

**USO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECUBIERTAS CON UN
POLIELECTROLITO CATIÓNICO COMO ADSORBENTE PARA LA
ELIMINACIÓN DE CONTAMINANTES EN AGUAS Y COMO SISTEMA DE
ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE LA OPSONIZACIÓN**

TRABAJO FIN DE GRADO

Autor: José Manuel Magdaleno Puche

Tutora académica: Rocío Esquembre Tomé

Co-Tutor: Felipe Hornos Adán

Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente

Área de Química Física

Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC)

Grado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Experimentales

Curso académico 2016/2017

Índice

Resumen	2
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Síntesis de nanopartículas magnéticas.....	3
Revestimiento.....	4
Aplicaciones en aguas residuales.....	6
Aplicaciones biomédicas.....	8
Isoterma de Langmuir.....	11
Antecedentes y objetivos	13
Materiales y métodos	14
Obtención de nanopartículas de óxido de hierro (IONP).	14
Cuantificación de nanopartículas desnudas por residuo seco	14
Recubrimiento de IONP con polielectrolito.....	14
Purificación de las IONP.....	14
Cuantificación espectrofotométrica de nanopartículas recubiertas mediante formación de un complejo con KSCN.....	15
Medida de tamaño por DLS.....	16
Medida de carga superficial por potencial Z	17
Estabilidad coloidal.....	17
Adsorción Trypan Blue.....	18
Eliminación/Recuperación de <i>Trypan Blue</i>	18
Tratamiento con PEG.....	18
Adsorción β -lactoglobulina.....	18
Resultados experimentales.....	19
Determinación del comportamiento de las IONP@PAAH después de la purificación	19
Tratamiento de aguas residuales: recuperación de <i>Trypan Blue</i>	23
Estudio de la opsonización con una proteína modelo, la β -lactoglobulina.....	24
Discusión de los resultados.....	28
Determinación del comportamiento de las IONP@PAAH después de la purificación	28
Tratamiento de aguas residuales: adsorción/recuperación de <i>Trypan Blue</i>	31
Estudio de la opsonización con una proteína modelo, la β -lactoglobulina.....	32
Conclusiones y proyección futura.....	34
Bibliografía	35

Resumen

Se ha llevado a cabo la síntesis de nanopartículas magnéticas y su recubrimiento mediante el uso de un polielectrolito de carga positiva, el hidrocloreuro de polialilamina (PAAH). La capacidad de adsorción *in vitro* de estas nanopartículas se ha estudiado con dos finalidades distintas: el tratamiento de aguas contaminadas y la prevención de la opsonización mediante el tratamiento con polietilenglicol (PEG). En el estudio de aguas contaminadas se ha empleado como molécula modelo el *Trypan Blue* por ser un colorante orgánico de bajo peso molecular con interés industrial, mientras que para el estudio de la opsonización se ha trabajado con la β -lactoglobulina, como proteína modelo, examinando el efecto del PEG sobre la reducción de la opsonización. Los resultados han sido modelizados mediante una aproximación de la isoterma de Langmuir, obteniéndose que dichas nanopartículas presentan gran potencial para la eliminación y recuperación de moléculas contaminantes en agua. La capacidad máxima de adsorción fue de 0,50 $\mu\text{g Trypan Blue}/\mu\text{g}$ nanopartículas. En ensayos preliminares se logró una eliminación >99% y una recuperación posterior >34% del colorante. Por otro lado, se ha determinado que el tratamiento con polietilenglicol sobre nanopartículas ya recubiertas no es capaz de evitar el fenómeno de opsonización, en las condiciones estudiadas.

Abstract

Magnetic nanoparticles composed by a magnetite, Fe_3O_4 , core have been synthesized and they have been coated with a cationic polyelectrolyte, polyallylamine hydrochloride (PAAH), in order to increase their colloidal stability and provide some new functionalities. The *in vitro* adsorption capacity of these nanoparticles has been studied in order to evaluate their possible use in the decontamination of industrial wastewaters containing large quantities of anionic contaminants. Trypan Blue, an organic dye currently used in both the laboratory and the textile industry, was used as a model adsorbate. The adsorption of the dye to the polyelectrolyte-coated nanoparticle was modelled by the Langmuir isotherm showing that these nanoparticles have a great potential for the elimination of the dye from the aqueous solution and its later recovery. One gram of coated nanoparticle was able to adsorb 0.50 grams of dye with a 99% dye removal and a subsequent 34% recovery under the experimental conditions. On the other hand, the adsorption of β -lactoglobulin, an anionic protein at physiological pH, has been studied in order to clarify if neutral polymers such polyethylenglycol (PEG) could protect the nanoparticle from the adsorption of other proteins in a biological media (opsonization). It was shown that preventive treatment of PAAH-coated nanoparticles with PEG has a negligible effect on the adsorption of the protein.

Palabras clave: nanopartículas magnéticas, *Trypan Blue*, β -lactoglobulina, polietilenglicol, hidrocloreuro de polialilamina (PAAH), capacidad máxima de adsorción ($q_{\text{máx}}$).

Introducción

Las nanopartículas son de gran interés en investigación debido a que las propiedades de las partículas de escala nanométrica son distintas de los materiales macroscópicos. Existe un tipo concreto de nanopartículas que poseen grandes propiedades magnéticas y que son denominadas nanopartículas magnéticas. En la naturaleza, las más comunes son la magnetita, maghemita y hematita, pero las más conocidas y estudiadas son la magnetita (Fe_3O_4) y la maghemita ($\gamma-Fe_2O_3$) por tres características principalmente: su tamaño nanométrico, su ratio superficie-volumen y su supermagnetismo^{1,2}. Estas partículas, conocidas también como ferrofluidos, son especialmente sensibles a campos magnéticos externos, por lo que les otorga una amplia variedad de posibles aplicaciones en múltiples campos^{3,4}.

Síntesis de nanopartículas magnéticas

Se han desarrollado diversas formas de fabricar nanopartículas de óxido de hierro que establecen una serie de características definidas de la muestra obtenida dependiendo del método empleado. Existen métodos de síntesis por coprecipitación, por reacción a altas temperaturas, electroquímicos, mediante procesos sol-gel, en medios confinados, por inyecciones de flujo, con polioles como disolvente, por aerosoles y por sonolisis o termólisis de organometálicos⁵⁻¹². Se describen brevemente a continuación los métodos más destacados:

1. Síntesis por coprecipitación

Se trata del método más simple de obtención de nanopartículas de hierro. Se emplea una disolución acuosa de sales de hierro (II) y hierro (III) según indica la reacción:



Las condiciones óptimas son un pH comprendido entre 8 y 14, con una estequiometría 2:1 de $Fe^{3+}:Fe^{2+}$ y en una atmósfera no oxidante para evitar la oxidación parcial de la magnetita (color negro) en maghemita (color rojizo).

En el método de coprecipitación intervienen dos procesos: en primer lugar se daría la nucleación del cristal, y en segundo, el crecimiento del mismo. Estos dos procesos deben estar separados preferiblemente, de modo que no se dé nucleación durante el crecimiento. La principal ventaja de este método es que se puede obtener grandes cantidades de nanopartículas, aunque el control sobre el tamaño es limitado⁵.

2. Reacciones en medios confinados

Este tipo de reacciones fueron diseñadas para tener un mayor control sobre el tamaño de las partículas sintetizadas, pero se trata de medios más complejos. Las reacciones en entornos limitados incluyen surfactantes para crear micelas reversas en solventes apolares, reacciones en el interior de apoferritina, dendrímeros, emulsiones o membranas fosfolipídicas¹³⁻¹⁵. Un ejemplo, serían magneto-dendrímeros obtenidos en disolución acuosa de tamaño 8 nm (caracterizado por TEM) y de radio hidrodinámico 20-30 nm¹⁶.

3. Reacciones a alta temperatura

A temperaturas altas y presiones controladas se pueden obtener nanopartículas de óxido de hierro mediante un mecanismo parecido al método de la coprecipitación. Este método permite variar la temperatura y tiempo de síntesis para obtener tamaños variables. Además, el uso de surfactantes y componentes orgánicos permite obtener nanopartículas de monodispersidad muy alta por descomposición de precursores orgánicos, como $\text{Fe}(\text{CO})_5$ ^{17, 18}.

4. Sol-gel

El proceso sol-gel se basa en la hidroxilación y condensación de precursores. La polimerización inorgánica crea una fase llamada gel húmedo, pero es necesario el empleo de tratamientos con calor para obtener las nanopartículas en su estado cristalino. Este método ofrece varias ventajas como la obtención de fases amorfas, la monodispersidad obtenida, el control sobre el tamaño o recubrir mientras las partículas se encuentran en la fase de gel en la matriz. Sin embargo, hay una gran cantidad de variables que deben ser controladas (temperatura, pH, sales, agitación etc.)¹⁹.

5. Síntesis mediante polioles

El método de polioles tiene grandes similitudes con el proceso de sol-gel. En este método se usan polioles como el polietilenglicol para disolver las partículas, por lo que cumple dos funciones: disolver y estabilizar.

El precursor se introduciría disuelto en un poliol en agitación y a temperatura superior al punto de ebullición del poliol empleado. La alta temperatura hace que las partículas sintetizadas sean altamente cristalinas y además son estabilizadas in situ por el disolvente¹⁰.

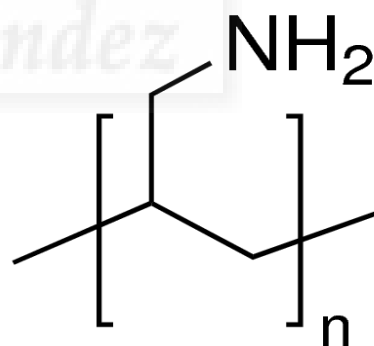
Revestimiento

Con el objetivo de funcionalizar la superficie de las nanopartículas y estabilizarlas se han desarrollado múltiples vías de recubrimiento de la superficie. Usualmente estos métodos se

clasifican en función del tipo de molécula empleada para el recubrimiento pudiendo distinguir a groso modo los siguientes tipos:

1. Moléculas orgánicas no poliméricas: se emplean usualmente surfactantes como el ácido oleico ya que la superficie de las nanopartículas no recubiertas son altamente hidrofóbicas²⁰
2. Moléculas inorgánicas: algunos recubrimientos estudiados son el oro, la sílice y el gadolinio que permiten la funcionalización de la superficie para la unión de moléculas específicas para distintas aplicaciones²¹⁻²³
3. Polímeros orgánicos e inorgánicos: de todos los recubrimientos, posiblemente los más empleados son los poliméricos, existiendo varias subclasificaciones atendiendo a si son polímeros naturales o sintéticos, simples o ramificados, etc. Los polímeros neutros estabilizan las nanopartículas por impedimento estérico, mientras que los polímeros cargados, conocidos como polielectrolitos, estabilizan adicionalmente por repulsión electrostática. Los polímeros más empleados son polivinilpirrolidona (PVP), polietilenglicol (PEG), polivinilalcohol (PVA), heteropolímeros de etileno-vinil acetato y lactato-glicolato, gelatina, dextrano y quitosano. Además, estos polímeros pueden ser empleados a su vez para unir moléculas específicas como anticuerpos, proteínas o moléculas de interés mediante enlaces amida u otro tipo de enlaces²⁴⁻³¹.

Concretamente, se le va a prestar especial atención al hidrocloreuro de polialilamina (PAAH) ya que va a ser el recubrimiento empleado en este trabajo. El PAAH es un polielectrolito lineal cuyo monómero contiene una amina primaria. El monómero posee un pKa de 9,49³², mientras que el polímero tiene un pKa estimado experimentalmente entre 8,0 y 9,0³³ que en disolución puede presentarse disociado parcial o



*Estructura molecular del hidrocloreuro de polialilamina (PAAH).
Imagen procedente de Sigma Aldrich*

totalmente. Se trata de un polímero que en disolución acuosa tendrá carga positiva, por lo que se le clasifica como polielectrolito sintético catiónico. La gran densidad de cargas que aportan este tipo de polielectrolitos los hace idóneos para el recubrimiento de superficies cargadas con una gran afinidad provocando la estabilización de las nanopartículas y la exposición al disolvente de las cargas del polielectrolito.

Aplicaciones en aguas residuales

Dentro de las posibles aplicaciones medioambientales de las nanopartículas magnéticas, el tratamiento de aguas residuales es seguramente la principal aplicación desarrollada. Se han estudiado para la eliminación de xenobióticos³⁴, contaminantes orgánicos^{35, 36} y metales pesados³⁷ mediante varias estrategias de aplicación de las nanopartículas.

La capacidad de adsorción y la recuperación magnética hace viable el empleo de estas partículas para tratar grandes cantidades de aguas residuales^{38, 39}.

Los métodos empleados tienen fundamentalmente dos enfoques: emplear las nanopartículas para adsorber y retirar compuestos de las aguas residuales y emplear las nanopartículas como catalizadores que transformen compuestos en derivados menos tóxicos, aunque pueden existir tecnologías que incorporen ambas estrategias⁴⁰.

1. Nanopartículas como catalizadores

Se ha probado la capacidad de las partículas de hierro para la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y para pesticidas. La degradación se lleva a cabo porque el hierro es un agente reductor bastante fuerte que es capaz de reaccionar con estos compuestos³⁴. Se han propuesto varios tipos de óxidos de hierro para tecnologías de fotocatalisis como α -Fe₂O₃, γ -Fe₂O₃, α -FeOOH, β -FeOOH and γ -FeOOH⁴¹. Se han descrito aplicaciones de nanopartículas de óxido de hierro como fotocatalizadores de varios colorantes como el *Congo red*⁴² o *Blue 79 azo*⁴³. Para el segundo colorante mencionado las nanopartículas que se emplearon eran bimetalicas de hierro y oro y se iluminaron con luz ultravioleta.

Además, se ha identificado un fenómeno de interacción entre los óxidos de hierro (III) y oxalato que producen complejos y tras varios pasos de descomposición se liberan radicales libres de oxígeno como peróxido de hidrógeno, ion superóxido y radicales hidroxilo que pueden ser empleados para transformar contaminantes en derivados menos tóxicos⁴⁴.

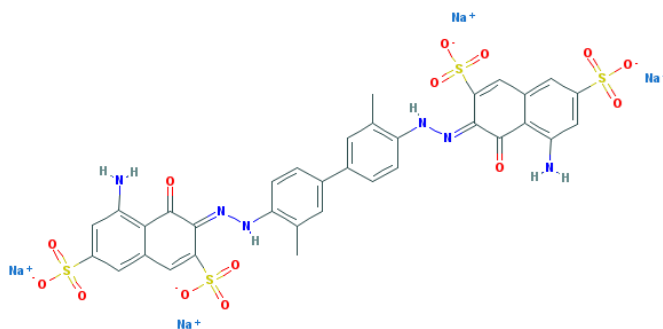
2. Nanopartículas como adsorbentes

Los metales pesados también pueden ser eliminados mediante nanopartículas de óxido de hierro. La estrategia principal en este caso es modificar la superficie de las partículas con agentes que sean capaces de captar específicamente metales pesados. La gran ratio que poseen en superficie-volumen las hace ideales para esta función porque les otorga una capacidad de adsorción muy alta. Se ha estudiado para plomo, mercurio, cobre y cobalto con diferentes resultados dependiendo de la afinidad del metal por la superficie de la partícula⁴⁵. Para la adsorción de iones de tetracloro áurico (AuCl₄⁻) se prepararon derivados con grupos

tiol y se consiguió una adsorción de 115 mg/g⁴⁶, mientras que para la adsorción de Ni(II) se observó que la adsorción es pH dependiente y que se pueden reciclar las nanopartículas mediante un tratamiento con HCl 0.1 M⁴⁷. Más ejemplos se han datado como la adsorción y recuperación de As(V) y Cr(VI)^{48,49}, pero por interacción electrostática con nanopartículas de maghemita.

Trypan Blue como molécula contaminante modelo

El colorante Trypan Blue es una molécula orgánica de pequeño tamaño capaz de absorber en el rango de 600 nm, lo que le otorga su característico color azul intenso. Esta molécula, de fórmula molecular $C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$, contiene en su estructura cuatro grupos sulfonato por lo que en disolución acuosa tendrá carga neta negativa.



Estructura molecular del Trypan Blue.
Imagen procedente de PubChem

Se trata de un colorante ampliamente utilizado para ensayos de viabilidad celular⁵⁰, pero también puede ser empleado para observar hifas fúngicas⁵¹, o como guía visual en cirugía para cataratas⁵². Además, ya era empleado a principios del siglo XX en experimentos que permitieron deducir la existencia de la barrera hematoencefálica⁵³.

Sin embargo, este agente químico posee cierta toxicidad. Está clasificado como carcinógeno tipo 2B y se ha detallado que también actúa como teratogénico en animales⁷². Esto hace que su eliminación deba ser regulada y controlada.

Por lo tanto, el hecho de que sea un colorante, con carga negativa en un amplio rango de pH y con interés comercial en su eliminación, hace que sea un modelo óptimo para su estudio. Por un lado, su cuantificación será medida por espectrofotometría visible de forma sencilla y directa. Además, se espera que se una a las nanopartículas empleadas por interacción electrostática debido a su pH y sin grandes problemas de impedimento estérico debido a su reducido tamaño. Finalmente, mediante estudio de este colorante se pueden extraer conclusiones que sean aplicables a otros compuestos aniónicos.

Aplicaciones biomédicas

Las principales aplicaciones de este tipo de nanomateriales en clínica son: inducción de hipertermia, potenciadores de la imagen por resonancia magnética y como vehiculizadores de fármacos, proteínas, péptidos, DNA o RNA. Sin embargo, aunque la estabilización de las nanopartículas en disolución es un hecho que se puede dar por superado, tras una inyección intravenosa de las nanopartículas de óxido de hierro las nanopartículas son expuestas a una serie de procesos que reducen su viabilidad en la actualidad. La adsorción de proteínas en el plasma, la opsonización y la eliminación por células fagocíticas son tres factores clave y suponen desafíos que todavía se tienen que optimizar⁵⁴. Por otro lado, ya hemos mencionado que existen varios métodos que nos permiten alterar estos factores y se están realizando grandes esfuerzos en poder aplicar las nanopartículas magnéticas en clínica.

Nanopartículas magnéticas como vehiculizadores

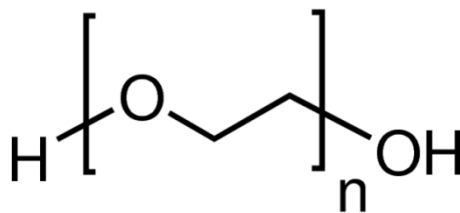
La gran superficie que poseen las nanopartículas y poder dirigirlas a zonas específicas con un campo magnético externo son los principales atractivos para emplear estos materiales como transportadoras de moléculas^{55, 56}. Algunas posibles aplicaciones directas del transporte dirigido de fármacos son:

1. Dirigir fármacos antitumorales específicamente al tumor, lo que permitiría una menor exposición del fármaco a los tejidos sanos y por lo tanto una reducción drástica de los efectos dañinos este tipo de fármacos⁷³.
2. Reversión de resistencia múltiple en células tumorales. Este punto está siendo abordado desde muchos enfoques distintos, pero el relativo a las nanopartículas estaría bajo la premisa de que la p-glicoproteína (causante mayoritaria de la multirresistencia) sería capaz de eliminar el fármaco de la célula cuando se encuentra en membrana y no cuando ya se localiza en el interior celular⁷³.
3. Administración de genes. Como componentes empleados en nuevos tipos de vacunas y en terapia génica, usualmente deben ser dirigidas a un órgano específico. Es posible emplear las nanopartículas magnéticas para producir una magnetofección y evitar vectores víricos⁵⁷.

Opsonización

Para la mayoría de las aplicaciones biomédicas, el principal problema que debe ser solucionado es la escasa vida media que presentan las nanopartículas magnéticas en sangre. Uno de los procesos principales que actúan sobre la vida media es la opsonización y fagocitosis de las nanopartículas. Los macrófagos son capaces de eliminar las nanopartículas de la sangre

en segundos cuando no se encuentran protegidas ni recubiertas⁵⁸ haciendo que no sean útiles para el transporte de ningún fármaco. Las células fagocíticas son capaces de reconocer las nanopartículas debido a la adhesión de proteínas opsonizantes que se unen a su superficie⁵⁹. Por lo tanto, una de las estrategias a seguir es la ocultación de las partículas mediante la modificación de su superficie para que este tipo de proteínas no se puedan adherir. El recubrimiento con polietilenglicol es uno de los métodos que mejores resultados ha tenido, ya que se trata de un polímero hidrofílico, soluble en agua y muy biocompatible que además es capaz de estabilizar las nanopartículas no recubiertas^{60,61}. Se ha demostrado que el polietilenglicol es capaz de aumentar la vida media de las nanopartículas en sangre, y que también reduce la fagocitosis por macrófagos y monocitos^{58,62}.



*Estructura molecular del polietilenglicol.
Imagen procedente de Sigma Aldrich*

β -Lactoglobulina como proteína modelo

La β -lactoglobulina es uno de los componentes principales del contenido proteico de la leche de rumiantes y de algunos mamíferos que se ha empleado sistemáticamente como modelo para estudios bioquímicos y biofísicos de unión, plegamiento, estabilidad y auto-dimerización⁶³. Sin embargo, a pesar de las altas concentraciones de dicha proteína en la leche, no se ha determinado ninguna función específica de la misma, pero se ha asociado a varias funciones como la dieta y al transporte de diversos tipos de compuestos como retinol, ácidos grasos y moléculas no polares⁶⁴.

Existen dos variantes genéticas de la β -lactoglobulina de suero bobino que se han clasificado como subtipos A y B que difieren en 2 aminoácidos de los 162 residuos que posee la proteína. La estructura secundaria presente en esta proteína se caracteriza por el barril β , compuesto por 8 láminas β antiparalelas⁶⁵ seguido por una hélice α y una lámina β (ver figura 1).

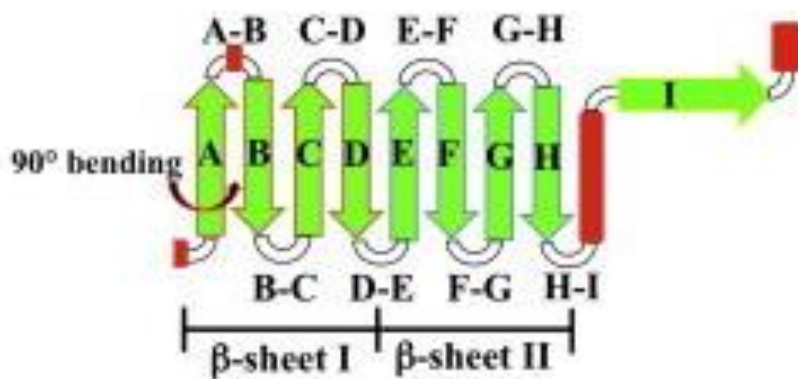


Figura 1. Representación esquemática de la topología de la β -lactoglobulina. Las hélices α se representan en rojo, las láminas β en verde, y los bucles y giros en blanco. La cadena I está involucrada en formación del dímero, mientras que las cadenas A-H se pliegan en dos hojas β (cadenas A_N -D y E-H- A_C donde A_N y A_C son las regiones N-terminal y C-terminal respectivamente⁶⁵.

No obstante, se ha estudiado que para pH inferiores a 3 la proteína se encuentra principalmente en forma monomérica, mientras que para pH superiores la forma principal es dimérica, pudiendo presentar octámeros favorecidos por la temperatura^{65,66}. La estabilidad del dímero viene dada por la interacción de los monómeros mediante 12 enlaces de hidrógeno y 2 puentes salinos. Se muestra en la figura 2 los puentes salinos que intervienen en la dimerización⁶⁶.

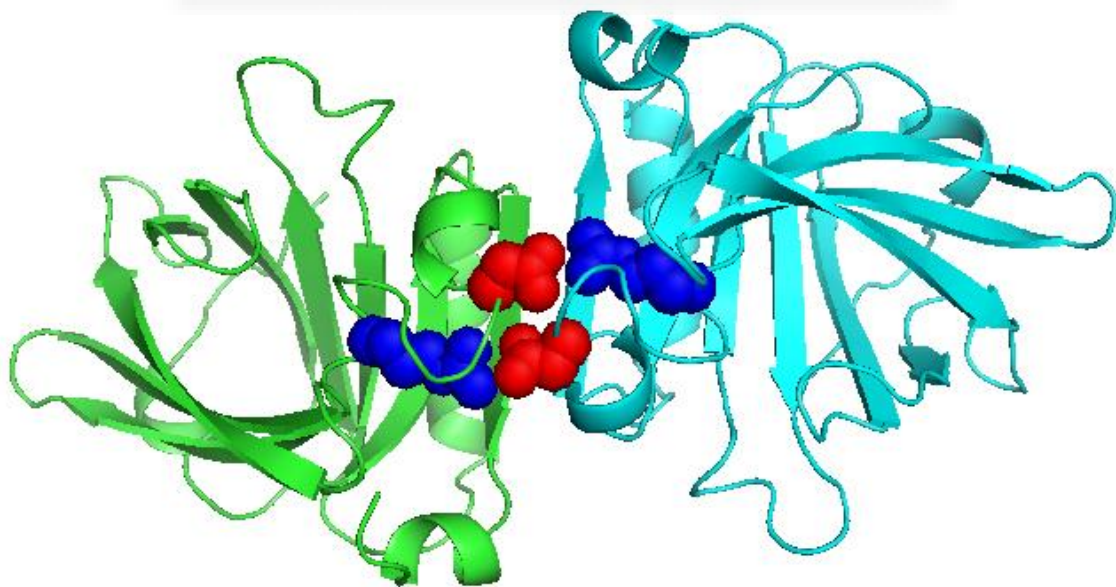


Figura 2. Puentes salinos formados en el dímero de β -lactoglobulina entre monómeros. En azul se muestran las argininas y en rojo los aspárticos.

Se conoce que existen varios factores capaces de alterar el equilibrio monómero-dímero. Entre los más estudiados estaría el pH, que actuaría fundamentalmente cambiando la carga neta de la proteína, y la fuerza iónica⁶⁵

Esta proteína tiene un punto isoeléctrico de 5.3 aproximadamente⁶⁵ por lo que en las condiciones empleadas poseerá carga negativa. Esto va a hacer posible estudiar la adsorción de la β -lactoglobulina a una superficie con carga positiva por interacción electrostática.

Isoterma de Langmuir

Unas de las propiedades de mayor interés de las nanopartículas es su capacidad de adsorción que las hace un material ideal para múltiples aplicaciones debido a su gran relación superficie/volumen. Para poder estudiar el fenómeno de adsorción de moléculas a la superficie de las nanopartículas emplearemos la ecuación teórica descrita a principios de siglo XX por Langmuir.

La ecuación de Langmuir o isoterma de Langmuir relaciona el grado de cobertura de una superficie sólida con la concentración de una molécula que se encuentre en contacto a temperatura constante. La isoterma tiene la siguiente expresión:

$$eq\ 1. \quad q = \frac{q_{m\acute{a}x} \cdot \alpha \cdot P}{1 + \alpha \cdot P}; \quad \alpha = \frac{k_a}{k_d}$$

q indica la capacidad de adsorción, α es la constante de equilibrio a una temperatura dada definida como la razón entre la constante de asociación y la constante de disociación, mientras que P es la concentración de la molécula adherida o la presión parcial de un gas.

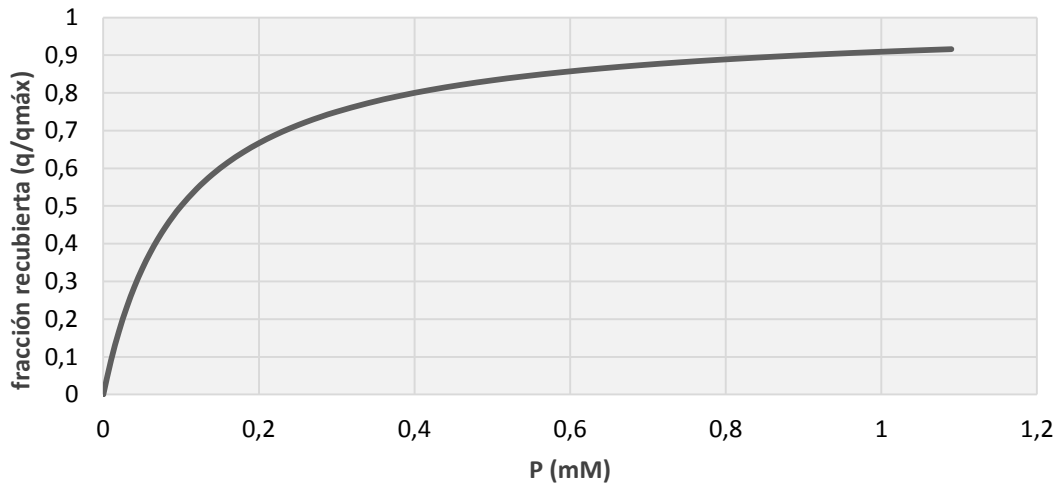


Figura 3. Curva teórica de la isoterma de Langmuir. Representación de la fracción recubierta ($q/q_{máx}$) frente a la concentración (P) de una molécula adsorbida en mM. Ejemplo realizado con $\alpha = 10$

La gráfica obtenida al representar la fracción recubierta ($q/q_{máx}$) frente a la concentración posee una primera parte donde la adsorción aumenta drásticamente al aumentar la concentración, pero este aumento de la adsorción decae gradualmente hasta que se alcanza una segunda zona donde el incremento de adsorción es reducido.

En nuestro caso, la isoterma de Langmuir será empleada para cuantificar la adsorción de una molécula en disolución, colorante o proteína, a nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con un polielectrolito cargado.

Es posible realizar una aproximación experimental incorporando un exceso amplio de la molécula que se pretenda adherir, empleando la zona final de la gráfica donde la capacidad de adsorción de las nanopartículas equivale a la capacidad máxima de adsorción. De este modo, lo que se obtendría sería una dependencia lineal de la adsorción entre ambas partículas con la concentración de nanopartículas en el medio.

El desarrollo de la aproximación sería el siguiente:

$$eq\ 1. \quad q = \frac{q_{máx} \cdot \alpha \cdot P}{1 + \alpha \cdot P}; \quad \alpha = \frac{k_a}{k_d}$$

$$2. \quad q = \frac{q_{máx} \cdot \frac{k_a}{k_d} \cdot P}{\frac{k_d}{k_d} + \frac{k_a}{k_d} \cdot P}$$

$$3. \quad q = \frac{q_{máx} \cdot \frac{k_a}{k_d} \cdot P}{\frac{k_d}{k_d} + \frac{k_a}{k_d} \cdot P} \rightarrow q = \frac{q_{máx} \cdot k_a \cdot P}{k_d + k_a \cdot P}$$

Añadiendo un exceso de molécula adsorbida, la aproximación realizada sería: $k_d \ll P$

Por lo tanto, obtenemos aproximación: $k_d + k_a \cdot P \approx k_a \cdot P$

$$4. \quad q = \frac{q_{m\acute{a}x} \cdot \frac{k_a \cdot P}{k_d + k_a \cdot P}}{\frac{k_a \cdot P}{k_d + k_a \cdot P}} \rightarrow q = q_{m\acute{a}x}$$

Antecedentes y objetivos

Actualmente se ha conseguido emplear nanopartículas magnéticas para captar distintos metales divalentes, como Ca^{2+} o Zn^{2+} , o para recuperar Au mediante nanopartículas funcionalizadas con grupos tiol (-SH)^{45, 46}. Además, las moléculas orgánicas de bajo peso molecular también pueden ser captadas por estas nanopartículas para tratar aguas residuales, como se ha comprobado para colorantes neutros⁶⁷.

Por otro lado, dentro de las aplicaciones de las nanopartículas en biomedicina, uno de los factores limitantes es la opsonización. Este proceso se ha conseguido evitar parcialmente recubriendo directamente nanopartículas con polímeros altamente compatibles como el polietilenglicol^{58, 62}. No obstante, esto puede inhabilitarlas como vehiculizadores de fármacos, ya que el fármaco tampoco sería capaz de unirse a la nanopartícula magnética.

Objetivo general

Síntesis de nanopartículas magnéticas recubiertas con un polielectrolito catiónico para distintos fines: la eliminación de moléculas aniónicas de bajo peso molecular en aguas contaminadas y la utilización de polímeros neutros para reducir o prevenir la opsonización de las nanopartículas recubiertas como posible sistema vehiculizador de fármacos.

Objetivos específicos

- Sintetizar, recubrir nanopartículas magnéticas de óxido de hierro con un polielectrolito de alta densidad de carga positiva y caracterizar sus propiedades (estabilidad, carga, tamaño).
- Estudiar la capacidad de adsorción de las nanopartículas recubiertas a moléculas orgánicas de bajo peso molecular cargadas negativamente.
- Estudiar la capacidad de adsorción de las nanopartículas recubiertas a una proteína cargada negativamente.
- Determinar la capacidad de un tratamiento con polietilenglicol para reducir la opsonización de la superficie de las nanopartículas recubiertas.

Materiales y métodos

Obtención de nanopartículas de óxido de hierro (IONP).

Se obtuvieron nanopartículas de óxido de hierro (IONP) a través de la coprecipitación de hierro (II) y hierro (III)⁵. Para ello se goteó 50 mL de una disolución de hierro (II) 0,5M y hierro (III) 1M en HCl 0,4M sobre 500 mL de una disolución de NaOH 0.5M en agitación. Se realizó bajo atmósfera de N₂ y a una temperatura controlada de 40°C manteniendo en agitación durante una hora a dicha temperatura. Finalmente se decantó magnéticamente y se realizaron dos lavados con agua.

Reacción producida durante la síntesis por coprecipitación:



Cuantificación de nanopartículas desnudas por residuo seco

La cuantificación de las IONP no recubiertas se llevó a cabo por residuo seco. Se tomó una alícuota de 2 mL, se decantó magnéticamente, se eliminó el agua y se resuspendió en etanol. Se dejó evaporar el etanol a 80°C en el termobloque durante toda la noche y se pesó el residuo restante en el tubo. Se calculó la masa como la diferencia de peso existente en un tubo eppendorf tras la evaporación del etanol a 80°C, obteniéndose una concentración final de 14,6 mg/mL.

Recubrimiento de IONP con polielectrolito

Las IONP se recubrieron con hidrocloreuro de polialilamina (PAAH) de 17500 g/mol de peso molecular. Para ello se preparó una disolución de 1L que contenía 0.5 mg/mL de IONP y 0.5 mg/mL de PAAH a pH 7.2 ajustado con ácido nítrico y se dejó en agitación mecánica durante una noche.

Purificación de las IONP

Diálisis

Se empleó un proceso optimizado de diálisis con una membrana con un tamaño de poro de 100 kDa para eliminar el exceso de PAAH de 17500 g/mol. Es decir, la membrana posee un poro 5.7 veces mayor al tamaño del polielectrolito. Se hizo pasar un volumen de 10 litros de agua destilada por la membrana a una velocidad de 1 L/hora. El método optimizado permite una diálisis automatizada y con una velocidad de diálisis máxima.

Precipitación

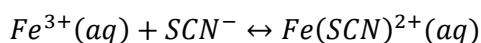
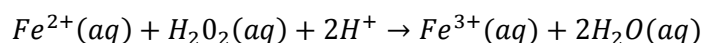
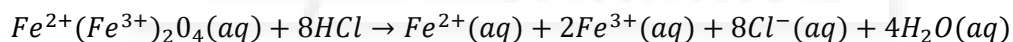
El método de precipitación con bicarbonato consistió en la precipitación por bicarbonato sódico 0.5 M y eliminación del PAAH en exceso mediante tres ciclos de decantación. Los ciclos de decantación consisten en la decantación magnética de las nanopartículas, eliminación de sobrenadante y resuspensión en agua. Tras los ciclos de lavados, se dializó para eliminar el bicarbonato restante y se sonicó la muestra durante 60 minutos efectivos de sonicación (10s sonicando|20s sin sonicar).

Cuantificación espectrofotométrica de nanopartículas recubiertas mediante formación de un complejo con KSCN

Para el caso de las IONP recubiertas (IONP@PAAH), puesto que por diferencia de peso se estaría sobreestimando la cantidad de IONP debido al peso del polielectrolito, se cuantificó la cantidad de hierro mediante la formación de un complejo de hierro (III) con tiocianato potásico, que presenta un color rojo intenso con un máximo de absorbancia a 474 nm^{68, 69} y por tanto la cantidad de Fe₃O₄.

Para ello, se disolvieron las IONP@PAAH en HCl concentrado (6M) y peróxido de hidrógeno 0.75% para asegurar que todo el hierro estuviera en forma de hierro (III). La medida realizada fue la absorbancia a 474 nm del complejo Fe(SCN)²⁺ en presencia de un exceso de KSCN.

La reacción se muestra a continuación:



Los valores de absorbancia obtenidos se extrapolaron sobre una recta de calibrado obtenida en estudios previos en el laboratorio (fig. 4).

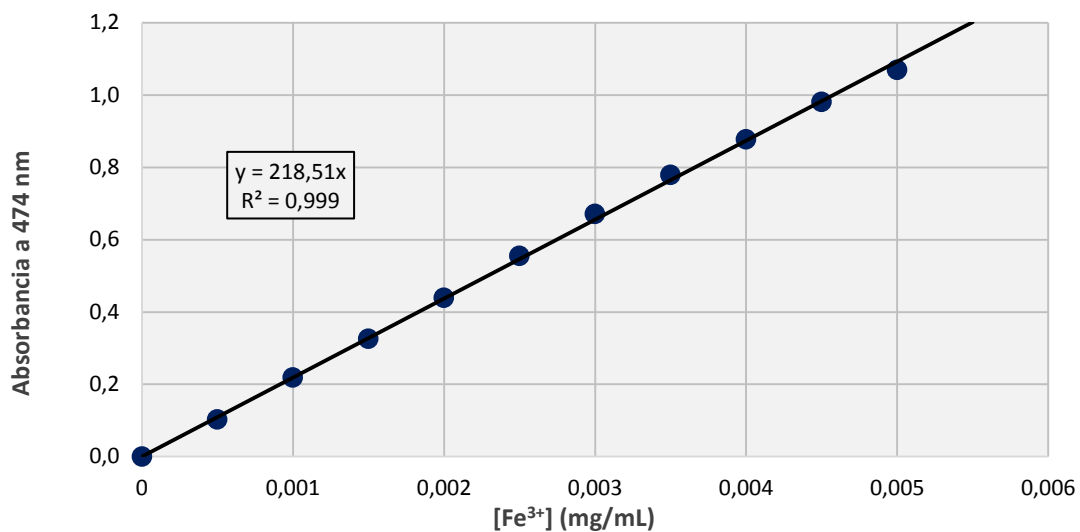


Figura 4. Determinación del coeficiente de extinción del complejo $Fe(SCN)^{2+}$ (aq) en medio ácido (HCl 2M) a 474 nm. Datos obtenidos previamente en el laboratorio.

$$\text{coeficiente de extinción: } \epsilon(474nm) = 218.51(mg Fe^{3+}/mL)^{-1}cm^{-1}$$

Para expresar el coeficiente en mg de magnetita:

$$\epsilon(474nm) = 218,51 \left(mg \frac{Fe^{3+}}{mL} \right)^{-1} cm^{-1} \cdot \frac{55,85 \cdot 10^3 mg Fe^{3+}}{1 mol Fe} \cdot \frac{3 mol Fe^{3+}}{1 mol Fe_3O_4} \cdot \frac{1 mol Fe_3O_4}{231,55 \cdot 10^3 mg Fe_3O_4} = 158,11(mg Fe_3O_4/mL)^{-1}cm^{-1}$$

Medida de tamaño por DLS

El tamaño de las nanopartículas fueron medidas por DLS (Dynamic light scattering) con el dispositivo *Particle Size Analyser 90 Plus Brookhaven*. El método cuantifica el tamaño de partículas en disolución que se encuentren bajo un movimiento browniano midiendo la velocidad de fluctuación de la intensidad de luz. El tamaño calculado depende del coeficiente de difusión translacional asumiendo que la partícula es perfectamente esférica con la ecuación de Stokes-Einstein:

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

$d(H)$ es el radio hidrodinámico, D es el coeficiente de difusión translacional, K es la constante de Boltzmann, T es la temperatura en kelvin y η es la viscosidad del medio⁷⁴.

Por lo tanto, el valor obtenido en la medida corresponde al radio hidrodinámico promedio de los coloides formados en suspensión. Estos coloides son nanopartículas de óxido de hierro agregadas unas con otras y recubiertas con la capa de hidratación. En caso de que las

partículas sean recubiertas, cabe esperar que el tamaño aumente respecto a las no recubiertas, asumiendo el mismo nivel de agregación de las nanopartículas.

Medida de carga superficial por potencial Z

El potencial Z fue medido con el software PALS (Phase analysis light scattering) en el mismo dispositivo (*Particle Size Analyser 90 Plus Brookhaven*) añadiendo un accesorio a la cubeta que porta dos electrodos. Este parámetro indica la carga superficial de las partículas en disolución y se calcula determinando la movilidad electroforética y aplicando la ecuación de Henry.

$$U_E = \frac{2 \cdot \epsilon \cdot z \cdot f(ka)}{3\eta}$$

z es el potencial Z, U_E es la movilidad electroforética, ϵ es la constante dieléctrica, η es la viscosidad del medio y $f(ka)$ es la función de Henry. La función de Henry puede aproximarse siguiendo la aproximación de Smoluchowski, por lo que $f(ka)$ sería 1,5. Sin embargo, para partículas pequeñas con constante dieléctrica baja, se realiza la aproximación de Huckel, por lo que $f(ka)$ sería 1,0. En nuestro caso, las medidas se hicieron con 7 replicados con 10 ciclos de aplicación de voltaje a temperatura constante cada replicado empleando la aproximación de Smoluchowski⁷⁵. La figura 7 muestra la variación del potencial Z en función del pH de IONP obtenida experimentalmente en estudios anteriores en el laboratorio. El valor experimental del punto isoeléctrico es de 6,3.

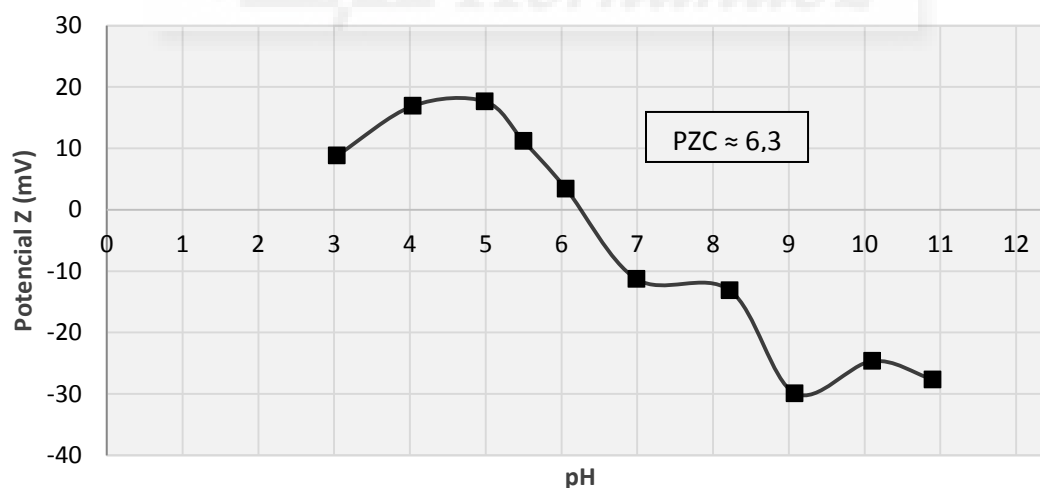


Figura 5. Variación del potencial Z frente al pH de las nanopartículas de óxido de hierro obtenido experimentalmente. El punto isoeléctrico experimental (PZC) es de 6,3. Datos obtenidos previamente en el laboratorio.

Estabilidad coloidal

Para el experimento de estabilidad coloidal de las nanopartículas se prepararon varios tubos con una cantidad fija de nanopartículas y se sometieron a una fuerza magnética externa

determinada o se dejaron en ausencia de fuerzas magnéticas externas durante un tiempo determinado. Se midió, pasado ese tiempo, la densidad óptica del sobrenadante a 445 nm.

Adsorción Trypan Blue

Los experimentos de adsorción de *Trypan Blue* se realizaron manteniendo constante la cantidad de colorante (18,26 $\mu\text{g/mL}$) y con una concentración creciente de nanopartículas en tampón hepes 10 mM, pH=7,0. Después de poner en contacto el colorante con las nanopartículas magnéticas, se dejaron los tubos en agitación mecánica durante la noche hasta la mañana siguiente, se decantaron magnéticamente las nanopartículas y se midió el colorante restante en el sobrenadante por espectrofotometría ultravioleta-visible a 585 nm.

Eliminación/Recuperación de Trypan Blue

Se prepararon dos muestras de 6 mL conteniendo 37,5 $\mu\text{g/mL}$ de Trypan Blue en hepes 10 mM pH=7,0 y NaCl 0,67M. Una de las muestras se trató con 62,5 $\mu\text{g/mL}$ de IONP@PAAH, tras unos minutos incubación las NP se decantaron magnéticamente y se midió la absorbancia del sobrenadante a 585 nm, comparándose con la de la disolución control (no tratada con NP). Las NP decantadas se resuspendieron 2,04 mL NaHCO_3 0,1 M pH=9,36 se sonicaron 15 minutos en un baño de ultrasonidos y tras decantarlas magnéticamente se midió de nuevo la absorbancia del sobrenadante conteniendo el *Trypan Blue* recuperado.

Tratamiento con PEG

Se empleó polietilenglicol de tres pesos moleculares distintos 400 g/mol, 6000 g/mol y 35000 g/mol. Para cada uno de los PEGs, se preparó un stock de IONP@PAAH con PEG en una ratio 1:10 IONP@PAAH:PEG y se dejó en agitación mecánica durante toda la noche.

Para las IONP@PAAH en presencia de 10 mg/mL PEG 6000 g/mol se prepararon los tubos con cantidades crecientes de IONP@PAAH, tampón hepes pH=7,0, PEG 6000 g/mol y H_2O y se puso en agitación mecánica durante una noche.

Adsorción β -lactoglobulina

Los experimentos de adsorción de β -lactoglobulina se realizaron sobre IONP@PAAH así como sobre IONP@PAAH tratadas con polietilenglicol. En dichos experimentos se mantuvo constante la cantidad de proteína (1000 $\mu\text{g/mL}$) y se añadieron concentraciones crecientes de nanopartículas en tampón hepes 10 mM pH=7,0 o tampón borato 10 mM pH=9,0. Después de poner en contacto la proteína con las nanopartículas magnéticas, se dejaron incubando los tubos en agitación mecánica durante toda la noche, tras lo cual se decantaron

magnéticamente las nanopartículas y se midió la proteína restante en el sobrenadante por espectrofotometría ultravioleta-visible.

Para la cuantificación de la proteína en el sobrenadante en los experimentos de adsorción de β -lactoglobulina se realizó el espectro de absorción desde 400 nm a 240 nm cada 0,2 nm y se empleó el coeficiente de extinción molar de la β -lactoglobulina ($\epsilon(280 \text{ nm}) = 0.941 \text{ (mg/mL)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para relacionar la absorbancia obtenida a 280 nm con la concentración de la misma. En aquellos casos en los que resultó necesario corregir la dispersión de luz causada por las nanopartículas en el rango de absorción de la proteína se aplicó el método de corrección de la dispersión de Leach y Scheraga⁷⁰. Para ello se utilizó la dependencia de la dispersión de luz entre 340 y 400 nm, donde el coeficiente de la proteína es despreciable para corregir la contribución de la dispersión a 280 nm. .

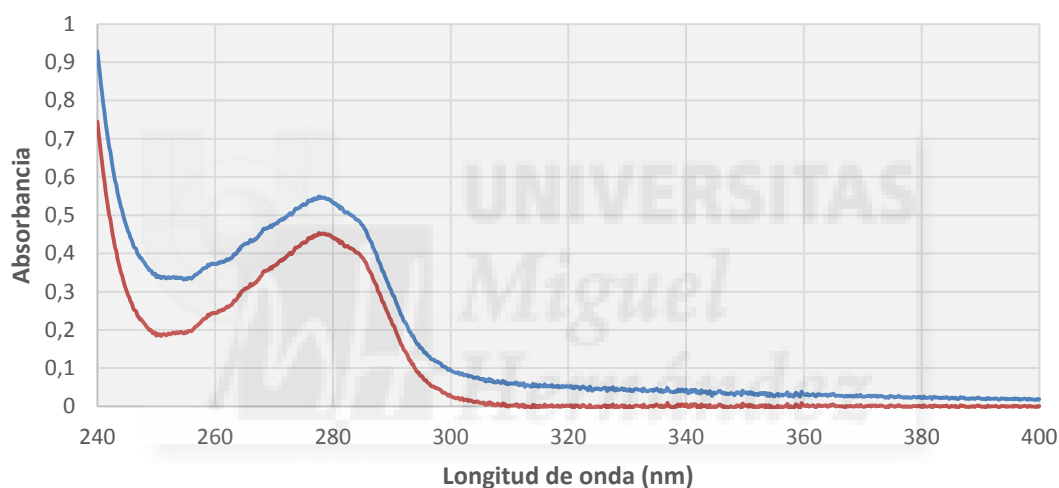


Figura 6. Ejemplo de corrección de la dispersión en un espectro de β -lactoglobulina por el método de Leach y Scheraga.

Resultados experimentales

Determinación del comportamiento de las IONP@PAAH después de la purificación

Tras la síntesis de las nanopartículas de óxido de hierro (IONP) y su recubrimiento con hidrocloreuro de polialilamina (PAAH), dando lugar a nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de polialilamina (IONP@PAAH), se emplearon dos técnicas disponibles para la purificación de las mismas. Por un lado, se dializaron las IONP@PAAH para eliminar el exceso de polielectrolito (IONP@PAAHd) y por otro lado, se precipitaron con bicarbonato sódico (NaHCO_3) 0,5M (IONP@PAAHp) (ver materiales y métodos). Se realizaron estudios iniciales

para caracterizar el comportamiento coloidal y la capacidad de adsorción de las nanopartículas tras la purificación.

Estabilidad coloidal de IONP@PAAH

En primer lugar, se determinó el tamaño por DLS de las IONP@PAAH purificadas por ambos métodos y su carga superficial. Los valores de tamaño obtenidos fueron $133,6 \pm 0,1$ nm con una polidispersidad de $0,22 \pm 0,01$ para las IONP@PAAH purificadas por diálisis y $144,4 \pm 8,3$ nm con una polidispersidad de $0,26 \pm 0,02$ para las IONP@PAAH precipitadas. El potencial Z a pH=8,3 fue de $24,8 \pm 3,2$ mV con una movilidad de $1,9 \pm 0,3$ ($\mu\text{S}/(\text{V}/\text{cm})$) y de $31,2 \pm 3,7$ mV con una movilidad de $2,4 \pm 0,3$ ($\mu\text{S}/(\text{V}/\text{cm})$) para las IONP@PAAH dializadas y las precipitadas, respectivamente.

A continuación, se tomaron varias alícuotas de IONP@PAAH en hepes 10mM, pH=7,0 y se midió la densidad óptica del sobrenadante de la muestra a varios tiempos de incubación (a temperatura ambiente) sin aplicar ningún tipo de fuerza externa. Además, se tomaron alícuotas de las muestras preparadas y se sometieron a una fuerza magnética externa durante un tiempo determinado y se midió nuevamente la densidad óptica del sobrenadante. Se muestra en la figura 7 la densidad óptica normalizada, en tanto por uno, frente al tiempo estudiado (60 minutos).

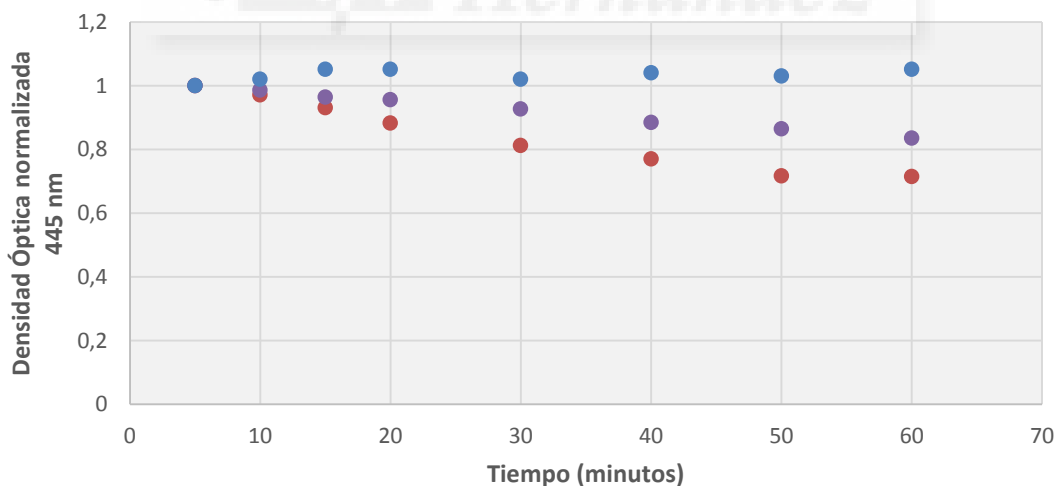


Figura 7. Representación de la densidad óptica a 445 nm del sobrenadante frente al tiempo en minutos. Se muestra en azul las IONP@PAAH en ausencia de fuerza magnética externa, en violeta las IONP@PAAH en presencia de fuerza magnética externa, y en rojo las IONP@PAAH en presencia de fuerza magnética externa.

Se aprecia que el valor de densidad óptica, cuando no se aplica un campo magnético externo, no varía a lo largo del tiempo, y que por lo tanto, la concentración de nanopartículas permanece constante al menos durante una hora en disolución a pH=7,0. Por otro lado, se observa un ligero descenso en la densidad óptica del sobrenadante de las nanopartículas dializadas (rojo) y de las precipitadas con bicarbonato (violeta) al someterlas a un campo magnético externo. Las muestras purificadas por métodos distintos tienen un comportamiento muy similar, aunque no es exactamente idéntico. La capacidad del imán para atraer las nanopartículas es ligeramente mayor en el caso de las dializadas que en el caso de las precipitadas. Tras una hora de aplicación del imán en el sobrenadante quedaron un 71,5% en el caso de las dializadas (rojo) y un 83,5% en el caso de las precipitadas (violeta). En ninguno de los casos, el imán fue capaz de retener más de un 30% de las partículas en suspensión tras una hora de exposición.

Capacidad de adsorción de *Trypan Blue* a IONP@PAAH

Para determinar la capacidad de adsorción de las IONP@PAAH hacia moléculas de carga opuesta, usamos como modelo un colorante (*Trypan Blue*). En la figura 8 se representa la concentración de *Trypan Blue* restante en el sobrenadante tras haber retirado las partículas por decantación magnética frente a la cantidad creciente de nanopartículas inicial, IONP@PAAHd (violeta) o IONP@PAAHp (rojo). El rango empleado de nanopartículas fue de 0 a 10 $\mu\text{g/mL}$, mientras que todos los tubos contienen una cantidad fija de 18,26 μg de *Trypan Blue* por mL.

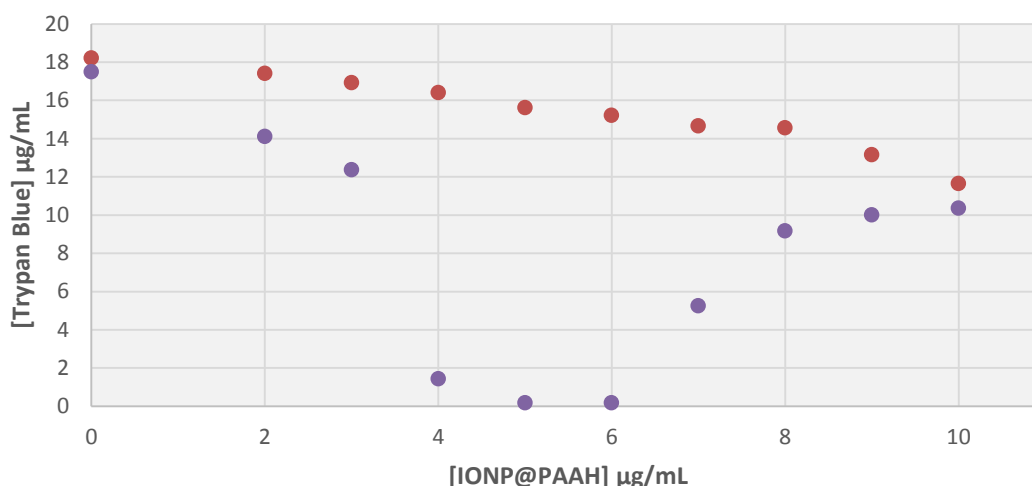


Figura 8. Concentración de *Trypan Blue* ($\mu\text{g/mL}$) restante en el sobrenadante frente a la concentración de nanopartículas añadidas inicialmente ($\mu\text{g/mL}$). Se representa en rojo las IONP@PAAH precipitadas y en violeta las IONP@PAAH dializadas.

Se observa que en el caso de las IONP@PAAHp a medida que aumenta la cantidad de nanopartículas, la cantidad de colorante restante en disolución es menor. Además, este comportamiento parece tener una dependencia lineal. Por otro lado, en el caso IONP@PAAHd, se produce un descenso progresivo hasta 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de nanopartículas, entre 3-4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observa una disminución más pronunciada de la cantidad de colorante detectado en el sobrenadante, de forma que entre 4-6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de nanopartículas no queda prácticamente colorante en el sobrenadante después de retirar las nanopartículas magnéticamente. Además, para concentraciones mayores de 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de nanopartículas la cantidad de *Trypan Blue* en el sobrenadante se incrementa al aumentar la cantidad de nanopartículas. Debido a las grandes diferencias de comportamiento entre las muestras, se comprobó que los resultados fueran reproducibles.

Espectro de absorción del *Trypan Blue*

En la figura 9 se muestra el espectro de absorción de *Trypan Blue* en medio acuoso (azul), donde se observa un máximo de absorción en 598 nm. También se representan el espectro de absorción de *Trypan Blue* en presencia de polielectrolito PAAH (verde) – ratio 1:30 TB:PAAH (p/p) y del *Trypan Blue* remanente en el sobrenadante (rojo) tras la incubación con 0.01 mg/mL de nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con hidrocloreuro de polialilamina dializadas (NP@PAAHd) y eliminación de las nanopartículas por decantación magnética.

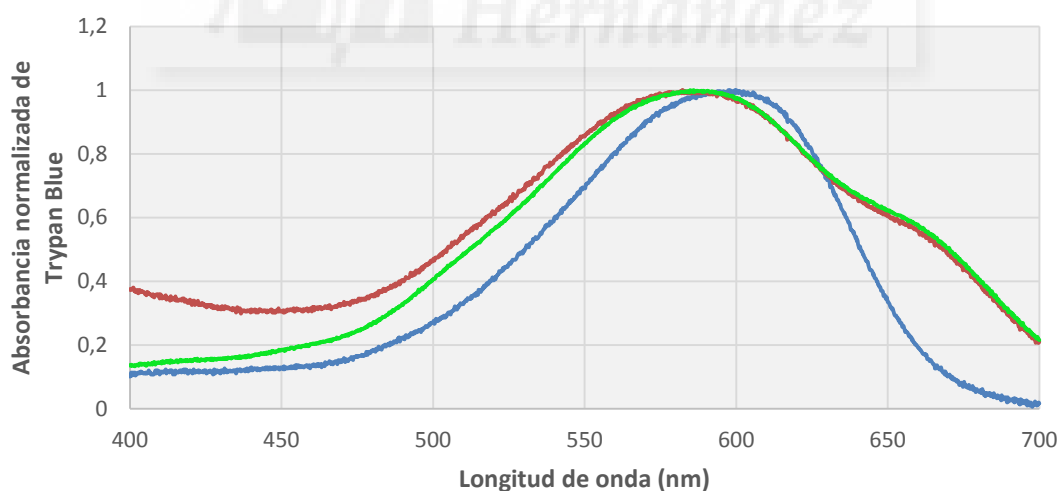


Figura 9. Absorbancia normalizada de *Trypan Blue* frente a la longitud de onda en nanómetros. En azul se representa el *Trypan Blue* en medio acuoso, en verde se muestra el *Trypan Blue* en presencia de hidrocloreuro de polialilamina - ratio 1:30 colorante:polielectrolito, y en rojo se representa el *Trypan Blue* restante en disolución tras la decantación magnética y eliminación de las IONP@PAAHd.

Se observa un desplazamiento del máximo de absorción a longitudes de onda inferiores y un incremento significativo de la absorbancia situado entre 650-700 nm tanto en el caso del TB en presencia de PAAH como en el caso del sobrenadante de la muestra que se incubó con las

IONP@PAAHd. Indicando la presencia de PAAH libre residual en el sobrenadante de las las IONP@PAAHd.

Tratamiento de aguas residuales: recuperación de *Trypan Blue*

q máxima de adsorción de *Trypan Blue*

Se cuantificó la capacidad de adsorción de las IONP@PAAHp al *Trypan Blue*. La gráfica muestra la cantidad de colorante restante en el sobrenadante frente a la cantidad de IONP@PAAHp empleada. Se utilizó una cantidad fija de colorante de 18,26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y cantidades crecientes de nanopartículas desde 0 hasta 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

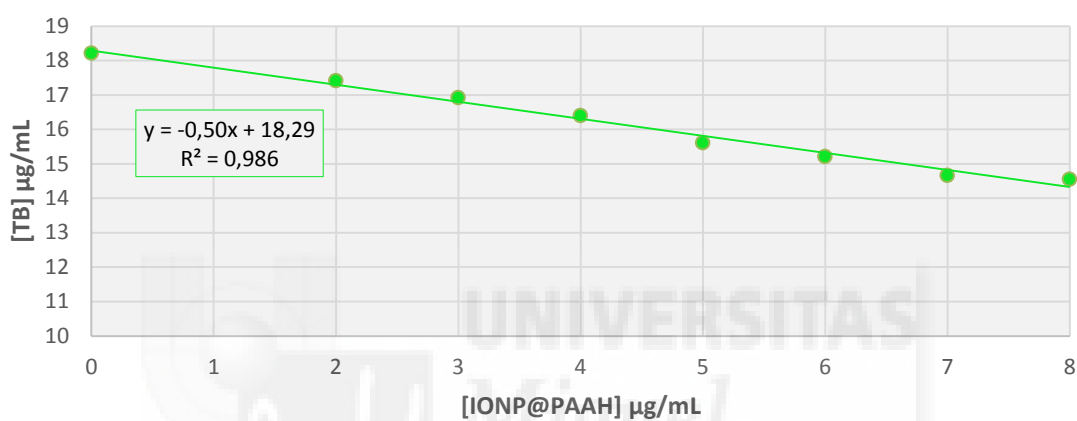


Figura 10. Concentración de *Trypan Blue* ($\mu\text{g}/\text{mL}$) restante en el sobrenadante frente a la concentración de IONP@PAAHp ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

Se observa que la cantidad de colorante restante en disolución disminuye al aumentar la cantidad de nanopartículas y que la dependencia es lineal (Ver figura 10). Se realizó un ajuste lineal y la pendiente obtenida fue de $-0,50 \mu\text{g Trypan Blue}/\mu\text{g IONP@PAAH}$ con una R^2 de 0,986. La pendiente obtenida corresponde, según la aproximación empleada sobre la isoterma de Langmuir, a la capacidad máxima de adsorción de las nanopartículas pero con signo opuesto ya que la cantidad de colorante medida es la restante en el sobrenadante.

Eliminación/Recuperación de *Trypan Blue*

Se realizó una prueba de concepto para conocer si era viable la eliminación de *Trypan Blue* en aguas contaminadas. Para ello se prepararon dos muestras de 6 mL de modo que ambas poseían 37,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de colorante en hepes 10 mM pH=7,0 y NaCl 0.67M. A la primera de las muestras se le añadió 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IONP@PAAHp mientras que la segunda muestra se dejó en ausencia de nanopartículas. La segunda muestra fue utilizada como control y la primera se colocó sobre un imán, se decantaron las nanopartículas y se separó el sobrenadante. Macroscópicamente, las partículas parece que decantaron en un tiempo inferior a 1 minuto,

pero para asegurar que quedara en suspensión el menor número de nanopartículas se dejaron en presencia del imán durante 45 minutos. Finalmente, se resuspendió en 2,04 mL NaHCO_3 0,1 M pH=9,3 para desorber el colorante de las nanopartículas e intentar concentrarlo.

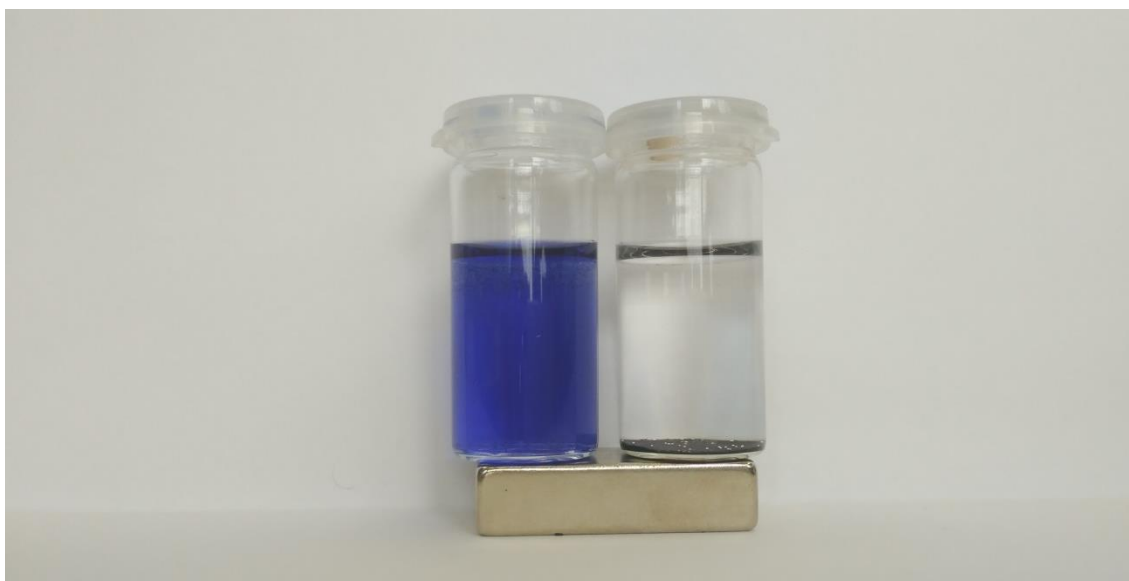


Ilustración 1 Eliminación de Trypan Blue por nanopartículas magnéticas. A la izquierda se muestra el control sin IONP@PAAH y a la derecha se muestran las IONP@PAAH decantadas magnéticamente después de adsorber el colorante.

Los resultados de esta prueba muestran que las nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con hidrocloreuro de polialilamina fueron capaces de retirar el 99,15% del colorante en disolución y que tras la desorción a pH=9,3 se pudo recuperar el 34,23% de colorante en el primer lavado en un volumen tres veces menor al inicial.

Estudio de la opsonización con una proteína modelo, la β -lactoglobulina

Con el objetivo de conocer si el polietilenglicol es capaz de evitar la opsonización, se estudió la capacidad de adsorción de las nanopartículas a la β -lactoglobulina para poder evaluar posteriormente si el tratamiento con dicho polímero neutro tiene algún tipo de efecto que haga disminuir la capacidad de unión de la proteína a la superficie de las nanopartículas, inhibiendo la opsonización.

q máxima de β -lactoglobulina

Se estudió la adsorción de las partículas purificadas por decantación con bicarbonato sódico a la proteína modelo, β -lactoglobulina. Se incubó una cantidad fija de proteína (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con una cantidad creciente de IONP@PAAHp desde 0 hasta 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se ha representado la

cantidad de proteína restante en disolución tras decantar magnéticamente frente a la cantidad de IONP@PAAHp inicialmente añadida.

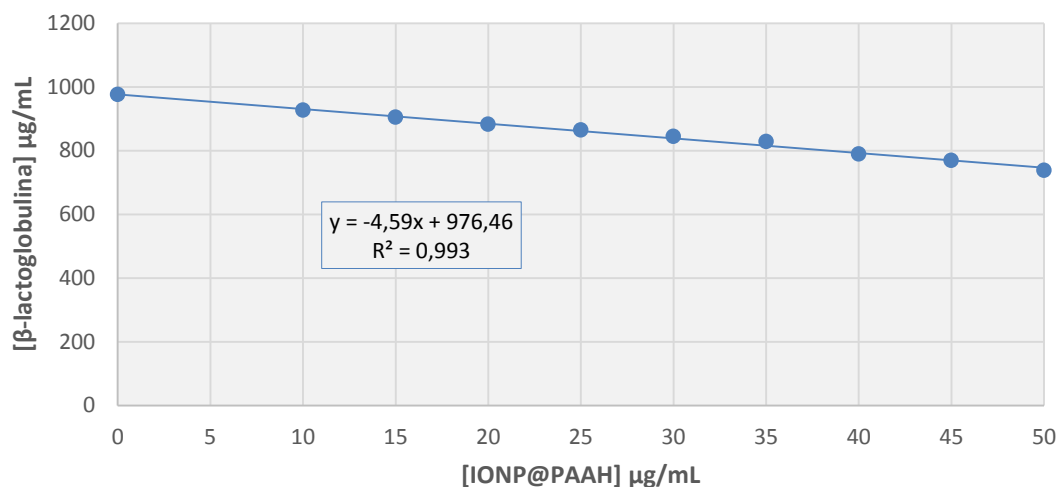


Figura 11. Concentración de β-lactoglobulina (μg/mL) restante en el sobrenadante frente a la concentración de IONP@PAAHp (μg/mL).

Se observa que la cantidad de proteína restante en disolución (sobrenadante) disminuye al aumentar la cantidad de nanopartículas y que la dependencia es lineal. Se realizó un ajuste lineal y la pendiente obtenida fue de $-4,59 \mu\text{g } \beta\text{-lactoglobulina}/\mu\text{g IONP@PAAHp}$ con una R^2 de 0,993. La pendiente obtenida corresponde, según la aproximación empleada sobre la isoterma de Langmuir, a la capacidad máxima de adsorción de las nanopartículas pero con signo opuesto ya que la cantidad de β-lactoglobulina medida es la no adsorbida por las nanopartículas.

Efecto del tratamiento con polietilenglicol sobre la capacidad máxima de adsorción

Se estudió el efecto del polietilenglicol sobre la capacidad máxima de adsorción de β-lactoglobulina a las IONP@PAAHp. Las partículas fueron tratadas con polietilenglicol en una relación 1:10 IONP@PAAHp:PEG antes de que se incubaran con la proteína. En la gráfica se muestra la cantidad de proteína restante en disolución (en el sobrenadante tras la decantación magnética de las nanopartículas) frente a la cantidad de IONP@PAAHp tratadas con polietilenglicol de 6000 g/mol inicialmente añadida.

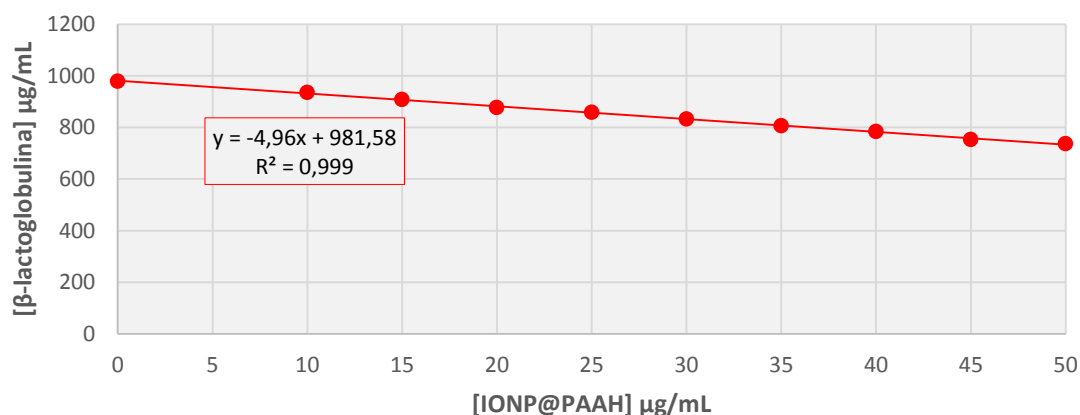


Figura 12 Concentración de β-lactoglobulina (μg/mL) restante en el sobrenadante frente a la concentración de IONP@PAAH (μg/mL) en presencia de polietilenglicol 6000 g/mol - ratio 1:10 IONP:PEG.

Se observa que la cantidad de proteína restante en disolución disminuye al aumentar la cantidad de nanopartículas y que la dependencia es lineal. Se realizó un ajuste lineal y la pendiente obtenida fue de $-4,96 \mu\text{g } \beta\text{-lactoglobulina} / \mu\text{g IONP@PAAH}$ con una R^2 de 0,999. Por tanto, las IONP@PAAH tratadas presentan una capacidad máxima de adsorción de $4,96 \mu\text{g } \beta\text{-lactoglobulina} / \mu\text{g IONP@PAAH}$. Se aprecia al comparar con el valor obtenido respecto a $\text{pH}=7,0$, que no existe una diferencia significativa entre la capacidad máxima de adsorción de las nanopartículas en presencia de polietilenglicol respecto a las que se encuentran en ausencia del polietilenglicol.

Se realizó el mismo experimento con polietilenglicol de 400 g/mol y 35000 g/mol. Los resultados se recogen en la tabla 1, donde también se ha incluido el tamaño y la polidispersidad medidas para cada una de las muestras.

	q máxima	R² del ajuste lineal	Tamaño nm (DLS)	Polidispersidad
IONP@PAAH	4,59	0,993	215,3±4,0	0,20±0,02
IONP@PAAH+PEG400	4,90	0,992	236,9±4,3	0,11±0,02
IONP@PAAH+PEG6000	4,96	0,999	280,8±23,5	0,24±0,04
IONP@PAAH+PEG35000	4,74	0,979	262,6±6,6	0,20±0,01

Tabla 1 q máxima y tamaño de las IONP@PAAH en ausencia y en presencia de polietilenglicol de distinto peso molecular. Todas las muestras fueron purificadas por el método de precipitación.

También se estudió el efecto sobre la capacidad de adsorción de IONP@PAAHp, a pH=7,0, al tratarlas con polietilenglicol de 6000 g/mol de peso molecular a una cantidad fija de 10 mg/mL, un exceso muy superior al utilizado en los experimentos anteriores. El rango de nanopartículas estudiado es desde 0 a 90 $\mu\text{g/mL}$ para una cantidad fija de proteína de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Se comparó, además, con el comportamiento de las IONP@PAAHp no tratadas. Se representa (Figura 13) la concentración de β -lactoglobulina restante en disolución (sobrenadante tras decantación magnética) en función de la cantidad de nanopartículas inicialmente añadida (IONP@PAAHp) a pH=7,0 sin polietilenglicol (azul), y a pH=7,0 en presencia de polietilenglicol 6000 g/mol de peso molecular 10 mg/mL (rojo).

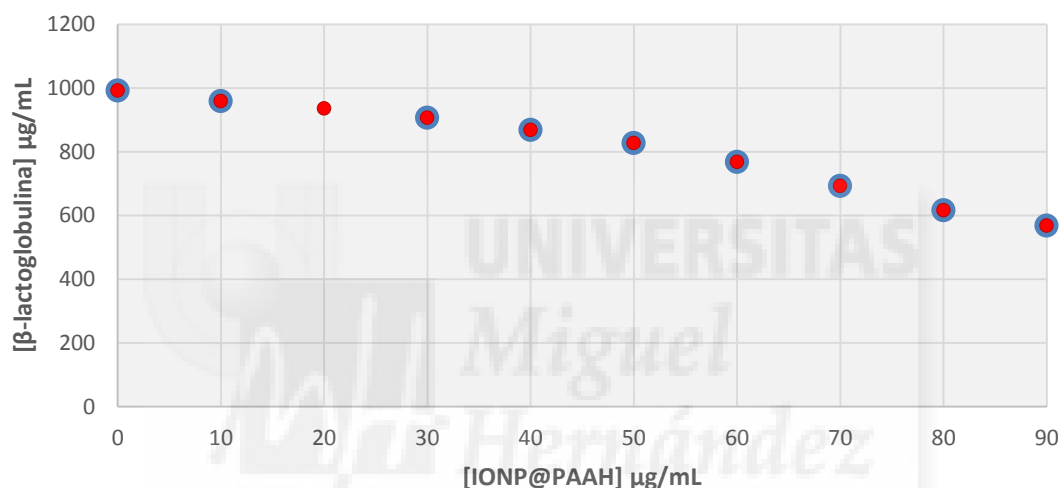


Figura 13. Concentración de β -lactoglobulina ($\mu\text{g/mL}$) restante en el sobrenadante frente a la concentración de IONP@PAAHp ($\mu\text{g/mL}$). Se muestra en rojo las IONP@PAAHp en presencia de polietilenglicol 6000 g/mol 10 mg/mL, y en azul, las IONP@PAAHp en ausencia de polietilenglicol ambas en tampón hepes 10mM pH=7,0.

Se observa el mismo comportamiento tanto en presencia como en ausencia del tratamiento con polietilenglicol al igual que en caso anterior a pesar de que el exceso de polímero neutro es al menos 20 veces superior.

Efecto del pH sobre la capacidad máxima de adsorción

Se analizó si el polietilenglicol tenía un efecto a pH=9,0, sobre la adsorción de la proteína a las IONP@PAAHp, donde la superficie de las nanopartículas está menos cargada. Se muestra la concentración de β -lactoglobulina restante en disolución en función de la cantidad de nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con hidrocloreuro de polialilamina (NP@PAAH) a pH=9,0 en presencia de polietilenglicol 6000 g/mol de peso molecular 10 mg/mL (verde) y en ausencia (violeta). El rango de nanopartículas estudiado es desde 0 a 90 $\mu\text{g/mL}$ para una cantidad fija de proteína de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

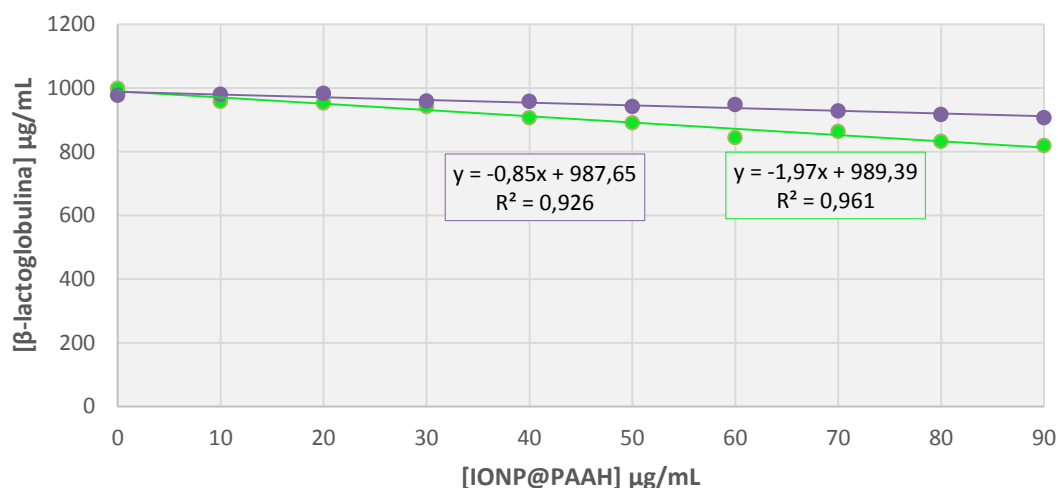


Figura 14. Concentración de β -lactoglobulina ($\mu\text{g/mL}$) restante en el sobrenadante frente a la concentración de IONP@PAAH ($\mu\text{g/mL}$). Se muestra en verde las IONP@PAAH en presencia de polietilenglicol 6000 g/mol 10 mg/mL, y en violeta, las IONP@PAAH en ausencia de polietilenglicol ambas en tampón borato pH=9,0.

A pH=9,0 en ausencia de polietilenglicol la proteína presenta una muy baja adsorción, en comparación con la determinada a pH 7,0, a la superficie de las nanopartículas, mientras que en presencia de PEG se observa una adsorción también baja, pero ligeramente superior. En ambos casos hay una dependencia lineal por lo que se realizó el ajuste. La pendiente obtenida fue de $-0,85 \mu\text{g } \beta\text{-lactoglobulina}/\mu\text{g IONP@PAAH}$ con una R^2 de 0,926 en ausencia de PEG, mientras que en presencia de PEG la pendiente obtenida fue de $-1,968 \mu\text{g } \beta\text{-lactoglobulina}/\mu\text{g IONP@PAAH}$ con una R^2 de 0,961. La pendiente corresponde a la capacidad máxima de adsorción de las nanopartículas pero con signo opuesto ya que la cantidad de β -lactoglobulina medida es la no adsorbida por las nanopartículas.

Discusión de los resultados

Determinación del comportamiento de las IONP@PAAH después de la purificación

Tras la síntesis inicial de las nanopartículas de magnetita (IONP) por el método de coprecipitación se llevó a cabo el recubrimiento de las mismas mediante el polielectrolito catiónico hidrocloreto de polialilamina (PAAH) obteniéndose las nanopartículas recubiertas (IONP@PAAH). Este recubrimiento, por un lado, dota de una mayor estabilidad coloidal a las nanopartículas impidiendo su agregación a pH fisiológico, y al mismo tiempo, proporciona una superficie con capacidad para adsorber moléculas de signo opuesto por atracción electrostática. Además, podría permitir la unión covalente de moléculas de interés a partir de la derivatización de los grupos amino. Las nanopartículas recubiertas (IONP@PAAH) fueron

purificadas, es decir, se llevó a cabo la eliminación del exceso de polielectrolito utilizado para el recubrimiento, mediante dos métodos distintos: diálisis y precipitación con HCO_3^- .

La diálisis consiste en hacer pasar un flujo de agua por una membrana con poro de tamaño 100 kDa con el objetivo de eliminar el exceso de polielectrolito que queda después del recubrimiento, mientras que la precipitación consiste en añadir bicarbonato sódico 0,5 M, decantar las nanopartículas, resuspender en agua, dializar para eliminar el bicarbonato y sonicar. Las ventajas que aporta la purificación por diálisis es que se trata de un método simple, automático y en un único paso. El proceso de precipitación por bicarbonato, por el contrario, consta de más pasos en el protocolo y no está automatizado, pero el tiempo requerido para la purificación de la muestra es menor. Además, el método de precipitación permite la concentración de la muestra de forma sencilla y rápida.

En primer lugar, se quiso estudiar la idoneidad de los métodos de purificación utilizados. Para ello, caracterizamos las NP obtenidas en base a su estabilidad coloidal y su capacidad de adsorción de moléculas de interés de carga opuesta.

La estabilidad coloidal de las nanopartículas se debe principalmente al tamaño y a la carga superficial de las mismas, de modo que aumenta cuanto menor sea el tamaño de las partículas y cuanto mayor sea su carga. Por lo tanto, tras haber sido recubiertas con el PAAH las partículas presentan una estabilidad coloidal alta ya que la densidad de carga expuesta al disolvente es muy grande y además, esta estabilidad ha de mantenerse después del proceso de purificación.

Las medidas de tamaño y potencial Z no mostraron diferencias significativas entre las nanopartículas purificadas por uno u otro método. Los diámetros obtenidos son algo superiores a los 100 nm y muy parecidos, y en ambos casos las nanopartículas presentan una carga superficial positiva a pH 8,3. Estos resultados indican que el recubrimiento con el polielectrolito ha sido efectivo y se mantiene tras la purificación, ya que a pHs superiores a 6,5 las nanopartículas desnudas poseerían carga negativa, como claramente se ve en la curva de titulación de potencial Z frente a pH (figura 5).

En la figura 7 se confirma que la estabilidad coloidal de las partículas obtenidas por los dos procedimientos es muy alta ya que incluso en presencia de una fuerza magnética externa durante una hora, la cantidad de nanopartículas decantada es inferior al 30%. Además, en ausencia de dicha fuerza, la cantidad en suspensión de nanopartículas no varía en el tiempo

estudiado. Es cierto que existen ligeras diferencias entre el comportamiento de las partículas purificadas por diálisis respecto a las purificadas por precipitación. La pequeña variación entre los diámetros hidrodinámicos no es motivo suficiente para justificar la diferencia de comportamiento, pero la polidispersidad que presentaron las muestras sí. Los índices de polidispersidad obtenidos son superiores a 0,2, lo que indica que el tamaño de todas las partículas no es exactamente igual, pudiendo existir una distribución bastante amplia de tamaños alrededor del diámetro medio obtenido, o incluso varias poblaciones con tamaños distintos. Esto hace que el comportamiento frente al imán de las nanopartículas pueda variar ligeramente entre muestras, incluso con el mismo diámetro medio, ya que las nanopartículas de mayor tamaño dentro de la distribución son más sensibles a ser atraídas por una fuerza magnética externa y además presentan una contribución a la dispersión de luz más elevada. Por lo tanto, asumimos que las pequeñas diferencias encontradas no son significativas y están dentro de la variabilidad experimental debida a la distribución de tamaños. Todo ello, nos lleva a concluir que la estabilidad de las nanopartículas purificadas por ambos métodos es muy elevada y prácticamente idéntica.

Por otro lado, se comprobó la capacidad de las partículas para adsorber moléculas de interés de signo opuesto, utilizando el *Trypan Blue* como molécula modelo de carga negativa, por ser además un colorante por el que existe un interés comercial en su eliminación. Los resultados obtenidos para las partículas purificadas por precipitación y por diálisis fueron significativamente diferentes (ver figura 8). Las partículas purificadas por precipitación (IONP@PAAHp) presentaban el comportamiento esperado: a mayor cantidad de nanopartículas, mayor cantidad de colorante adsorbido. Sin embargo, las muestras de nanopartículas dializadas (IONP@PAAHd) presentaban un comportamiento complejo de difícil interpretación. Se planteó estudiar la posible existencia de artefactos experimentales, o que estuvieran ocurriendo más procesos adicionales a la adsorción, por lo que se decidió recoger el espectro del colorante en el sobrenadante de las IONP@PAAH tratadas con diálisis. En la figura 9 se observa que el espectro de absorción del colorante es modificado al estar en disolución en presencia de polielectrolito libre (en verde) respecto al espectro control de *Trypan Blue* (en azul). Exactamente la misma variación en el espectro se obtiene en el sobrenadante de las IONP@PAAH tratadas con diálisis. Esto parece indicar que el método de diálisis no consiguió eliminar completamente el polielectrolito en exceso ya que es la presencia de polielectrolito libre la que causa la alteración en el espectro. Además, este hecho confirma que el comportamiento complejo de adsorción que presentó la muestra dializada era causado por la presencia de polielectrolito libre.

En suma, se ha comprobado experimentalmente que de los dos procesos disponibles de purificación de las nanopartículas, únicamente el método de precipitación con bicarbonato es adecuado, por lo que todos los experimentos posteriores se realizaron con nanopartículas purificadas por dicho procedimiento.

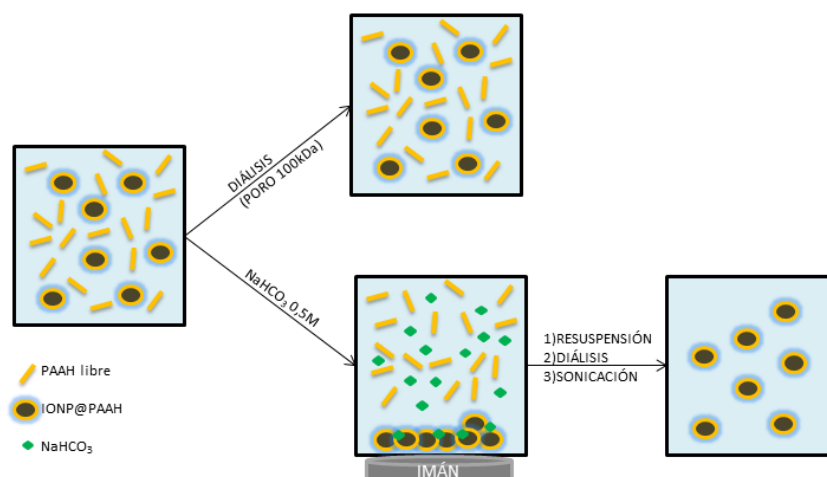


Figura 15 Esquema resumen de los procesos de purificación mediante diálisis y mediante precipitación con NaHCO₃. Se representa la ineficacia del método de diálisis para eliminar el exceso de polielectrolito libre tras el recubrimiento.

Tratamiento de aguas residuales: adsorción/recuperación de *Trypan Blue*

Considerando las posibles aplicaciones que presentan las nanopartículas magnéticas en el tratamiento de aguas residuales, en este trabajo nos centramos en estudiar la recuperación de moléculas y contaminantes que presentan carga negativa en disolución. Para ello se empleó como molécula modelo el *Trypan Blue* y se estudió la capacidad de las nanopartículas para adsorberlo.

En primer lugar, se determinó la capacidad máxima de adsorción de las nanopartículas frente al colorante. Para lo cual, se empleó una aproximación sobre la isoterma de Langmuir empleando un exceso de colorante (ver materiales y métodos) y se obtuvo que la capacidad máxima de adsorción es 0,50 $\mu\text{g Trypan Blue}/\mu\text{g IONP@PAAH}$. Esto confirma la posible aplicación de las nanopartículas para captar moléculas aniónicas en agua.

En segundo lugar, se realizó una prueba de concepto para determinar si sería viable utilizar las nanopartículas para adsorber, concentrar y recuperar la molécula adsorbida. Los resultados de esta prueba fueron prometedores ya que por un lado, confirmaron que las nanopartículas fueron capaces de adsorber el 99,15% del colorante de una muestra, y por otro lado, se consiguió desorber, concentrar y recuperar el 34,23% del colorante adsorbido en el primer

lavado. Estos resultados requieren de un estudio pormenorizado y optimización de las condiciones y el número de lavados necesarios para la recuperación máxima del colorante, pero confirman que es una vía posible. Además, sería también interesante estudiar si las nanopartículas empleadas son reutilizables dada las implicaciones, sobre todo a nivel industrial, ya que reduciría los costes de utilización.

Estudio de la opsonización con una proteína modelo, la β -lactoglobulina

La opsonización que sufren la nanopartículas al ser introducidas en un organismo vivo es a día de hoy una de las mayores limitaciones que tiene el uso de nanopartículas, magnéticas o no, en aplicaciones biomédicas, en general, y como vehiculizadores de fármacos más específicamente. Para estudiar este fenómeno in vitro se planteó caracterizar la adsorción de una proteína procedente del suero bovino (β -lactoglobulina) a las nanopartículas previamente sintetizadas (IONP@PAAHp) e intentar modificar dicha adsorción mediante el tratamiento de las nanopartículas con un polímero neutro (polietilenglicol).

Se caracterizó inicialmente la adsorción de la proteína a las nanopartículas, calculándose la capacidad máxima de adsorción de las IONP@PAAH a β -lactoglobulina, obteniendo un valor de 4,5907 μg β -lactoglobulina/ μg IONP@PAAH. Esto establece el punto de partida del estudio de la opsonización, ya que el objetivo es conseguir un procedimiento que permita bloquear la adsorción de moléculas a la superficie de las nanopartículas.

Para bloquear dicha adsorción se empleó polietilenglicol debido a los prometedores resultados que está teniendo en la ciencia de nanomateriales para aplicaciones biomédicas por su alta biocompatibilidad y el aumento que genera en la vida media de las nanopartículas en sangre^{58, 62}. Aunque en la mayoría de los estudios el polietilenglicol es utilizado como recubrimiento directo o primario de las nanopartículas sintetizadas. En nuestro caso el abordaje es ligeramente distinto ya que lo vamos a emplear con el objetivo de que interactúe con nanopartículas previamente recubiertas con PAAH. Por lo que la interacción se ha de dar entre el PAAH que posee una alta densidad de carga positiva y el polietilenglicol, que es un polímero neutro, mediante interacciones, por ejemplo, de tipo ion-dipolo. En el caso ideal, se formaría una segunda capa de recubrimiento de polietilenglicol que oculte total o parcialmente el PAAH para disminuir la interacción con moléculas en disolución.

Se prepararon muestras de IONP@PAAH en presencia y ausencia de polietilenglicol (PEG) de distinto peso molecular (400, 6000 y 35000 g/mol) para estudiar la capacidad de adsorción de la proteína a las nanopartículas tratadas con PEG. Antes de estudiar la capacidad de adsorción

se midió el tamaño de las nanopartículas de cada muestra obteniéndose un incremento en el radio hidrodinámico de las IONP@PAAH en presencia de polietilenglicol, siendo para el PEG 6000 y PEG 35000 más acusado.

Sin embargo, los resultados obtenidos en los experimentos de adsorción de la β -lactoglobulina no mostraron cambios en la q máxima de las nanopartículas con ningún polietilenglicol (peso molecular 400 g/mol, 6000 g/mol y 35000 g/mol), en las condiciones probadas. Se planteó la posibilidad de que en las condiciones estudiadas no tuvieran un exceso suficiente de polietilenglicol para producir el efecto deseado, por lo que se seleccionó el polietilenglicol de 6000 g/mol y se estudió la adsorción de la β -lactoglobulina a las nanopartículas en presencia de 10 mg/mL de PEG. En la figura 13 se puede apreciar claramente que no existe diferencia en la capacidad de adsorción con y sin PEG, por lo que queda confirmado que el polietilenglicol no tiene ningún efecto inhibitor sobre el fenómeno de opsonización. En la gráfica presentada se observa además, una pérdida de la linealidad a partir de 50 μ g/mL de IONP@PAAH porque en las condiciones utilizadas no se cumple la aproximación realizada sobre la isoterma de Langmuir (ver materiales y métodos).

Dado que a pH=7,0 el polielectrolito presenta una elevada densidad de carga se planteó la posibilidad de realizar el tratamiento con PEG a pH 9,0 donde la superficie de las nanopartículas estará menos cargada y el tratamiento podría ser más efectivo.

Se puede observar al comparar las figuras con los experimentos realizados a los dos pHs (7,0 y 9,0) (figuras 13 y 14 respectivamente) que la capacidad de adsorción a pH=9,0 es mucho menor, respecto a pH=7,0, tanto en presencia como en ausencia de polietilenglicol. Esta disminución en la capacidad de adsorción de las nanopartículas al aumentar el pH puede atribuirse, principalmente, a la disminución de la carga del polielectrolito al acercarnos a su punto isoeléctrico, y por tanto a una menor atracción electrostática nanopartícula-proteína. Sin embargo, también existe un efecto debido a la propia proteína. La β -lactoglobulina se encuentra fundamentalmente en forma dimérica a pH fisiológico, en cambio, al incrementar el pH hasta 9,0 la carga de la proteína aumenta ya que se aleja de su punto isoeléctrico ($pI=5,3$) y se desplaza el equilibrio monómero-dímero hacia la formación del monómero minimizando así las repulsiones proteína-proteína, existiendo una mayor proporción de proteína monomérica a pH=9,0. La unión de la especie monomérica a la nanopartícula producirá menor adsorción en masa que la unión de la especie dimérica. La existencia de este equilibrio, explicaría el aumento de $q_{m\acute{a}x}$ observada a pH 9,0 en presencia de PEG (1,97 frente a 0,85 en ausencia). La presencia de polietilenglicol en el medio, a menudo utilizado como agente de *crowding*, podría

estar desplazando el equilibrio hacia la formación del dímero por ser una estructura más compacta, de menor volumen⁷¹.

Conclusiones y proyección futura

El presente trabajo presenta la síntesis, purificación y caracterización de nanopartículas magnéticas recubiertas por el polielectrolito PAAH (IONP@PAAH), los resultados preliminares para su aplicación como adsorbente de moléculas aniónicas (contaminantes) en medio acuoso y el estudio de la posibilidad de utilización del polietilenglicol para evitar la opsonización de dichas partículas en aplicaciones biomédicas.

A partir de los resultados obtenidos, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Durante el proceso de purificación de las nanopartículas magnéticas recubiertas de PAAH, el exceso de polielectrolito (no adsorbido a la nanopartícula) puede ser eficazmente eliminado mediante la precipitación de las nanopartículas recubiertas con bicarbonato, HCO_3^- , y su posterior separación magnética del sobrenadante. Las nanopartículas así obtenidas muestran una elevada estabilidad coloidal al ser resuspendidas en disolución acuosa. Por el contrario, la eliminación del polielectrolito en exceso mediante diálisis demostró no ser un método eficaz al no poder conseguirse su completa eliminación.
- La adsorción y recuperación del colorante aniónico *Trypan Blue* con nanopartículas IONP@PAAHp fue efectiva. La capacidad máxima de adsorción de estas nanopartículas es de 0,50 g de Trypan Blue/g de nanopartícula, consiguiéndose una eliminación del contaminante superior al 99% y una recuperación posterior del mismo entorno al 34% en los experimentos exploratorios. Todo ello abre un campo de aplicación de las nanopartículas sintetizadas (IONP@PAAHp) para la eliminación de contaminantes aniónicos en aguas contaminadas. Es necesario un estudio más detallado que permita optimizar las condiciones de reutilización de la nanopartícula y de recuperación del contaminante mediante desorción de la nanopartícula en condiciones controladas.
- La proteína aniónica β -lactoglobulina a pH fisiológico fue adsorbida sobre la superficie cargada de las IONP@PAAHp por interacción electrostática. Tratamientos de las nanopartículas con polietilenglicol no lograron disminuir la capacidad de adsorción de la β -lactoglobulina indicando que el polímero neutro utilizado no es eficaz para reducir o mitigar el proceso de opsonización de estas partículas en medios biológicos.
- El polietilenglicol tuvo un ligero efecto a pH 9,0 aumentando la capacidad de adsorción de las nanopartículas sobre la β -lactoglobulina, posiblemente causado por el desplazamiento del equilibrio monómero-dímero de la proteína.

- Con el fin de poder evitar la opsonización de las IONP@PAAHp se requeriría la realización de estudios similares a los realizados utilizando otro tipo de polímeros como la polivinilpirrolidona (PVP) y el polivinilalcohol (PVA). Otra opción viable sería el anclaje covalente de las cadenas PEG al recubrimiento de PAAH.

Bibliografía

1. McHenry ME, Laughlin DE. Nano-scale materials development for future magnetic applications. *Acta Materialia*. 2000/01/01/ 2000;48(1):223-238.
2. Pan B, Qiu H, Pan B, et al. Highly efficient removal of heavy metals by polymer-supported nanosized hydrated Fe(III) oxides: Behavior and XPS study. *Water Research*. 2010/02/01/ 2010;44(3):815-824.
3. Grześkowiak BF, Sánchez-Antequera Y, Hammerschmid E, et al. Nanomagnetic Activation as a Way to Control the Efficacy of Nucleic Acid Delivery. *Pharmaceutical Research*. 2015// 2015;32(1):103-121.
4. Tombácz E, Turcu R, Socoliuc V, Vékás L. Magnetic iron oxide nanoparticles: Recent trends in design and synthesis of magneto-responsive nanosystems. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 12/18/ 2015;468(3):442-453.
5. Jolivet J-P, Chanéac C, Tronc E. Iron oxide chemistry. From molecular clusters to extended solid networks. *Chemical Communications*. 2004(5):481-483.
6. Salazar-Alvarez G, Muhammed M, Zagorodni AA. Novel flow injection synthesis of iron oxide nanoparticles with narrow size distribution. *Chemical Engineering Science*. 2006/07/01/ 2006;61(14):4625-4633.
7. Reetz MT, Helbig W, Quaiser SA. Electrochemical methods in the synthesis of nanostructured transition metal clusters. *Active Metals: Preparation, Characterization, Applications*. 1996:279-297.
8. Albornoz C, Jacobo SE. Preparation of a biocompatible magnetic film from an aqueous ferrofluid. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2006/10/01/ 2006;305(1):12-15.
9. Zhi J, Wang Y, Lu Y, Ma J, Luo G. In situ preparation of magnetic chitosan/Fe₃O₄ composite nanoparticles in tiny pools of water-in-oil microemulsion. *Reactive and Functional Polymers*. 2006/12/01/ 2006;66(12):1552-1558.
10. Fievet F, Lagier JP, Blin B, Beaudoin B, Figlarz M. Homogeneous and heterogeneous nucleations in the polyol process for the preparation of micron and submicron size metal particles. *Solid State Ionics*. 1989/02/01/ 1989;32:198-205.

11. Basak S, Chen D-R, Biswas P. Electrospray of ionic precursor solutions to synthesize iron oxide nanoparticles: Modified scaling law. *Chemical Engineering Science*. 2007/02/01/ 2007;62(4):1263-1268.
12. Hee Kim E, Sook Lee H, Kook Kwak B, Kim B-K. Synthesis of ferrofluid with magnetic nanoparticles by sonochemical method for MRI contrast agent. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2005/03/01/ 2005;289:328-330.
13. Dickson DPE, Walton SA, Mann S, Wong K. Properties of magnetoferritin: a novel biomagnetic nanoparticle. *Nanostructured Materials*. 1997/01/01/ 1997;9(1):595-598.
14. Strable E, Bulte JWM, Moskowitz B, Vivekanandan K, Allen M, Douglas T. Synthesis and characterization of soluble iron oxide– dendrimer composites. *Chemistry of materials*. 2001;13(6):2201-2209.
15. De Cuyper M, Joniau M. Mechanistic aspects of the adsorption of phospholipids onto lauric acid stabilized magnetite nanocolloids. *Langmuir*. 1991;7(4):647-652.
16. Bonacchi D, Caneschi A, Dorignac D, et al. Nanosized iron oxide particles entrapped in pseudo-single crystals of γ -cyclodextrin. *Chemistry of materials*. 2004;16(10):2016-2020.
17. Nalwa HS, Smalley RE. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology; Volume 4*: American Scientific; 2004.
18. Zheng Y-h, Cheng Y, Bao F, Wang Y-s. Synthesis and magnetic properties of Fe₃O₄ nanoparticles. *Materials research bulletin*. 2006;41(3):525-529.
19. Kojima K, Miyazaki M, Mizukami F, Maeda K. Selective formation of spinel iron oxide in thin films by complexing agent-assisted sol-gel processing. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. 1997;8(1-3):77-81.
20. Tadmor R, Rosensweig RE, Frey J, Klein J. Resolving the puzzle of ferrofluid dispersants. *Langmuir*. 2000;16(24):9117-9120.
21. Lin J, Zhou W, Kumbhar A, et al. Gold-coated iron (Fe@ Au) nanoparticles: synthesis, characterization, and magnetic field-induced self-assembly. *Journal of Solid State Chemistry*. 2001;159(1):26-31.
22. Ulman A. Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chemical reviews*. 1996;96(4):1533-1554.
23. Xu HK, Sorensen CM, Klabunde KJ, Hadjipanayis GC. Aerosol synthesis of gadolinium iron garnet particles. *Journal of materials research*. 1992;7(3):712-716.
24. Miller ES, Peppas NA, Winslow DN. Morphological changes of ethylene/vinyl acetate-based controlled delivery systems during release of water-soluble solutes. *Journal of Membrane Science*. 1983;14(1):79-92.

25. Zhao X, Milton Harris J. Novel degradable poly (ethylene glycol) hydrogels for controlled release of protein. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1998;87(11):1450-1458.
26. Ruiz JM, Benoit JP. In vivo peptide release from poly (DL-lactic acid-co-glycolic acid) copolymer 5050 microspheres. *Journal of Controlled Release*. 1991;16(1):177-185.
27. Li JK, Wang N, Wu XS. A novel biodegradable system based on gelatin nanoparticles and poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres for protein and peptide drug delivery. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1997;86(8):891-895.
28. Akiyoshi K, Sunamoto J. Supramolecular assembly of hydrophobized polysaccharides. *Supramolecular Science*. 1996;3(1-3):157-163.
29. Jeong Y, Il, Nah J-W, Na H-K, et al. Self-assembling nanospheres of hydrophobized pullulans in water. *Drug development and industrial pharmacy*. 1999;25(8):917-927.
30. Schwick HG, Heide K. Immunochemistry and immunology of collagen and gelatin. *Modified gelatins as plasma substitutes*. Vol 33: Karger Publishers; 1969: 111-125.
31. Massia SP, Stark J, Letbetter DS. Surface-immobilized dextran limits cell adhesion and spreading. *Biomaterials*. 2000;21(22):2253-2261.
32. Hall HK. Correlation of the Base Strengths of Amines1. *Journal of the American Chemical Society*. 1957/10/01 1957;79(20):5441-5444.
33. Choi J, Rubner MF. Influence of the degree of ionization on weak polyelectrolyte multilayer assembly. *Macromolecules*. 2005;38(1):116-124.
34. Chang MC, Kang HY. Remediation of pyrene-contaminated soil by synthesized nanoscale zero-valent iron particles. *Journal of Environmental Science and Health Part A*. 2009;44(6):576-582.
35. Zeng G, Huang D, Huang G, et al. Composting of lead-contaminated solid waste with inocula of white-rot fungus. *Bioresource Technology*. 2007;98(2):320-326.
36. Rafatullah M, Sulaiman O, Hashim R, Ahmad A. Adsorption of methylene blue on low-cost adsorbents: a review. *Journal of hazardous materials*. 2010;177(1):70-80.
37. Ahmad A, Rafatullah M, Sulaiman O, Ibrahim MH, Chii YY, Siddique BM. Removal of Cu (II) and Pb (II) ions from aqueous solutions by adsorption on sawdust of Meranti wood. *Desalination*. 2009;247(1-3):636-646.
38. Ambashta RD, Sillanpää M. Water purification using magnetic assistance: a review. *Journal of hazardous materials*. 2010;180(1):38-49.
39. Mahdavian AR, Mirrahimi MA-S. Efficient separation of heavy metal cations by anchoring polyacrylic acid on superparamagnetic magnetite nanoparticles through surface modification. *Chemical engineering journal*. 2010;159(1):264-271.

40. Xu P, Zeng GM, Huang DL, et al. Use of iron oxide nanomaterials in wastewater treatment: a review. *Science of the Total Environment*. 2012;424:1-10.
41. Feng W, Nansheng D, Helin H. Degradation mechanism of azo dye CI reactive red 2 by iron powder reduction and photooxidation in aqueous solutions. *Chemosphere*. 2000;41(8):1233-1238.
42. Khedr MH, Halim KSA, Soliman NK. Synthesis and photocatalytic activity of nano-sized iron oxides. *Materials Letters*. 2009;63(6):598-601.
43. Wang C-T. Photocatalytic activity of nanoparticle gold/iron oxide aerogels for azo dye degradation. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 2007;353(11):1126-1133.
44. Quici N, Morgada ME, Piperata G, Babay P, Gettar RT, Litter MI. Oxalic acid destruction at high concentrations by combined heterogeneous photocatalysis and photo-Fenton processes. *Catalysis today*. 2005;101(3):253-260.
45. Wanna Y, Chindaduang A, Tumcharern G, et al. Efficiency of SPIONs functionalized with polyethylene glycol bis (amine) for heavy metal removal. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2016;414:32-37.
46. Roto R, Yusran Y, Kuncaka A. Magnetic adsorbent of Fe₃O₄@SiO₂ core-shell nanoparticles modified with thiol group for chlorauric ion adsorption. *Applied Surface Science*. 2016;377:30-36.
47. Gautam RK, Gautam PK, Banerjee S, Soni S, Singh SK, Chattopadhyaya MC. Removal of Ni (II) by magnetic nanoparticles. *Journal of Molecular Liquids*. 2015;204:60-69.
48. Chowdhury SR, Yanful EK. Arsenic and chromium removal by mixed magnetite–maghemite nanoparticles and the effect of phosphate on removal. *Journal of Environmental Management*. 2010;91(11):2238-2247.
49. Hu J, Lo IMC, Chen G. Performance and mechanism of chromate (VI) adsorption by δ -FeOOH-coated maghemite (γ -Fe₂O₃) nanoparticles. *Separation and Purification Technology*. 2007;58(1):76-82.
50. Longo-Sorbello GSA, Saydam G, Banerjee D, Bertino JR. Cytotoxicity and cell growth assays. *Cell Biology, Four-Volume Set*. Vol 1; 2006: 315-324.
51. Nowicki M, Lichocka M, Nowakowska M, Kłosińska U, Kozik Elżbieta U. A Simple Dual Stain for Detailed Investigations of Plant-Fungal Pathogen Interactions. *Vegetable Crops Research Bulletin*. Vol 77; 2012: 61.
52. Jacobs DS, Cox TA, Wagoner MD, Ariyasu RG, Karp CL. Capsule Staining as an Adjunct to Cataract Surgery. *Ophthalmology*. 2006/04/01/ 2006;113(4):707-713.

53. Saunders NR, Dziegielewska KM, Møllgård K, Habgood MD. Markers for blood-brain barrier integrity: How appropriate is Evans blue in the twenty-first century and what are the alternatives? *Frontiers in Neuroscience*. 2015;9(OCT).
54. Berry CC, Curtis ASG. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of physics D: Applied physics*. 2003;36(13):R198.
55. Aguilar-Arteaga K, Rodriguez JA, Barrado E. Magnetic solids in analytical chemistry: a review. *Analytica Chimica Acta*. 2010;674(2):157-165.
56. Carregal-Romero S, Caballero-Díaz E, Beqa L, et al. Multiplexed sensing and imaging with colloidal nano-and microparticles. *Annual Review of Analytical Chemistry*. 2013;6:53-81.
57. McBain SC, Griesenbach U, Xenariou S, et al. Magnetic nanoparticles as gene delivery agents: enhanced transfection in the presence of oscillating magnet arrays. *Nanotechnology*. 2008;19(40):405102.
58. Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, Trebetskoy V, Torchilin V, Langer R. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science*. 1994;263(5153):1600-1604.
59. Frank MM, Fries LF. The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunology today*. 1991;12(9):322-326.
60. Harper GR, Davies MC, Davis SS, et al. Sterile stabilization of microspheres with grafted polyethylene oxide reduces phagocytosis by rat Kupffer cells in vitro. *Biomaterials*. 1991;12(7):695-700.
61. Bazile D, Prud'homme C, Bassoullet MT, Marlard M, Spenlehauer G, Veillard M. Stealth Me. PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1995;84(4):493-498.
62. Zhang Y, Kohler N, Zhang M. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials*. 2002;23(7):1553-1561.
63. Sawyer L, Kontopidis G. The core lipocalin, bovine β -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2000;1482(1):136-148.
64. Kontopidis G, Holt C, Sawyer L. Invited review: β -lactoglobulin: binding properties, structure, and function. *Journal of dairy science*. 2004;87(4):785-796.
65. Mercadante D, Melton LD, Norris GE, et al. Bovine β -lactoglobulin is dimeric under imitative physiological conditions: dissociation equilibrium and rate constants over the pH range of 2.5–7.5. *Biophysical journal*. 2012;103(2):303-312.

66. Gottschalk M, Nilsson H, Roos H, Halle B. Protein self-association in solution: The bovine β -lactoglobulin dimer and octamer. *Protein Science*. 2003;12(11):2404-2411.
67. Iram M, Guo C, Guan Y, Ishfaq A, Liu H. Adsorption and magnetic removal of neutral red dye from aqueous solution using Fe₃O₄ hollow nanospheres. *Journal of hazardous materials*. 2010;181(1):1039-1050.
68. Wagner CD, Clever HL, Peters ED. Evaluation of Ferrous Thiocyanate Colorimetric Method. *Analytical Chemistry*. 1947/12/01 1947;19(12):980-982.
69. Bent HE, French CL. The structure of ferric thiocyanate and its dissociation in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society*. 1941;63(2):568-572.
70. Leach SJ, Scheraga HA. Effect of light scattering on ultraviolet difference spectra. *Journal of the American Chemical Society*. 1960;82(18):4790-4792.
71. Zorrilla S, Rivas G, Acuña AU, Lillo MP. Protein self-association in crowded protein solutions: A time-resolved fluorescence polarization study. *Protein science*. 2004;13(11):2960-2969.
72. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=9562061, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9562061> (accessed June 28, 2017).
73. Mohanraj VJ, Chen Y. Nanoparticles - A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2006;5(1):5661-573 74. DLS technical note MRK656-01 (Malvern Instruments). Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes.
75. Instruction Manual (Brookhaven Instruments). Instruction Manual for ZetaPALS, Zeta Potential Analyzer.