnetic targeting», *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 505, pp. 132-137, sep. 2016, doi: 10.1016/j.colsurfa.2016.02.017.
- [19] O. Sreekanth Reddy, M. C. S. Subha, T. Jithendra, C. Madhavi, y K. Chowdoji Rao, «Curcumin encapsulated dual cross linked sodium alginate/montmorillonite polymeric composite beads for controlled drug delivery», *J. Pharm. Anal.*, vol. 11, n.º 2, pp. 191-199, abr. 2021, doi: 10.1016/j.jpha.2020.07.002.
- [20] K. Adamiak y A. Sionkowska, «State of Innovation in Alginate-Based Materials», *Mar. Drugs*, vol. 21, n.º 6, p. 353, jun. 2023, doi: 10.3390/md21060353.
- [21] J. Casper, S. H. Schenk, E. Parhizkar, P. Detampel, A. Dehshahri, y J. Huwyler, «Polyethylenimine (PEI) in gene therapy: Current status and clinical applications», *J. Controlled Release*, vol. 362, pp. 667-691, oct. 2023, doi: 10.1016/j.jconrel.2023.09.001.
- [22] O. Boussif *et al.*, «A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine.», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 92, n.º 16, pp. 7297-7301, ago. 1995, doi: 10.1073/pnas.92.16.7297.

- [23] J. Krych y L. Gebicka, «Catalase is inhibited by flavonoids», *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 58, pp. 148-153, jul. 2013, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.03.070.
- [24] M. H. Hadwan, «Simple spectrophotometric assay for measuring catalase activity in biological tissues», *BMC Biochem.*, vol. 19, n.º 1, p. 7, dic. 2018, doi: 10.1186/s12858-018-0097-5.
- [25] K. R. Olson *et al.*, «Catalase as a sulfide-sulfur oxido-reductase: An ancient (and modern?) regulator of reactive sulfur species (RSS)», *Redox Biol.*, vol. 12, pp. 325-339, ago. 2017, doi: 10.1016/j.redox.2017.02.021.
- [26] A. Malik, A. M. Al-Amri, A. Alhomida, y J. M. Khan, «Bovine liver catalase turns into three conformational states after exposure to an anionic surfactant», *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 229, p. 113481, sep. 2023, doi: 10.1016/j.colsurfb.2023.113481.
- [27] T. Iwase *et al.*, «A Simple Assay for Measuring Catalase Activity: A Visual Approach», *Sci. Rep.*, vol. 3, n.º 1, p. 3081, oct. 2013, doi: 10.1038/srep03081.
- [28] M. H. Hadwan y H. N. Abed, «Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity», *Data Brief*, vol. 6, pp. 194-199, mar. 2016, doi: 10.1016/j.dib.2015.12.012.
- [29] L. Zhu *et al.*, «Stabilization of Multimeric Proteins via Intersubunit Cyclization», *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 83, n.º 18, pp. e01239-17, sep. 2017, doi: 10.1128/AEM.01239-17.
- [30] K. Prakash, S. Prajapati, A. Ahmad, S. K. Jain, y V. Bhakuni, «Unique oligomeric intermediates of bovine liver catalase».
- [31] P. Jones, R. H. Pain, y A. Suggett, «Dissociation of Catalase: A Correlation Between Changes in Sedimentation and Spectroscopic Properties Accompanying Dissociation of Bacterial Catalase in Alkaline Solution», *Biochem. Soc. Lond.*, vol. 118, pp. 319-323, 1970.
- [32] T. Samejima y J. T. Yang, «Reconstitution of Acid-denatured Catalase», *J. Biol. Chem.*, vol. 238, n.º 10, pp. 3256-3261, oct. 1963, doi: 10.1016/S0021-9258(18)48655-3.
- [33] T. Samejima, M. Kamata, y K. Shibata, «Dissociation of Bovine Liver Catalase at Low pH», *J. Biochem. (Tokyo)*, vol. 51, n.º 3, pp. 181-187, mar. 1962, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a127518.
- [34] Mary E Krause y Erinc Sahin, «Chemical and physical instabilities in manufacturing and storage of therapeutic proteins», *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 60, pp. 159-167, dic. 2019.
- [35] T. Sugimoto y E. Matijević, «Formation of uniform spherical magnetite particles by crystallization from ferrous hydroxide gels», *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 74, n.º 1, pp. 227-243, mar. 1980, doi: 10.1016/0021-9797(80)90187-3.
- [36] F. Vereda, J. de Vicente, y R. Hidalgo-Alvarez, «Oxidation of ferrous hydroxides with nitrate: a versatile method for the preparation of magnetic colloidal particles», *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 392, pp. 50-56, feb. 2013, doi: 10.1016/j.jcis.2012.09.064.
- [37] N. Farkas y J. A. Kramar, «Dynamic light scattering distributions by any means», *J. Nanoparticle Res.*, vol. 23, n.º 5, p. 120, may 2021, doi: 10.1007/s11051-021-05220-6.
- [38] S. K. Filippov *et al.*, «Dynamic light scattering and transmission electron microscopy in drug delivery: a roadmap for correct characterization of nanoparticles and interpretation of results», *Mater. Horiz.*, vol. 10, n.º 12, pp. 5354-5370, 2023, doi: 10.1039/D3MH00717K.
- [39] M. A. S. Abourehab *et al.*, «Alginate as a Promising Biopolymer in Drug Delivery and Wound Healing: A Review of the State-of-the-Art», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, n.º 16, p. 9035, ago. 2022, doi: 10.3390/ijms23169035.
- [40] Jens Casper, Susanne H. Schenk, Elahehnaz Parhizkar, Pascal Detampel, Ali Dehshahri, y Jörg Huwyler, «Polyethylenimine (PEI) in gene therapy: Current status and clinical applications», *J. Controlled Release*, vol. 362, pp. 667-691, oct. 2023.
- [41] N. Hoshyar, S. Gray, H. Han, y G. Bao, «The Effect of Nanoparticle Size on *In Vivo* Pharmacokinetics and Cellular Interaction», *Nanomed.*, vol. 11, n.º 6, pp. 673-692, mar. 2016, doi: 10.2217/nnm.16.5.
- [42] A. A. D'souza y R. Shegokar, «Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications», *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 13, n.º 9, pp. 1257-1275, sep. 2016, doi: 10.1080/17425247.2016.1182485.