



**Universidad**  
Zaragoza

## Trabajo Fin de Máster

# CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y EVALUACIÓN DE ESPECIES DE Ag (I) DERIVADAS DE LA FORMACIÓN DE PROTEÍNAS CORONA MEDIANTE TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS Y ABLACIÓN LÁSER-ICP-MS

José Miguel Luque Alled



Departamento de  
Química Analítica  
**Universidad**Zaragoza



Facultad de Ciencias  
**Universidad**Zaragoza



Instituto Universitario de Investigación  
en Ciencias Ambientales  
de Aragón  
**Universidad**Zaragoza

Dirección: María Sierra Jiménez García-Alcalá

Departamento: Química Analítica

Laboratorios de GEAS

Zaragoza, Septiembre de 2015

# INDICE

## Abreviaturas

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1.	NANOMATERIALES Y AgNPs .....	1
1.2.	CARACTERIZACIÓN DE AgNPs POR TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS.....	2
1.2.1.	Electroforesis en gel .....	2
1.2.2.	Electroforesis capilar .....	5
1.2.3.	LA-ICP-MS como técnica de detección para la caracterización de AgNPs tras la separación por AGE. ....	6
1.3.	AgNPs Y PROTEÍNAS CORONA.....	7
2.	OBJETIVOS .....	8
3.	EXPERIMENTAL .....	9
3.1.	INSTRUMENTACIÓN, APARATOS Y MATERIALES .....	9
3.1.1.	Instrumentación .....	9
3.1.2.	Aparatos .....	9
3.1.3.	Materiales .....	10
3.2.	REACTIVOS, MUESTRAS Y DISOLUCIONES PATRÓN .....	10
3.2.1.	Reactivos .....	10
3.2.2.	Muestras.....	11
3.2.3.	Disoluciones patrón.....	11
3.3.	PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES .....	12
3.3.1.	Métodos electroforético .....	12
3.3.1.1.	Método PEG-Tris-Borato-EDTA-AGE .....	14
3.3.1.2.	Método SDS-Tris-Borato-AGE .....	14
3.3.1.3.	Método SDBS-Tris-Borato-AGE .....	15
3.3.1.4.	Método SDS-Tris-Glicina-AGE .....	15
3.3.1.5.	Método SDS-TMA-Tris-Glicina-AGE.....	15
3.3.1.6.	Tratamiento posterior de los geles .....	15
3.3.2.	Método LA-ICP-MS.....	16
3.3.3.	Caracterización de proteínas corona y especies derivadas.....	17
3.3.3.1.	Método de la incubación de AgNPs con proteínas .....	17
3.3.3.2.	Método de determinación cuantitativa de Ag(I) liberada en la incubación de AgNPs con proteínas por ICP-MS .....	18

3.4.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	19
3.4.1.	Optimización de la caracterización de AgNPs por AGE y detección por LA-ICP-MS	19
3.4.1.1.	Tipo de agente pasivante del gel y uso de surfactantes .....	20
3.4.1.1.1.	Utilización de PEG .....	20
3.4.1.1.2.	Utilización de SDS. Influencia de la concentración. ....	21
a)	Tampón de electroforesis, gel y tampón de carga.....	21
3.4.1.1.3.	Utilización de SDBS. Influencia de la concentración. ....	24
a)	Tampón de electroforesis, gel y tampón de carga.....	24
b)	Influencia del surfactante en el tampón de carga y de distintos métodos de preparación de muestra.....	26
3.4.1.1.4.	Utilización del Tris-Glicina en el tampón de electroforesis, en el tampón de carga y en el gel. ....	27
3.4.1.1.5.	Utilización del TMA (ácido Tiomálico).....	29
a)	Influencia en el tampón de carga.....	29
b)	Influencia del tamaño de poro. ....	34
3.4.1.2.	Caracterización de PC tras la incubación de AgNPs con Albúmina y Transferrina por AGE y detección por LA-ICP-MS. ....	37
3.4.2.	Determinación de Ag(I) liberada en la incubación de AgNPs con proteínas por ICP-MS.	46
4.	CONCLUSIONES .....	52
	Bibliografía .....	55
	ANEXOS A	
	ANEXOS B	
	ANEXOS C	

## ABREVIATURAS

AgNPs	Nanopartículas de Plata
AuNPs	Nanopartículas de Oro
CE	Electroforesis Capilar
Col	Colargol
DGC	Centrifugación de Gradiente de Densidad
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
FFF	Fraccionamiento de Campo en Flujo
GE	Electroforesis en Gel
HDC	Cromatografía Hidrodinámica)
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
ICP-MS	Plasma de Acoplamiento inductivo
LA-ICP-MS	Ablación Láser-Plasma de Acoplamiento inductivo
MSA	Ácido Mercaptosuccínico
NM	Nanomaterial
NPs	Nanopartícula
P.I.	Patrón Interno
PC	Proteína Corona
PEG	PolietilenGlicol
QDs	Quantum Dots
RF	Factor de Retención
RSD	Desviación Estándar Relativa
SD	Desviación Estándar
SDBS	Dodecilmecenosulfato de Sodio
SDS	Dodecilsulfato de Sodio
TB	Tris-Borato
TBE	Tris-Borato-EDTA
TEM	Microscopía Electrónica de Transición
TMA	Ácido Tiomálico

# Introducción

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. NANOMATERIALES Y AgNPs

---

La segunda revisión de la normativa sobre los nanomateriales (NMs)<sup>1</sup> define nanomaterial como “un material natural, secundario o fabricado que contenga partículas, sueltas o formando un agregado o aglomerado y en el que el 50% o más de las partículas en la granulometría numérica presente una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre 1 nm y 100 nm.

Estos materiales en escala nanométrica presentan propiedades totalmente distintas a sus homólogos en escala macro. Las novedosas propiedades físico-químicas de estos materiales los hacen muy interesantes para su aplicación en diversos sectores.<sup>2-6</sup> Entre estos NMs las nanopartículas de plata (AgNPs) son consideradas las más comercializadas actualmente debido a sus aplicaciones en la industria textil, tintes, cosméticos, como bactericidas, como biofungicidas, aplicaciones biomédicas, en la industria médico-farmacéutica y en la industria alimentaria. Sin embargo, la principal característica de estas nanopartículas (NPs), que no la única, es su fuerte actividad microbiana.

Ante esta creciente industria de los NMs y la ausencia de información sobre el destino y el comportamiento de estos nuevos materiales en los sistemas biológicos, el desarrollo de una metodología segura y asequible para la detección y caracterización de los NMs y de sus efectos sobre los sistemas biológicos aparece como un tema de vital importancia para el desarrollo seguro de esta nueva disciplina de la ciencia. Así, la Nanotoxicidad y la Econanotoxicidad empiezan a ser muy relevantes en el ámbito de la Nanociencia<sup>7-9</sup>. En concreto, la ecotoxicidad de las AgNPs ha sido ampliamente estudiada<sup>10-12</sup>.

La toxicidad de las AgNPs depende de muchos factores como el tamaño, la forma, la carga superficial, el recubrimiento, la capacidad para liberar Ag (I) y el estado de agregación. Pero la toxicidad de las AgNPs se relaciona principalmente con la cantidad de Ag (I) liberada<sup>13</sup>, lo que está influido por los otros factores mencionados. Aunque también se han descrito posibles mecanismos independientes de las AgNPs<sup>14</sup>, por lo que deberemos tener en cuenta ambas formas químicas para evaluar su toxicidad.

## Introducción

### **1.2. CARACTERIZACIÓN DE AgNPs POR TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS.**

---

Como he comentado al final del apartado anterior, la caracterización de las AgNPs será fundamental para llevar a cabo los distintos estudios de toxicidad y para su correcta aplicación en el campo de la biomedicina. Distintas técnicas (Fraccionamiento de Campo en Flujo (FFF), Cromatografía Hidrodinámica (HDC), Cromatografía Líquida (HPLC), Electroforesis capilar (CE), Microscopía electrónica de Transición (TEM), etc) han sido descritas para la caracterización de las propiedades de estos NMs<sup>15-18</sup>. Entre estas propiedades, el tamaño, la forma, el recubrimiento y la carga superficial aparecen como las principales propiedades a tener en cuenta en estudios de interacción con los sistemas biológicos. Las técnicas electroforéticas han sido descritas para la caracterización de estas propiedades de las NPs<sup>15,17,19,20</sup>, entre ellas destacan la electroforesis en gel (GE) y la electroforesis capilar (CE).

#### **1.2.1. Electroforesis en gel**

GE es una técnica de separación basada en el diferente comportamiento de migración de analitos en el gel mediante efectos de tamiz bajo la influencia de un campo eléctrico. En comparación con otras técnicas de separación tales como centrifugación, HPLC, FFF, HDC o CE, la electroforesis en gel tiene la ventaja de permitir introducir múltiples muestras en paralelo en el mismo gel, lo cual es un parámetro considerable a la hora de optimizar las condiciones de un método para caracterizar una muestra compleja<sup>21,22</sup>.

En cuanto a las técnicas electroforéticas en gel para separación de NPs podemos distinguir las que usan la Agarosa como polímero formador del gel (AGE) y las que usan Poliacrilamida como polímero formador del gel (PAGE).

La electroforesis PAGE ha sido ampliamente usada para la separación de proteínas, también ha sido descrita para la separación de NPs (QDs)<sup>23</sup> o bioconjugados de NPs<sup>24,25</sup>, aunque su uso está restringido a NPs de tamaño muy pequeño (menor de 10 nm).

La electroforesis AGE es una técnica no desnaturalizante, con tamaño de poro de entre 10 y 100 nm (más grandes que los que se obtienen con los geles de poliacrilamida). Normalmente la electroforesis AGE se utiliza para la separación de biopolímeros cargados como ADN o ARN<sup>26</sup>, pero también ha sido usada para la caracterización de

## Introducción

NPs metálicas en función de su tamaño o de su forma<sup>21,27-30</sup>. Cabe destacar, que nosotros conozcamos, que hasta ahora no se dispone de ningún método descrito en la bibliografía que utilice AGE capaz de caracterizar NM en una muestra a partir de las movilidades electroforéticas de patrones de tamaño conocido. Por lo tanto, como veremos a continuación, la mayoría de las aplicaciones de esta técnica están dirigidas a la caracterización o separación de NPs recién sintetizadas o la caracterización de la funcionalización de las NPs.

Dentro de los NM metálicos, las AuNPs han sido ampliamente estudiadas por esta técnica. Varios trabajos describen la separación de AuNPs en función de su tamaño<sup>28,30</sup>. Helfrich et al.<sup>30</sup> describen el uso de SDS como surfactante para mejorar la resolución y conseguir la separación de AuNPs de distintos tamaños (5 y 20 nm) usando 2% de Agarosa en el gel. Además también se menciona el uso de TMA (ácido tiomálico, también conocido como ácido Mercaptosuccínico (MSA)) como agente de recubrimiento en la síntesis de las NPs para así formar un compuesto de coordinación con los iones  $\text{Au}^+$  restantes y poder determinar estos iones, a parte de funcionalizar las NPs y dotarles de carga negativa. De esta manera Helfrich et al. separaron las AuNPs de los iones que no habían reaccionado mediante AGE. Como se ha comentado anteriormente, la electroforesis AGE ha adquirido gran relevancia en escala preparativa para caracterizar la funcionalización<sup>31</sup>, purificar las AuNPs de diferentes tamaños<sup>28</sup> o para separar las AuNPs con diferente grado de funcionalización<sup>32</sup>. Esta funcionalización puede suponer un aumento del tamaño de la NP lo que se aprecia en una disminución de la movilidad electroforética. Sperling et al.<sup>32</sup> modificaron las AuNPs con  $\text{NH}_2$ -PEG, NPs con una, dos y tres moléculas de  $\text{NH}_2$ -PEG adsorbidas y se separaron mediante AGE. Xu et al.<sup>28</sup>, usaron la electroforesis para separar AuNPs esféricas de 5, 15 y 20 nm modificadas con ácido 11-Mercaptoundecanoico mediante AGE en columna con 2,5% de Agarosa en el gel y TBE como tampón. Además se usó esta técnica para la purificación de AuNPs de  $15 \pm 2,7$  nm hasta obtener AuNPs de  $15 \pm 0,4$  nm usando 4% de Agarosa en el gel y TBE como tampón. También purificaron AuNPs de 5, 13 y 18 nm y las cuatro poblaciones de NPs purificadas fueron sometidas a electroforesis AGE en placa para confirmar su purificación usando 2% de Agarosa en el gel y TBE como tampón. También se ha utilizado AGE para separar AuNPs de distintas formas, Wu et al. separaron las AuNPs de distinto tamaño por DGC (Centrifugación de Gradiente de Densidad) y las diferentes formas (nanoesferas y nanoplacas) se separan por AGE,

## Introducción

usando TBE como tampón<sup>33</sup>. Beskorovaynyy et al.<sup>22</sup> desarrollaron un método basado en 2D-GEC (celda de electroforesis en gel con gradilla en dos dimensiones) para optimizar dos parámetros clave (pH y concentración de modificante) en la modificación de la superficie de las AuNPs. El uso de la electroforesis en 2D les permite cargar muchas muestras y por lo tanto obtener las condiciones preferibles para la reacción en poco tiempo. Por la importancia de las AuNPs en biomedicina, observamos que la electroforesis AGE ha sido especialmente usada para confirmar la funcionalización de las AuNPs con moléculas biológicas como ADN<sup>31,34-36</sup>, ARN<sup>37</sup> o péptidos<sup>38</sup> y en algún caso hasta para determinar el diámetro de estos bioconjugados (AuNP-ADN)<sup>34</sup> a partir de la movilidad electroforética. Las AuNPs al interaccionar con las biomoléculas aumentan su tamaño y la movilidad electroforética disminuye respecto a la de la NP sin biomolécula. Sin embargo, otras veces las AuNPs recubiertas con citratos sin conjugar se agregan y aparecen en el pocillo, pero la conjugación con la biomolécula hace que las NPs avancen en el gel y por lo tanto se puede saber si la funcionalización ha sido eficaz si no se observan AuNPs en el pocillo<sup>35</sup>.

En cuanto a las AgNPs, la electroforesis AGE ha sido usada para caracterizar las NPs en función de su forma o en función del grado de funcionalización. Hanauer et al.<sup>21</sup> separaron con éxito AgNPs modificadas con SH-PEG-COOH de diferentes formas (nanoesferas, nanovarillas y nanotriángulos) en AGE con 0,2% de Agarosa en el gel y usando TBE (Tris-Borato-EDTA) como tampón (pH≈9). Estas AgNPs de distintas formas presentaban diferente absorbancia en la resonancia del plasmón por lo que fueron determinadas por Espectroscopía de Extinción Local y posterior confirmación por TEM. Kim et al.<sup>27</sup> transformaron nanoplacas triangulares de plata en nanoplacas hexagonales casi regulares de plata y nanoplacas esféricas de plata por irradiación de una fuente de láser. Las distintas nanoplacas fueron separadas por AGE con 0,5% de Agarosa en el gel y usando TBE como tampón, además las distintas nanoplacas presentaban diferente color por lo que se pudo llevar a cabo una detección visual de las bandas y posterior análisis de la absorbancia por Espectroscopía Óptica y confirmación por TEM<sup>27</sup>. En cuanto al estudio de la funcionalización, Hanauer et al.<sup>21</sup> funcionalizaron las AgNPs con diferentes recubrimientos que aportaban diferente carga a las NPs, por lo tanto se dirigían hacia el ánodo o el cátodo según su carga y además la movilidad electroforética también dependía de esta carga. Jimenez et al.<sup>39</sup> también utilizaron AGE para confirmar la funcionalización de AgNPs de 10 nm con distintos modificantes que



## Introducción

diferían entre sí en el peso molecular usando una concentración de 2% de Agarosa en el gel y TBE como tampón.

### 1.2.2. Electroforesis capilar

La electroforesis capilar (CE) también ha sido usada para la separación de NPs metálicas en función de su su relación tamaño-carga<sup>40-48</sup>. Aquí podemos distinguir dos modos de uso de esta técnica; MEKC (Cromatografía Micelar Electrocínética) que es el usado en la mayoría de los casos y que consiste en el uso de surfactantes con el objetivo de formar micelas para poder separar así especies neutras o negativas y CZE (Electroforesis Capilar en Zona) que pese a que no es tan usado como el anterior, en la bibliografía expuesta podemos encontrar algunas aplicaciones con NPs metálicas o de óxidos metálicos<sup>49</sup>.

A diferencia de la AGE, la electroforesis capilar ha sido descrita en la bibliografía para la caracterización de NPs en una muestra a partir de patrones de NPs de distinto tamaño. En concreto, podemos encontrar en la bibliografía la determinación de AgNPs y AuNPs en alimentos dietéticos a partir de una calibración usando patrones de AuNPs y AgNPs<sup>40</sup>. Para separar patrones de AuNPs (5, 20 y 50 nm) y caracterizar las AuNPs en una muestra comercial, Franze et al. usaron Dodecilsulfato de Sodio (SDS), 60 mM, como surfactante y ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfónico (CAPS), 10 mM, para garantizar un pH en torno a 10. El límite de detección estuvo en torno a los sub-microgramos por litro, la RSD (Desviación Estándar Relativa) del tiempo de migración estuvo entre 0,4 y 1,4% y RSD del área de pico estuvo ente 4% y 6%. Otra aplicación fue descrita por Qu et al.<sup>42</sup>, donde optimizaron las condiciones de separación (tipo de surfactante y concentraciones, composición del tampón y voltaje aplicado) para la caracterización de AuNPs usando patrones de distintos tamaños. Las condiciones elegidas fueron el uso de SDBS (70 mM), Tris (10 mM, pH=9,0) y voltaje aplicado de 30 kV. La RSD del tiempo de migración estuvo entre 0,7 y 2,1% y la RSD del área de pico entre 4,0 y 5,7%. Entre estas condiciones la que más resultó de interés fue el tipo de surfactante, ya que es la que va a producir que las NPs se muevan en función de su tamaño-carga. El resto de condiciones, composición del tampón especialmente, son muy similares a las que están descritas en la bibliografía para electroforesis en gel, en general se usan diferentes disoluciones tampón de pH para garantizar un pH superior a 8 en el que las NPs se encuentran cargadas negativamente.

## Introducción

Como ya hemos comentado, la mayoría de los métodos descritos que usan CE utilizan un surfactante para dotar de mayor carga negativa a las NPs y evitar que se agreguen. Entre estos surfactantes el más descrito en la bibliografía para la separación de AuNPs y AgNPs ha sido el SDS<sup>40,41,43-46</sup>. Este surfactante mejora la resolución de los electroferogramas obtenidos y hace posible la separación de los picos. El rango de concentraciones de SDS para las distintas condiciones usadas que encontramos en la bibliografía se encuentra entre 20 mM y 70 mM. Sin embargo, el Dodecilmecenosulfato de Sodio (SDBS) fue descrito como una opción más interesante ya que conseguía una mejor resolución que con el SDS. Qu et al.<sup>42</sup> estudiaron como influía el tipo de surfactante en la separación de las AuNPs mediante electroforesis capilar. Para ello probaron tres surfactantes distintos (SDS, SDBS y S10 (decilsulfato de sodio)) y entre ellos el SDBS presentó una mejor resolución de los picos comparado con los otros dos surfactantes.

También ha sido descrito el uso de Ácido Tiomálico (TMA) como agente para funcionalizar las NPs y dotarles de una mayor carga negativa, mejorando así la resolución<sup>47</sup>. En este caso lo usaron para separar AuNPs y AgNPs del mismo tamaño aprovechando que el TMA tiene mayor afinidad por las AgNPs que por las AuNPs, por lo tanto las AgNPs obtuvieron mayor carga negativa y eluyeron más tarde. Para ello, le añadieron el TMA al tampón compuesto por CAPS (ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico), metanol y SDS.

### **1.2.3. LA-ICP-MS como técnica de detección para la caracterización de AgNPs tras la separación por AGE.**

La espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) es una técnica de análisis multielemental e isotópico con capacidad de discriminar isótopos y además posee una elevada sensibilidad.

El acoplamiento de un sistema de ablación láser (LA) a un ICP-MS constituye una potente técnica para la determinación de metales en muestras sólidas sin necesidad de poner el analito metálico en disolución. Numerosos reviews han destacado el potencial de esta técnica en química medioambiental<sup>50,51</sup>. El uso de este sistema acoplado ha resultado de enorme interés para la detección de metales unidos a proteínas separadas previamente en un gel mediante PAGE<sup>50,52,53</sup>.

# Introducción

En este trabajo se ha realizado la separación de las AgNPs mediante AGE en función de su tamaño y posterior análisis por LA-ICP-MS directamente en el gel. Por otro lado, se ha procedido a la caracterización de complejos NP-Proteína (Proteínas Corona) sin romper la interacción NP-Proteína mediante AGE y posterior detección por LA-ICP-MS también directamente en el gel. Este método puede resultar de gran utilidad cuando las concentraciones de las NPs sean bajas y no permitan la detección visual o no haya suficiente sensibilidad por otros métodos de detección.

## **1.3. AgNPs Y PROTEÍNAS CORONA**

---

Cuando las NPs entran en un fluido biológico, proteínas u otras biomoléculas compiten por la superficie de las NPs, lo que da lugar a la formación de la llamada “proteína corona” o corona proteica (PC)<sup>54</sup>. Esta PC es de naturaleza dinámica y su composición variará con el tiempo como consecuencia de los diferentes procesos de asociación y disociación NP-Proteína<sup>55</sup>. La importancia toxicológica de este efecto recae en que la PC determinará el destino y el comportamiento de las NPs dentro del cuerpo humano<sup>56-58</sup>, además del secuestro de alguna de las proteínas como consecuencia de su adsorción sobre la superficie de la NP.

Así, la caracterización de la PC será clave para predecir el destino y el comportamiento de las AgNPs en el cuerpo humano y así realizar ensayos de toxicidad más precisos y exactos. Existen diferentes reviews que hablan sobre el tema<sup>59-61</sup>.

La electroforesis en gel de agarosa no ha sido descrita todavía para la caracterización de las PC, debido a que la mayoría de los trabajos publicados que usan técnicas electroforéticas para la caracterización de PC utilizan PAGE<sup>24,25</sup>. Sin embargo, mediante PAGE es necesario una ruptura del enlace NP-Proteína por lo que solo se obtiene información acerca de las proteínas y no del complejo NP-Proteína sin modificar. Así el interés en el desarrollo de un método basado en AGE para la caracterización de las PC se debe a la posibilidad de realizar el análisis sin romper la interacción NP-Proteína, cosa imposible con PAGE. Recientemente, se ha publicado un artículo en el que se describe la especiación de AuNPs en suero humano, mediante CE-ICP-MS. En este caso, también separan complejos de NP-proteína (Albumina y Transferrina) sin romper el complejo y con condiciones similares y compatibles a las fisiológicas reales<sup>62</sup>.

# Objetivos

## 2. OBJETIVOS

La Memoria se enmarca dentro de una de las líneas de trabajo del Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores (GEAS). El objetivo fundamental de este proyecto es la caracterización de AgNPs y de la posible formación de PC y especies derivadas aplicando técnicas electroforéticas basadas en AGE y como técnicas de detección ICP-MS y LA-ICP-MS. Para llevar a cabo este objetivo fundamental se ha trabajado en dos sublíneas de investigación:

- a) La caracterización de las AgNPs en función de su tamaño mediante AGE y posterior análisis por LA-ICP-MS.
- b) La caracterización mediante AGE y posterior análisis visual y por LA-ICP-MS de las distintas PC formadas (y especies derivadas por ICP-MS) como consecuencia de la incubación de las AgNPs con distintas proteínas (Albúmina y Transferrina) mayoritarias en el suero humano.

Los objetivos específicos de este trabajo para llevar a cabo el objetivo fundamental van a ser:

1. Optimización de un método capaz de caracterizar las AgNPs en función de su tamaño. Para ello se estudiarán los siguientes parámetros:
  - Concentración de Agarosa en el gel de separación.
  - Composición del tampón de electroforesis, tampón de carga y del gel.
  - Uso de distintos surfactantes y agentes pasivantes en el tampón de electroforesis, tampón de carga y en el gel.
  - Diferentes tratamientos de muestra en su mezcla con el tampón de carga.
2. Optimización de un método basado en AGE y detección por LA-ICP-MS capaz de confirmar la formación de PC y además capaz de separar las distintas PC en función del tamaño de las mismas.
3. Estudio de la influencia de las proteínas en el proceso de formación de PC sobre la capacidad de las AgNPs para liberar  $\text{Ag}^+$ . Para ello usaremos técnicas de separación como la centrifugación y ultrafiltración y posterior análisis por ICP-MS.

# Experimental

## 3. EXPERIMENTAL

### 3.1. INSTRUMENTACIÓN, APARATOS Y MATERIALES

---

#### 3.1.1. Instrumentación

- Instrumentación para llevar a cabo electroforesis en gel:
  - Sistema horizontal de electroforesis en gel Sub-Cell<sup>®</sup> GT System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.).
  - Fuente de alimentación PowerPac Basic<sup>™</sup> Power Supply (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.).
  - Secador de geles 583 Gel Dryer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.).

- Espectrómetro de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS) Elan DRC-e (Perkin Elmer, Toronto, Canadá). Equipado con conos de Ni, y un analizador de iones de tipo cuadrupolo.

Para el acoplamiento con el sistema de Ablación Láser (LA), la cámara y el nebulizador del equipo se desconectan y se conecta el sistema de Ablación Láser con el ICP-MS mediante tubos Tygon<sup>®</sup> S-50-HL Class VI de 3mm de diámetro interno y 55 cm de longitud.

- Sistema de Ablación Láser Nd-YAG UP-213 (New Wave Research, Huntington, Reino Unido).
- Balanza de precisión PL2001-L, precisión de  $\pm 0,1$  g (Mettler Toledo, Greifensee Suiza).
- Balanza analítica GH-200, precisión de  $\pm 0,1$  mg (A&D, Tokio, Japón).

#### 3.1.2. Aparatos

- Medidor de pH micropH 2001 (Crison, Barcelona, España).
- Centrífuga refrigerada Heraeus Multifuge X1R equipada con un rotor de ángulo fijo para tubos Eppendorf. Thermo (Fisher Scientific. Waltham, EEUU).
- Agitador magnético con placa calefactora 230 V (Bibby Sterilin, Staffordshire, Reino Unido).
- Micropipetas de 2-20  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L y 200-1000  $\mu$ L (Crison, Barcelona, España).

## Experimental

- Baño de Ultrasonidos (JP Selecta S.A., Barcelona, España).
- Horno Microondas (Geprüfte Sicherheit, Alemania).

### 3.1.3. Materiales

- Tubos tipo Falcon de 15 y 50 mL.
- Vasos de precipitados, botes de plástico y recipientes de plástico de distintos volúmenes.
- Cuentagotas de plástico.
- Vidrios de reloj.
- Probetas de distintos volúmenes.
- Espátulas de laboratorio.
- Varillas magnéticas cilíndricas para agitación de distintos tamaños.
- Pinzas de laboratorio.
- Portaobjetos (Menzel-Glaser®, Braunschweig, Alemania).
- Cinta adhesiva de doble cara (Tesa®, Hamburgo, Alemania).
- Papel para cromatografía 3 mm CHR (Whatman™, Maidstone, Reino Unido).
- Film resistente a altas temperaturas (Albal, Madrid, España).
- Lámina de cierre extensible Parafilm® “M” (Pechiney, Chicago, EE.UU.).
- Ultrafiltros Nanosep (Pall, Ann Arbor, EE.UU.) con membrana de poliéter sulfona de 3 KDa.

## 3.2. REACTIVOS, MUESTRAS Y DISOLUCIONES PATRÓN

---

### 3.2.1. Reactivos

- Ácido bórico cristalizado purísimo (Panreac, Barcelona, España).
- Ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) 69-70% (J. T. Baker, Phillipsburg, EE.UU.).
- Certified™ Megabase Agarose. (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EEUU)
- Coomassie® Brilliant Blue G-250, para electroforesis (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.).
- Dodecilsulfato de sodio (SDS), para electroforesis (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.).
- Dodecilbenzosulfato de sodio (SDBS), para electroforesis (Sigma-Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania).

## Experimental

- Ácido Mercaptosuccínico (TMA), (Sigma-Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania).
- Glicerol anhidro, para análisis, ACS (Sigma-Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania).
- Glicina, para electroforesis (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.).
- Ácido etilendiaminotetraacético (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.).
- Tris(hidroximetil)aminometano (Tris), para electroforesis (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.).

### 3.2.2. Muestras

- **Muestras de proteínas puras:**
  - Albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania). (67 kDa)
  - Transferrina humana (Sigma-Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania). (76,5 kDa)
- **Muestra de Colargol:** el Colargol es un producto de plata coloidal descrito en farmacopeas internacionales como fuerte antiséptico. Este producto proporcionado por el fabricante (Nº registro CAS 9007-35-6, laboratorios Argenol SL, Zaragoza, España) como polvo granulado, está formado por AgNPs (contenido total Ag ~70%) siendo el resto una matriz proteica (~30%).

### 3.2.3. Disoluciones patrón

- Las disoluciones patrón de plata (I) para la recta de calibrado se prepararon a partir de una disolución de estándar comercial (disolución estándar de Ag  $1000 \pm 2 \text{ mgL}^{-1}$ , Sigma-Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania).
- Disolución de Indio ( $1 \text{ mgL}^{-1}$  en  $\text{HNO}_3$  al 2%, Perkin Elmer, Madrid, España)
- **Disoluciones estándares de nanopartículas:**
  - Estándar comercial de  $100 \text{ mgL}^{-1}$  de AgNPs recubiertas de citratos de 10 nm tamaño (PlasmaChem, Berlín, Alemania).
  - Estándar comercial de  $20 \text{ mgL}^{-1}$  de AgNPs recubiertas de citratos de 20 y 40 nm de tamaño (NanoComposix, San Diego, Estados Unidos).

## Experimental

- Estándar comercial de  $20 \text{ mgL}^{-1}$  de AgNPs recubiertas de PEG de 10 nm (NanoComposix, San Diego, Estados Unidos).
- Estándar comercial de  $20 \text{ mgL}^{-1}$  de AgNPs recubiertas de PVP de 10 nm (NanoComposix, San Diego, Estados Unidos).

Los estándares de NPs así como la muestra de Colargol se sonicen siempre durante 5 min antes de su uso.

El 10xTris-Borato-EDTA (TBE) se prepara pesando 108 g Tris, 55 g de ácido bórico y añadiendo 40 mL de EDTA 0,5 M (pH 8,0). Todo ello se disuelve en 600 mL de agua Milli-Q. A partir de esta concentración se preparan las diluciones 1xTBE y 0,5xTBE.

Todas las disoluciones se prepararon a partir de los reactivos y patrones citados utilizando agua ultrapura (Milli-Q) obtenida a partir de agua tratada con un purificador Millipore.

Todo el material utilizado se sumerge en una disolución de  $\text{HNO}_3$  en agua ultrapura al 10% (v/v) al menos durante 24 horas, se lava a continuación con agua ultrapura, y se deja secar en estufa a  $60^\circ\text{C}$  antes de su uso.

### **3.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**

---

#### **3.3.1. Métodos electroforéticos**

Con el objetivo de poder caracterizar distintas AgNPs mediante electroforesis en gel en función de su tamaño se ha procedido a la optimización de distintos parámetros de la electroforesis como son: la composición del gel, el tampón de electroforesis y el tampón de carga. A continuación se describen los métodos utilizados.

Todos los métodos utilizados se basan en electroforesis en gel de Agarosa (AGE). La Agarosa es un polímero lineal (Peso molecular en torno a 12000 Da) formado por unidades de D-galactosa y 3,6-anhidrogallactosa con 0.04% de iones sulfato. El tamaño de poro viene determinado por la concentración del gel en la disolución, cuanto mayor sea la concentración de Agarosa menor será el rango de tamaños de poros y menor el rango de tamaños de NPs que se pueden separar, como se puede ver la tabla A.1 del anexo A. Por lo tanto si las NPs tienen un tamaño mayor o menor a los límites superior



## Experimental

e inferior respectivamente aparecerán en el pocillo ya que no difundirán a lo largo del gel.

La preparación del gel es sencilla. Primero se pesa la cantidad correspondiente de Agarosa en un erlenmeyer y se disuelve en el volumen correspondiente (1 Litro, puesto que nuestro sistema tiene un tamaño de 15 x 10 cm y haremos un gel de espesor de 0,75 cm) de tampón de electroforesis. Se tapa con un vidrio de reloj y la mezcla se calienta poco a poco en el microondas hasta ebullición en intervalos de 30-60 s, hasta que no quede ninguna partícula de Agarosa sin disolver. Posteriormente se enfría a 50°C en un baño de agua y se vierte con cuidado el contenido sobre el soporte de electroforesis. La total disolución de la Agarosa en el tampón de electroforesis y la lenta cristalización del gel (enfriar lentamente en baño de agua) es importante para conseguir la homogeneidad de los poros en el gel. En el soporte previamente se coloca cinta de pegar para formar una celda con las cuatro paredes cerradas. Hay que comprobar que al verter la disolución esta no se salga y que las paredes construidas queden lo más rectas posibles. Se coloca el peine y se deja enfriar de 45 a 60 min.

Como ya he comentado la disolución que se usa para disolver la Agarosa y formar el gel es el tampón de electroforesis en la gran mayoría de los casos y concretamente en todos los nuestros. El tampón de electroforesis además será usado para llenar la cubeta de electroforesis cubriendo el gel y permitir así el paso de la corriente. Además los componentes del tampón de electroforesis interaccionan con las NPs e influyen en la separación de estas. En este trabajo se ha partido del tampón más utilizado en la bibliografía (Tris-Borato-EDTA) y se han hecho distintas modificaciones con el objetivo de poder caracterizar tanto una muestra comercial de AgNPs (Colargol) como posibles PCs formadas tras la incubación de la muestra con proteínas (Albúmina y Transferrina).

El tampón de carga lo añadimos previamente a la muestra/patrón a someter a la electroforesis, su función es interaccionar con las NPs y ayudar a la separación de estas. Este tampón de carga contiene normalmente una disolución muy similar a la del tampón de electroforesis (ya que entrarán en contacto durante la electroforesis) y una cantidad de glicerol con el objetivo de darle más densidad a la disolución y que se asiente mejor en el pocillo, evitando que al cubrir el gel con el tampón de electroforesis la muestra escape del pocillo y se distribuya por el tampón de electroforesis.

## Experimental

El principal problema al que nos enfrentamos cuando tratamos de caracterizar las NPs por medio de AGE es que las NPs pueden interaccionar con el gel o pueden perder su recubrimiento y se agregan quedándose en el pocillo o sin avanzar según su relación tamaño-carga. Esto logicamente va a depender del tipo de patrones de AgNPs que se utilicen y del tipo de muestra que se pretenda caracterizar. Por lo tanto, nosotros vamos a intentar optimizar un método adecuado para la caracterización de las AgNPs en función de su tamaño. Para ello, se van a optimizar diferentes parámetros de la electroforesis.

### **3.3.1.1. Método PEG-Tris-Borato-EDTA-AGE**

Este método consiste en la pasivación del gel de Agarosa mediante el uso de PoliEtilenGlicol (PEG), que se añade al gel de electroforesis y reacciona con las cargas superficiales de la Agarosa eliminándolas. La pasivación del gel para evitar interacciones entre las NPs y el gel derivadas de las cargas superficiales de este ha sido estudiado con anterioridad<sup>63</sup>. En la tabla A.2 del anexo A se muestra la composición de los distintos tampones empleados, así como la descripción del procedimiento y condiciones experimentales.

### **3.3.1.2. Método SDS-Tris-Borato-AGE**

Este método consiste en el uso de SDS como agente pasivante del gel y como surfactante en el tampón de electroforesis y en el tampón de carga. De esta manera intentamos evitar interacciones de las AgNPs con el gel mediante la pasivación y evitamos que las AgNPs se agreguen mediante el uso de surfactantes.

Se utilizaron distintos procedimientos en los que se varió la concentración de surfactante tanto en el tampón de electroforesis (T.E.) como en el tampón de carga (T.C.) Además, se propone una variante al método que consiste en eliminar el EDTA de ambos tampones (tampón de electroforesis y tampón de carga) ya que su uso es descrito en la bibliografía como agente quelante de iones  $Mg^{2+}$  evitando la degradación de ácidos nucleicos por nucleasas, que no es nuestro caso.

En la tabla A.3. del anexo A se muestra la composición de los distintos tampones empleados, así como la descripción del procedimiento y condiciones experimentales.

## Experimental

### **3.3.1.3. Método SDBS-Tris-Borato-AGE**

El uso de SDBS como surfactante fue estudiado por Qu et al.<sup>42</sup> para análisis de nanopartículas de oro (AuNPs) mediante CE, aquí lo probaremos para su aplicación en AGE añadiéndolo tanto al tampón de carga, como al tampón de electroforesis y al gel. El resto de componentes de los tampones son idénticos al método anterior.

En la tabla A.4 del anexo A se muestra la composición de los distintos tampones empleados, así como la descripción del procedimiento y condiciones experimentales.

### **3.3.1.4. Método SDS-Tris-Glicina-AGE**

El uso de Tris-Glicina utilizado en los distintos tampones para la separación de proteínas basadas en el método Laemli SDS-PAGE está descrito en la bibliografía desde hace tiempo y es el método más utilizado para la separación de proteínas. Incluso el uso de Tris-Glicina en este método (SDS-PAGE) ha sido descrito para el análisis de NPs (QDs)<sup>23</sup>. En este método se propone el uso de Tris-Glicina (pH=8,3) en lugar de Tris-Borato para la caracterización de NPs pero utilizando geles de Agarosa.

En la tabla A.5 del anexo A se muestra la composición de los distintos tampones empleados, así como la descripción del procedimiento y condiciones experimentales.

### **3.3.1.5. Método SDS-TMA-Tris-Glicina-AGE**

El TMA (ácido Tiomálico) ha resultado útil para funcionalizar las NPs e impedir que se agreguen<sup>30,47</sup>. En las tablas A.6. 1. y A.6. 2. del anexo A se muestran la composición de los distintos tampones empleados, así como la descripción del procedimiento y condiciones experimentales en las que se ha aumentado la concentración de TMA en el tampón de carga.

Además, las tablas A.6. 3.- A.6. 7. describen distintas condiciones en las que se procedió también a variar el % de Agarosa.

### **3.3.1.6. Tratamiento posterior de los geles**

Una vez obtenido, el gel es lavado con abundante agua, colocado en un papel de filtro, cubierto por un film y secado a vacío durante dos horas a una temperatura alrededor de 70°C en un secador de geles. Para los geles secos obtenidos se usan dos modos de análisis distintos. Un primer análisis visual, que debido a que muchas de las NPs no son

## Experimental

coloreadas no siempre es posible y un segundo análisis mediante el LA-ICP-MS. La detección por LA-ICP-MS es útil cuando no se obtiene o se quiere contrastar la información obtenida visualmente y para determinar AgNPs de baja concentración. Cabe remarcar que estos geles no quedan totalmente pegados al papel de filtro y se levantan al introducirlos en la celda de ablación, por lo que una vez que ha finalizado el programa de secado (comentado al principio del párrafo) los geles deben ser pegados posteriormente con pegamento stick al papel de filtro.

### 3.3.2. Método LA-ICP-MS

La determinación de NPs tras su separación por AGE se lleva a cabo mediante ICP-MS introduciendo la muestra mediante un sistema de ablación láser. El sistema debe optimizarse de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, la puesta a punto diaria del instrumento se lleva a cabo utilizando una disolución de Rh, Mg, Pb, Ba y Ce (10 µg/L cada uno). El plasma se apaga y la cámara de nebulización y el nebulizador se sustituyen por el tubo de conexión con el sistema de ablación láser.

Las condiciones de medida del sistema se muestran en la tabla A.7 del anexo A. La adquisición de la señal en el ICP-MS comienza automáticamente al mismo tiempo que la ablación de muestras.

Para su análisis por esta técnica se necesita un tratamiento previo, los carriles del gel obtenido por el procedimiento 3.3.1.6 son recortados, cortados por la mitad y pegados en un portaobjetos que posteriormente será introducido en la celda de ablación del equipo de láser para su análisis.

Se utiliza Ar como gas portador y la optimización final en seco del voltaje de las lentes y el caudal de gas portador (Ar) se lleva a cabo monitorizando la señal de  $^{63}\text{Cu}$  de un vidrio certificado NIST.

Se realizan dos barridos, uno por cada mitad del gel a una velocidad de  $60\text{ }\mu\text{m s}^{-1}$ . El tiempo de adquisición de datos del ICP-MS se ajusta a la longitud del gel. Se midieron los dos isótopos de la plata ( $^{107}\text{Ag}$  y  $^{109}\text{Ag}$ ) y se utiliza  $^{13}\text{C}$  como patrón interno para corregir la deriva de la señal. Se mide la intensidad de la señal en función del tiempo durante el barrido del láser y esos datos son exportados y posteriormente tratados en Excel para su representación gráfica.

## Experimental

En las gráficas obtenidas por LA-ICP-MS se representa la intensidad relativa de los distintos isótopos respecto a la intensidad de  $^{13}\text{C}$  frente a la distancia del gel. Se incluye también una foto del carril de gel medido en cada caso para su comparación mediante detección visual.

### 3.3.3. Caracterización de proteínas corona y especies derivadas

Una vez optimizados los métodos electroforéticos para la caracterización de AgNPs se procedió a su aplicación para la caracterización de posibles proteínas corona. Para ello, se realizó la incubación de patrones de AgNPs (recubiertas de citratos) y de la muestra comercial con dos proteínas puras, Albúmina y Transferrina (dos proteínas mayoritarias en el suero sanguíneo humano). Además se estudió como afecta la presencia de estas proteínas a la liberación de Ag (I) en la muestra comercial (Colargol).

#### 3.3.3.1. Método de la incubación de AgNPs con proteínas

Se realizó el siguiente procedimiento

- Se preparan disoluciones 1:1 (v/v) (volumen final 1 ml) de proteína pura (2000  $\text{mgL}^{-1}$ ) y AgNPs (Colargol, patrones de AgNPs recubiertos con citratos de 10, 20 y 40 nm) y disoluciones blanco del mismo volumen de las dos proteínas y de la disolución de Colargol. Todas las disoluciones de las NPs fueron llevadas a una concentración de 20  $\text{mgL}^{-1}$  para evitar posibles discrepancias en los resultados debido a la diferente concentración.
- Se incuban las disoluciones obtenidas a 37°C y 550 rpm durante una hora.
- Posteriormente se centrifugaron las disoluciones incubadas a 12000 rpm durante 15 min a 4°C. Se separó el precipitado pipeteando el sobrenadante con cuidado de no coger parte del precipitado. Para el estudio de la PC y la liberación de Ag(I) parte de los precipitados fueron separados del sobrenadante y parte fueron lavados tres veces con  $\text{H}_2\text{O}$  Mili-Q y separado el último precipitado del sobrenadante.
- Los precipitados obtenidos tanto después de centrifugar una vez y que no fueron lavados, como los que fueron lavados tres veces fueron sometidos a la electroforesis para estudiar la caracterización de las PC mediante AGE-LA-ICP-MS.

## Experimental

- Los sobrenadantes obtenidos tras la incubación del Colargol con las proteínas, tanto después del primer centrifugado como los obtenidos después del triple lavado, fueron medidos en el ICP-MS para determinar la cantidad de Ag(I) liberada por las NPs.

### **3.3.3.2. Método de determinación cuantitativa de Ag(I) liberada en la incubación de AgNPs con proteínas por ICP-MS**

Se determinó la cantidad total de Ag (I) liberada por las AgNPs en la muestra de Colargol tras la incubación de las mismas con Albúmina y Transferrina midiendo los sobrenadantes obtenidos mediante el procedimiento 3.3.3.1.

- Para medir la cantidad de Ag(I) total mediante ICP-MS necesitamos acondicionar la muestra a una concentración más baja, por lo que realizamos diluciones de los sobrenadantes obtenidos en el procedimiento 3.3.3.1. Las diluciones se muestran en la tabla A.8 del anexo A.
- Las disoluciones obtenidas son medidas mediante ICP-MS. Las condiciones del instrumento se resumen en la tabla A.9 del anexo A.
- Para realizar la determinación se preparó una recta de calibrado entre 1 y 1000  $\mu\text{gL}^{-1}$ . Además se utilizó In ( $25 \mu\text{gL}^{-1}$ ) como patrón interno.

Para medir la cantidad de Ag(I) libre se realizó el siguiente procedimiento:

- Se prepararon disoluciones 1:1 (v/v) (volumen final 0,6 ml) de proteína pura ( $2000 \text{ mgL}^{-1}$ )-Colargol ( $1000 \text{ mgL}^{-1}$ ) y disoluciones blanco del mismo volumen de las dos proteínas y de la disolución de NPs.
- Se realizó una ultrafiltración con las disoluciones obtenidas a 12000 rpm durante 15 min a 4°C. Se midió la cantidad de Ag(I) en el ultrafiltrado mediante ICP-MS. Se lavó la membrana dos veces mediante la centrifugación de 500  $\mu\text{l}$  de agua Mili-Q antes de la ultrafiltración con el objetivo de limpiar y acondicionar la membrana.
- Para medir la cantidad de Ag(I) mediante ICP-MS necesitamos acondicionar la muestra a una concentración más baja, por lo que realizamos diluciones de las disoluciones obtenidas que se muestran en la tabla A.10 del anexo A.
- Las disoluciones obtenidas son medidas mediante ICP-MS. Las condiciones del instrumento se resumen en la tabla A.9 del anexo A.

### 3.4. RESULTADOS Y DISCUSION

---

#### 3.4.1. Optimización de la caracterización de AgNPs por AGE y detección por LA-ICP-MS

Como hemos comentado, la caracterización de las NPs es un tema de vital importancia para estudios de toxicidad y ecotoxicidad, para ello se dispone de numerosas técnicas capaces de caracterizar las distintas propiedades de las NPs<sup>17</sup>. Las técnicas electroforéticas han sido usadas para caracterizar las NPs en función de su forma y tamaño como ya se ha comentado en la introducción.

En este apartado, el objetivo es llevar a cabo estudios sobre la caracterización de AgNPs utilizando AGE y LA-ICP-MS como técnica de detección. Como se ha explicado en la introducción en la mayoría de los trabajos publicados el uso de AGE para caracterización de NPs se centra en la caracterización de las distintas NPs tras su síntesis y funcionalización. Nuestro objetivo en este TFM ha sido intentar desarrollar un método basado en el uso de AGE y LA-ICP-MS para la caracterización de muestras reales de AgNPs y PC utilizando patrones de AgNPs. En estudios previos realizados en el grupo de investigación, se observó que el principal problema para esta caracterización era la agregación de las AgNPs al entrar en el gel de Agarosa<sup>64-66</sup>.

Tal como se describe en el apartado 3.2.3. (Disoluciones patrón) patrones utilizados para la caracterización por AGE son patrones comerciales de 10, 20 y 40 nm recubiertos con citratos (2 mM citratos) que les confiere una carga altamente negativa. En concreto el patrón de 10 nm ha sido también caracterizado y se ha calculado su potencial Z como -30 en un rango de pHs entre 8 y 9<sup>67</sup>, que es el rango de pHs en el que nos moveremos nosotros (~8-9).

En cuanto a las condiciones de partida, para el método electroforético se han utilizado porcentajes de gel pequeños, altos voltajes y tampón de electroforesis modificado para la separación de AuNPs recubiertas de citratos<sup>28,66</sup>.

Como componentes del tampón de electroforesis y del tampón de carga se partió de una mezcla de Tris-Borato-EDTA, que es el tampón más usado para la separación de AgNPs y AuNPs en AGE<sup>21,27,28</sup>. La concentración de estos componentes fue optimizada previamente por otros compañeros del grupo de investigación<sup>64,66</sup>, obteniéndose mejores

## Experimental

resultados con una concentración de 0,5xTBE, pero sin llegar a una buena separación de las AgNPs.

A continuación describiremos los procedimientos y estrategias que hemos desarrollado, así como sus resultados, para la optimización de la separación de las AgNPs en función de su tamaño.

### **3.4.1.1. Tipo de agente pasivante del gel y uso de surfactantes**

Nuestro trabajo se centra en la optimización de la separación de las NPs y para solventar el problema de la agregación de las AgNPs patrones se propone el uso de surfactantes en el tampón de electroforesis y agentes pasivantes en el gel para eliminar la interacción de las NPs con el gel. Para ello, se utilizó los métodos descritos en el apartado 3.3.1.

#### *3.4.1.1.1. Utilización de PEG*

El uso de PEG para la pasivación del gel se describe en el método 3.3.1.1.(Método PEG-Tris-Borato-EDTA-AGE). La función del PEG sobre el gel es reaccionar con la Agarosa y eliminar las cargas superficiales de esta. De esta manera evitamos posibles interacciones que hacen que las NPs no se muevan de acorde a su relación tamaño-carga como demostraron Zhu et al.<sup>63</sup>.

Según Zhu et al.<sup>63</sup> la velocidad de migración para NPs de Poliestireno mantiene una respuesta lineal independiente de la concentración de PEG entre 0,1 y 1% de PEG para las NPs de poliestireno. Este rango es altamente dependiente de la concentración de gel, del tipo de NPs usadas y del tamaño de las mismas. Aún así, en nuestros estudios usaremos una concentración de 1% que entra dentro del rango obtenido por Zhu et al. con el fin de pasivar el gel lo máximo posible sin salirnos del rango de idealidad.

Los electroferogramas obtenidos tras la detección por LA-ICP-MS se pueden observar en las figuras B1 y B2 pertenecientes al anexo B. Los resultados obtenidos muestran que las NPs tanto los patrones como la muestra de Colargol se quedan en los pocillos y no avanzan en relación a su tamaño-carga ya que las señales de Ag obtenidas por LA-ICP-MS se obtienen al principio del gel coincidiendo con el pocillo. Por lo tanto, se desestimó el uso de PEG como pasivante del gel en nuestro caso.



## Experimental

### 3.4.1.1.2. Utilización de SDS. Influencia de la concentración.

#### a) Tampón de electroforesis, gel y tampón de carga.

Se continuó la optimización añadiendo SDS al gel con el objetivo de conseguir una pasivación del gel. El uso de SDS como agente de pasivación del gel también fue descrito anteriormente por Zhu et al<sup>63</sup>. En cambio, en nuestro caso el SDS no solo fue usado como agente pasivante sino que también se añadió al tampón de electroforesis y al tampón de carga con el objetivo de que las AgNPs no se agreguen y se muevan de acuerdo a su relación tamaño-carga. El SDS es un surfactante, una molécula con una parte polar y una larga cadena apolar que es capaz de unirse a la superficie de las NPs a través de la parte hidrofóbica con la parte hidrófila hacia fuera<sup>68</sup>. De esta manera se forma una micela y la agregación de las NPs está impedida estérica y electrostáticamente, proporcionando estabilidad a la suspensión de NPs. El uso de este surfactante ha sido ampliamente descrito en la bibliografía para la separación de NPs metálicas en AGE<sup>28,30</sup> y sobre todo en electroforesis capilar<sup>19,40,42-47</sup>, así como en otros métodos de separación de NPs como Field Flow Fractionation<sup>67,69</sup>.

Se aplicó el método descrito en el apartado 3.3.1.2 (Método SDS-Tris-Borato-AGE) y las condiciones descritas en el conjunto de tablas A.3. del anexo A. Se probaron diferentes cantidades de SDS en el tampón de electroforesis, tampón de carga y en el gel (0,1%, 0,3%, 1% y 2%).

El uso de EDTA en el tampón inicial usando TBE (descrito para la separación de ácidos nucleicos) tiene como principal objetivo secuestrar a los iones  $Mg^{2+}$  con el fin de que no influyan en la electroforesis. Por otro lado, la fuerza iónica del medio afecta a la estabilidad de las NPs, cuanto mayor sea la fuerza iónica más difuso será el campo eléctrico de la capa difusa de la NP y por lo tanto menor será el apantallamiento entre las cargas superficiales de las NPs y más facilidad para agregarse. Puesto que nuestras muestras no van a contener  $Mg^{2+}$  y que la presencia del EDTA aumenta la fuerza iónica del medio, se decidió prescindir de este componente en el tampón de electroforesis y en el gel, así como en el tampón de carga. Esta decisión fue aplicada para el procedimiento descrito en la tabla A.3.4 correspondiente al anexo A (AGE con 2% SDS en gel, tampón de electroforesis y tampón de carga) y en los sucesivos experimentos; en los procedimientos anteriores (AGE con 0,1, 0,3 y 1% SDS en gel, tampón de electroforesis

## Experimental

y tampón de carga) se utilizó el EDTA como componente del tampón de electroforesis y del tampón de carga.

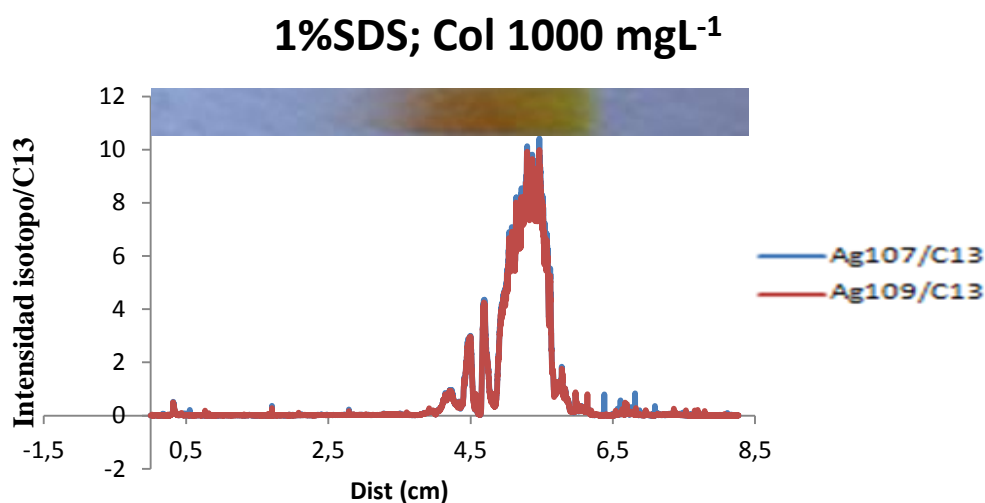
En las figuras B3 y B4 correspondiente al anexo B se muestran algunos de los electroferogramas de los patrones de AgNPs recubiertas con citratos (10 y 20 nm) obtenidos correspondientes a las electroforesis con 0,1%, 0,3%, 1% y 2% SDS en tampón de electroforesis, tampón de carga y en el gel. El resultado no fue satisfactorio para ninguna de las diferentes cantidades de surfactante probadas y para ninguno de los patrones de AgNPs. Todos ellos se quedan en el pocillo o entraban muy poco en el gel. Las AgNPs de 10 nm se podían observar en el pocillo (figura B3 correspondiente al anexo B), lo que es señal de que las AgNPs han perdido su recubrimiento y se han agregado. Si es cierto que a medida que aumentamos la cantidad de SDS las AgNPs entran un poco más en el gel como se puede observar en la figura B4 del anexo B, pero en ningún caso se mueven de acuerdo a su relación tamaño-carga. En la bibliografía<sup>37</sup> ya se describe la pérdida de citratos en la separación de AuNPs y conjugados de ARN-AuNPs por AGE y la necesaria funcionalización con bis(p-sulfonatofenil)fenilfosfina (BP) de las AuNPs recubiertas con citratos para que avancen en el gel.

En estudios previos del grupo de investigación, sin SDS en el tampón de carga y en el tampón de electroforesis no se habían observado las AgNPs en la muestra de Colargol como una banda definida en la segunda mitad del gel, sino que aparecía una banda ancha al principio del gel que era consecuencia de la interacción de las AgNPs con el gel, quedándose éstas retenidas y sin avanzar de acuerdo a su relación tamaño-carga<sup>64</sup>. En la figura 3.4.1. se puede observar que las AgNPs en la muestra de Colargol si que avanzaban en el gel y aparentemente se movían de acuerdo a su relación tamaño-carga, ya que aparecieron al final del gel. Esto se consiguió con una cantidad de SDS en el tampón de electroforesis, tampón de carga y en el gel de 1% o superior (2%).

En la figura 3.4.1. también se puede observar visualmente la banda obtenida en el carril del gel. Tanto la banda obtenida en el electroferograma con detección por LA-ICP-MS como la banda observada visualmente coinciden en el gel a la misma distancia.

## Experimental

Figura 3.4.1. Electroferogramas obtenidos mediante LA-ICP-MS tras la separación por 0,5%AGE; 1%SDS; 0,5xTBE para la muestra de Colargol.



La ausencia de una banda al principio del gel indica que las NPs no se quedan en el pocillo y parecen avanzar de acuerdo a su relación tamaño-carga. De acuerdo a la caracterización de la muestra de Colargol aplicando el método FFF-ICP-MS, las AgNPs tienen un tamaño de 15,4 nm<sup>67</sup>. Al utilizar un gel 0,5% de Agarosa las NPs deberían avanzar casi hasta el final del gel (ver tabla A.1)

Como se puede observar en los electroferogramas obtenidos en la figura B5 correspondiente al anexo B, las AgNPs en la muestra de Colargol en la electroforesis con 2%SDS en tampón de carga, tampón de electroforesis y gel muestran unos resultados similares a los obtenidos con 1%SDS. Las AgNPs en la disolución de 1000 mgL<sup>-1</sup> se observan tanto visualmente como en el electroferograma obtenido con detección por LA-ICP-MS. Además el pico que se observa visualmente corresponde al observado en el electroferograma. Para las AgNPs en la muestra de Colargol de 50 mgL<sup>-1</sup> se observó también mediante LA-ICP-MS una señal de baja intensidad en la misma posición, sin embargo el análisis visual no permitía ver las AgNPs en el carril a esta concentración. Las AgNPs en ambas muestras aparecen en la segunda mitad del gel al igual que lo hacían con 1%SDS (ver figura 3.4.1).

Lo primero que nos llevaron a pensar estos resultados es que los patrones de NPs se comportan de diferente modo que la muestra de Colargol. Esto hace imposible la caracterización de muestras de NPs en función de su tamaño a partir de patrones de

## Experimental

tamaño conocidos. Los patrones de NPs de acuerdo al fabricante llevan un recubrimiento de citratos, mientras que como se ha comentado en la descripción de las muestras (apartado 3.2.2.), la muestra de Colargol está formada por AgNPs (70%) pero tiene una matriz proteica (~30%) que hace que las NPs sean más estables y no se agreguen y en presencia de SDS avancen adecuadamente en el gel.

Se observó que al aumentar la cantidad de SDS en el tampón de electroforesis y en el gel se disminuía el voltaje durante la electroforesis y la cubeta se calentaba en exceso. Esto se puede explicar mediante el efecto Joule, que afirma que cuando pasa corriente sobre una disolución parte de esa energía se disipa como calor debido al choque de los electrones. Cuanto mayor es la resistencia mayor energía se disipa y mayor calor se desprende. Por lo que la adición de SDS al tampón de electroforesis y al gel impone una resistencia al paso de la corriente que hace que se sobrecaliente el equipo y el voltaje efectivo al que es sometida la electroforesis sea menor. Por lo tanto se fijó la cantidad de SDS en el tampón de electroforesis y en el gel en 1%, una cantidad para la cual se disipa energía por efecto Joule y se baja el voltaje, pero de forma asumible para que la electroforesis se realice sin ningún problema.

### *3.4.1.1.3. Utilización de SDBS. Influencia de la concentración.*

#### *a) Tampón de electroforesis, gel y tampón de carga.*

El uso de SDBS como surfactante fue estudiado por Qu et al.<sup>42</sup> para análisis de AuNPs mediante electroforesis capilar y su caracterización en un suplemento alimenticio, aquí lo probaremos para su aplicación en la electroforesis en gel de Agarosa añadiéndolo tanto al tampón de carga, como al tampón de electroforesis y al gel. El SDBS es un surfactante al igual que el SDS pero contiene un grupo fenilo en su cadena conectado directamente con el grupo sulfona, lo que le proporciona una mayor hidrofobicidad comparado con el SDS. Qu et al. observaron que para electroforesis capilar la resolución en la separación era mayor con el uso de SDBS en vez de con SDS. Esto lo explican debido a la diferencia de hidrofobicidad entre ambos. Dado que las moléculas de surfactante se unen alrededor de la NP a través de las cadenas hidrocarbonadas, el número de moléculas que se adhieren a la NPs de SDBS (más hidrofóbico que con SDS) es mayor que el de SDS debido a un empaquetamiento más compacto como consecuencia de una mayor hidrofobicidad del SDBS que del SDS. A su vez, la cantidad de moléculas de surfactante que adsorbe la NP es proporcional al radio de esta, cuanto

## Experimental

más grande sea mayor cantidad de moléculas de surfactante cogerá. Así, teniendo en cuenta estos dos hechos, la diferencia de cargas entre las AgNPs de diferentes tamaños es mayor para el SDBS que para el SDS. En electroforesis capilar las NPs migran hacia el cátodo como consecuencia del flujo electroosmótico y la movilidad electroforética favorece (si la NP tiene cargas positivas) o se opone (si la NP tiene cargas negativas) al flujo electroosmótico.

$\mu_{NP} = FEO - \mu_{ef}$  donde  $\mu_{NP}$  = movilidad NP; FEO = Flujo Electroosmótico y  $\mu_{ef}$  = movilidad electroforética

$\mu_{ef} = \frac{q}{6\pi\eta r}$  donde  $\mu_{ef}$  = movilidad electroforética; q = carga;  $\eta$  = viscosidad de la disolución y r = radio de la NP.

Por lo tanto, si consideramos que la NPs es esférica y la carga es proporcional a la superficie de la NP.  $q \propto 4\pi r^2$  donde q= carga y  $4\pi r^2$ =superficie de una esfera

Si sustituimos la carga en la ecuación de la movilidad electroforética:  $\mu_{ef} \propto \frac{q}{6\pi\eta r} \propto \frac{4r}{6\eta}$

Como hemos demostrado, simplificando la ecuación llegamos a la conclusión que la movilidad electroforética en presencia de surfactantes es proporcional al radio. Por lo tanto, las NPs más pequeñas tendrán menor carga negativa y menor tamaño, por lo que en CE la movilidad electroforética se opone menos al flujo electroosmótico y saldrán antes. En referencia al uso de distintos surfactantes, si el empaquetamiento con SDBS es más compacto se unen mayor cantidad de moléculas y la diferencia de cargas entre dos NPs de distinto tamaño es mayor y por lo tanto la diferencia entre las movilidades electroforéticas es también mayor, lo que se traduce en una mayor resolución.

En cambio, en la electroforesis en gel las NPs corren hacia el ánodo de forma inversamente proporcional a su relación tamaño-carga como consecuencia únicamente de la movilidad electroforética. Las NPs más pequeñas avanzarán más rápido que las más pesadas y por otro lado, las NPs cargadas más negativamente también avanzarán más rápidamente. Por lo tanto, no nos interesa que la diferencia de cargas entre NPs de diferentes tamaños sea muy grande, puesto que si las AgNPs de 40 nm tienen mucha más carga negativa que las de 10 nm la resolución será mala, ya que ambos efectos (tamaño y carga) se oponen.

## Experimental

Aún así, con objeto de mejorar el movimiento de los patrones de AgNPs en el gel para su posible utilización en la caracterización de muestras de AgNPs por AGE, se utilizó SDBS con el objetivo de intentar obtener una mejor interacción del surfactante con la NP y que permita una separación de acorde a su relación tamaño-carga. Para ello, se aplicó el método descrito en el apartado 3.3.1.3 (Método SDBS-Tris-Borato-AGE) y las condiciones descritas en la tabla A.4 del anexo A que incluyen SDBS en tampón de carga, tampón de electroforesis y gel.

Los resultados tampoco fueron satisfactorios. Las AgNPs patrón recubiertas de citratos entraban un poco en el gel pero se quedaban en el pocillo o interaccionaban con el gel y no avanzan de acorde a su relación tamaño-carga, como se puede ver en la figura B6 del anexo B.

Como se aprecia en la figura B7 del anexo B, el efecto del SDBS en el gel, tampón de electroforesis y tampón de carga para la muestra de Colargol es el mismo que el SDS. Las NPs avanzan hasta la segunda mitad del gel obteniéndose bandas definidas. No se observa ninguna mejora con respecto al SDS y solo cabe destacar que para la concentración de  $25 \text{ mgL}^{-1}$  no se observa señal debido al alto ruido de fondo.

### b) Influencia del surfactante en el tampón de carga y de distintos métodos de preparación de muestra.

El uso de SDBS en el tampón de carga, en el tampón de electroforesis y en el gel no supone ninguna mejora apreciable en la separación de las AgNPs con respecto al uso de SDS. Además, como hemos comentado en el apartado anterior, no queremos que haya una gran diferencia de cargas negativas entre las AgNPs de distintos tamaños. Por otro lado, la presencia de SDBS en el tampón de electroforesis y en el gel produce una mayor resistencia para el paso de la corriente (caída del voltaje) que el SDS para la misma concentración, lo que no favorece la correcta realización de la electroforesis.

Por lo tanto, se decidió continuar con el uso de SDS como surfactante en el tampón de electroforesis. En cambio, en el tampón de carga se probaron los dos surfactantes (2%SDS en la mitad de los carriles del gel y 1%SDBS en la otra mitad del gel). Como ya hemos comentado se fijó la cantidad de SDS en el tampón de electroforesis y en el gel a 1% para minimizar la resistencia al paso de la corriente. Dado que el uso de un surfactante como el SDS debía conseguir que las AgNPs avanzaran de acorde a su

## Experimental

relación tamaño-carga, se pensó que el problema podría estar en la interacción de las AgNPs con el surfactante. Para mejorar esta interacción se probaron dos tratamientos previos de la muestra; uno consistía en mezclar la disolución de AgNPs con el tampón de carga y dejarlas a agitar durante dos horas y el otro en mezclar las AgNPs con el tampón de carga y dejarlas agitar dos horas previo calentamiento (5 min a 100°C).

Posteriormente se aplicó el procedimiento descrito en la tabla A.3.5 del Anexo A, correspondiente al método SDS-Tris-Borato-AGE descrito en el apartado 3.3.1.2. Este procedimiento fue llevado a cabo con los tratamientos de muestra que acabamos de comentar.

Como se puede observar en las figuras B8 y B9 del Anexo B no se obtuvieron mejores resultados con los dos procedimientos de tratamiento de muestra para mejorar la interacción de las AgNPs con el surfactante en el tampón de carga ya que se puede ver que tanto los patrones recubiertos de citratos de 10 nm como los de 20 nm se quedan al principio del gel sin avanzar adecuadamente obteniéndose en general bandas bastante anchas.

### *3.4.1.1.4. Utilización del Tris-Glicina en el tampón de electroforesis, en el tampón de carga y en el gel.*

Debido a que los resultados obtenidos no fueron lo suficientemente buenos ya que no se consiguió la correcta separación de los patrones de AgNPs se probó el uso de Tris-Glicina tanto en el gel como en el tampón de electroforesis y tampón de carga. El uso de Tris-Glicina y 0,1%SDS en el gel ha sido previamente estudiado<sup>66</sup> para la separación de AuNPs de 5, 10 y 20 nm obteniéndose mejores resultados que con el uso de TBE o TB.

Las demás condiciones usadas (cantidad y tipo de surfactante) fueron las que mejores resultados habían dado hasta ahora: 1%SDS en el tampón de electroforesis y en el gel para no imponer una resistencia al paso de corriente demasiado alta y 2%SDS en el tampón de carga para que el surfactante se encuentre en exceso con respecto a las NPs y se produzca la mayor interacción posible.

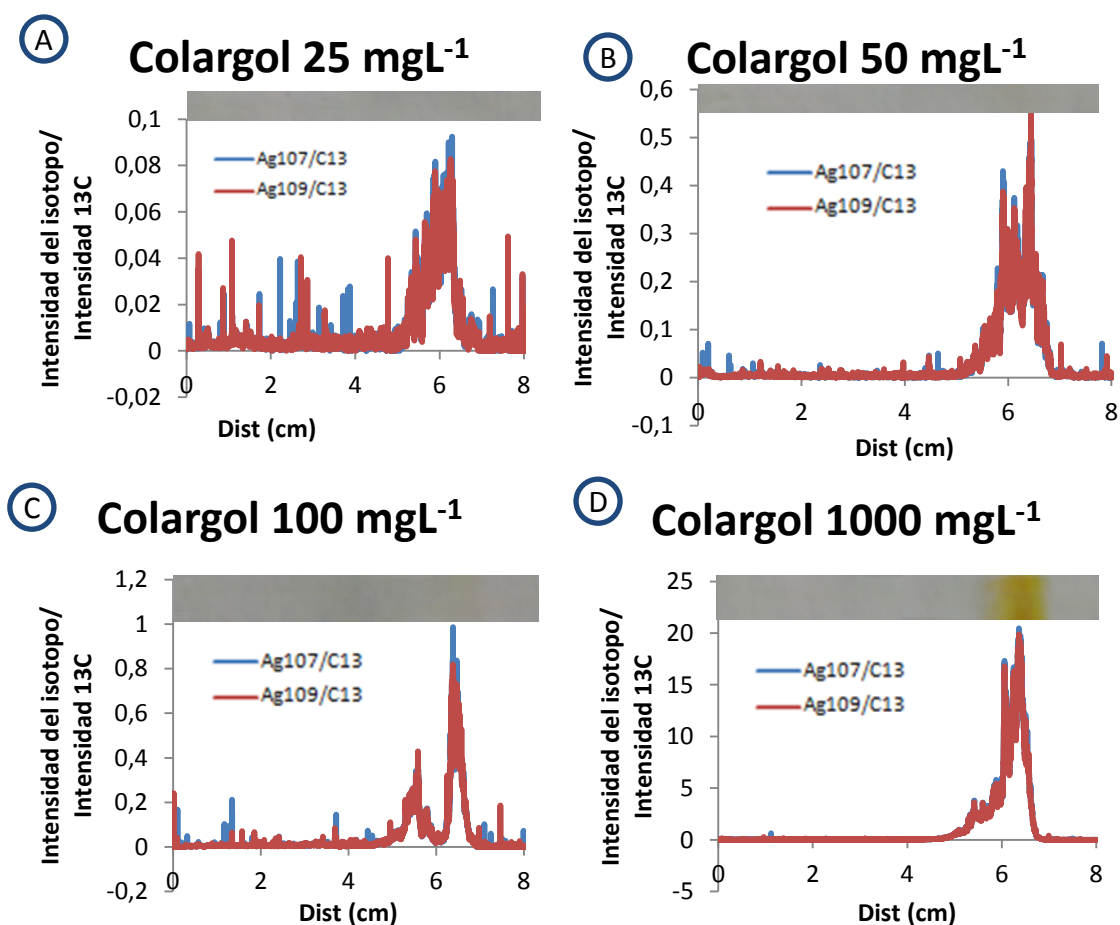
Se aplicó el procedimiento descrito en la tabla A.5.1 del Anexo A, correspondiente al método SDS-Tris-Glicina-AGE descrito en el apartado 3.3.1.4.

## Experimental

Como se puede observar en la figura B10 del Anexo B los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos previamente para los patrones de 10 y 20 nm recubiertos por citratos. Se observa un pico de señal de Ag correspondientes a las NPs al principio del gel.

Los resultados para la muestra de Colargol a diferentes concentraciones se muestran en la figura 3.4.2. Podemos observar que aparecen bandas estrechas para todas las concentraciones (25, 50, 100 y 1000 mg/L) al final de la segunda mitad del gel, posición que correspondería con su tamaño (15,4 nm)<sup>67</sup> en función del % de Agarosa utilizado en el gel.

Figura 3.4.2. Electroferogramas obtenidos mediante LA-ICP-MS tras la separación por 0,5%AGE; 1%SDS; 25 mM Tris; 192 mM Gli con 2%SDS en T.C para la muestra de Colargol. Colargol de 25 mgL<sup>-1</sup> (A), Colargol de 50 mgL<sup>-1</sup> (B), Colargol de 100 mgL<sup>-1</sup> (C) y Colargol de 1000 mgL<sup>-1</sup> (D).





## Experimental

Las AgNPs en el Colargol parecen avanzar en función de su relación tamaño-carga sin interaccionar con el gel. Esta diferencia respecto a las AgNPs patrón recubiertas de citratos se debe a que las AgNPs en la muestra de Colargol están recubiertas por una matriz proteica que está más fuertemente adsorbida sobre la superficie de la AgNP que los citratos, por lo que esta matriz proteica le confiere estabilidad y las AgNPs no floculan y avanzan en el gel. En cambio, los citratos (más débilmente adsorbidos) se pierden con facilidad durante la electroforesis, lo que hace que las NPs floculen y se queden en la primera parte del gel. Cabe destacar también el doble pico que aparece en la muestra de Colargol de  $100 \text{ mgL}^{-1}$  que sugiere que se ha podido estropear la muestra y hay diferentes poblaciones de tamaños o que interacciona de alguna manera con el gel.

Se realizaron también algunos ensayos aplicando este mismo procedimiento (procedimiento descrito en la tabla A.5.1 del Anexo A, correspondiente al método SDS-Tris-Glicina-AGE descrito en el apartado 3.3.1.4.) pero utilizando patrones de AgNPs con diferentes recubrimientos (PEG y PVP), que en estudios anteriores no se habían estudiado profundamente. Los resultados obtenidos, que como veremos más adelante no fueron reproducibles en todos los experimentos, se muestran en la figura B11 del anexo B. Aparentemente el patrón de AgNPs recubiertas con PEG (10 nm) se mueve de acuerdo a su relación tamaño-carga (avanza más que la muestra de Colargol (15,4 nm)) y se obtiene una banda estrecha. El patrón de AgNPs de 10 nm recubiertas con PVP también se observa una banda en la misma posición pero mucho menos intensa y además se observa un pico en el pocillo que podrían ser algunas AgNPs que se han agregado. Estos recubrimientos parecen ser más estables que los citratos y por ello parecen moverse adecuadamente. Por lo tanto, estos patrones serán estudiados en las siguientes electroforesis.

### 3.4.1.1.5. Utilización del TMA (ácido Tiomálico).

#### a) Influencia en el tampón de carga.

El TMA, no es un surfactante como el SDS o el SDBS, sino que se trata de un compuesto que se une a las NPs y les confiere carga negativa, lo que podemos considerar como una especie de funcionalización de la NP. El uso de TMA fue descrito anteriormente por Lopez-Lorente et al.<sup>47</sup>, que usaron TMA para funcionalizar las AuNPs y AgNPs y dotarles a estas últimas de una mayor carga negativa y permitir su

## Experimental

separación por electroforesis capilar. De esta manera, las AgNPs tenían una carga negativa mayor que las de AuNPs puesto que el TMA tiene más afinidad por las AgNPs y permitía así su separación. En nuestro caso, lo usaremos simplemente para funcionalizar nuestras AgNPs y permitir que avancen de acuerdo a su relación tamaño-carga.

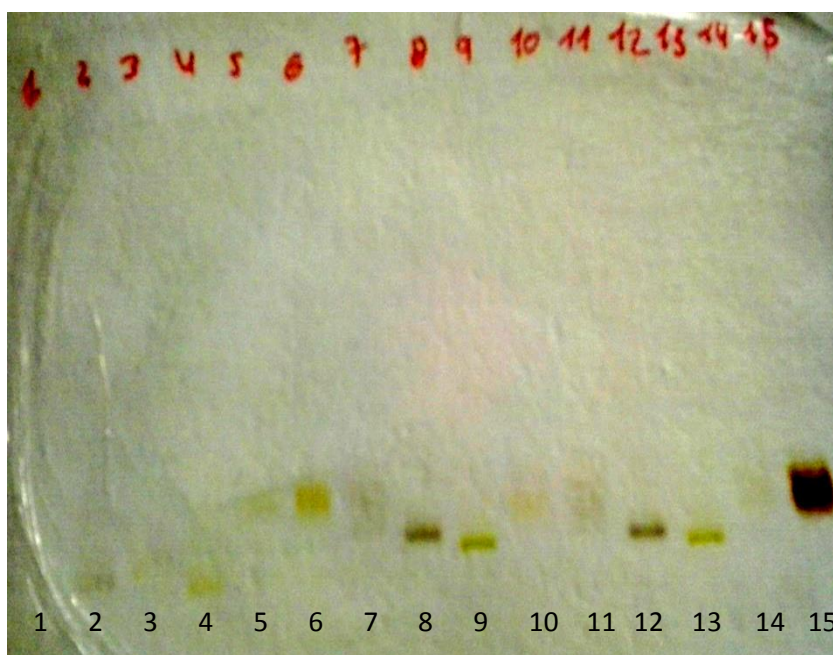
Lopez-Lorente et al.<sup>47</sup> sugieren que el TMA se intercambia con los citratos y se une a la superficie de la NP y que posteriormente el SDS rodea a estas NPs que adhieren el TMA en su superficie, formando así cadenas alcano-tiol que son más largas y por lo tanto más rápidamente estabilizadas<sup>70</sup>. La funcionalización de AuNPs recubiertas de citratos con TMA había sido ya estudiada previamente dada la alta afinidad del oro por los sulfuros<sup>29,71</sup>, teniendo en cuenta que la plata tiene una afinidad mayor que el oro por los sulfuros el resultado tiene que ser extrapolable entre ambas NPs. Por otro lado, Lopez-Lorente et al.<sup>47</sup> comprobaron que obtenían los mismos resultados (similar tiempo de retención) realizando una funcionalización con TMA de las AuNPs previa a la adición del tampón que añadiendo el TMA al tampón directamente, por lo que la adición del TMA a nuestro tampón de carga supondría la “funcionalización” directa de las AgNPs.

Para empezar se emplearon dos procedimientos distintos, uno descrito en la tabla A.6.1 en el que se añadía al T.C. 0,1%TMA con ausencia de SDS y otro descrito en la tabla A.6.2. en el que se añadía al T.C. 0,15%TMA con presencia de SDS (2%SDS). Las condiciones de ambos procedimientos son descritos en las tablas A.6.1. y A.6.2. del Anexo A, correspondiente al método SDS-TMA-Tris-Glicina-AGE descrito en el apartado 3.3.1.5.

Los resultados obtenidos mediante el procedimiento descrito en la tabla A.6.1 (0,1%TMA en tampón de carga) mostraron alguna mejora reseñable. Se pueden observar en la siguiente figura (Figura 3.4.3), que representa el gel obtenido y donde se puede realizar la detección visual.

## Experimental

Figura 3.4.3. Gel obtenido con el método SDS-TMA-Tris-Glicina-AGE.



1. *Blanco A*
2. *Patrón AgNPs 10 nm (cit) A*
3. *Patrón AgNPs 20 nm (cit) A*
4. *Patrón AgNPs 40 nm (cit) A*
5. *Col 25 mgL<sup>-1</sup> A*
6. *Col 100 mgL<sup>-1</sup> A*
7. *Patrón AgNPs 10 nm (cit) B*
8. *Patrón AgNPs 20 nm (cit) B*
9. *Patrón AgNPs 40 nm (cit) B*
10. *Col 25 mgL<sup>-1</sup> B*
11. *Patrón AgNPs 10 nm (cit) C*
12. *Patrón AgNPs 20 nm (cit) C*
13. *Patrón Ag 40 nm (cit) C*
14. *Col 25 mgL<sup>-1</sup> C*
15. *Col 1000 mgL<sup>-1</sup> C*

**T.C.:** 30% glicerol, 25 mM Tris, 0.1% TMA, pH 8.00

**A:** T.C.

**B:** T.C. + agitación (2 horas)

**C:** T.C. + sonicación 30 min

Se han llevado a cabo dos tratamientos previos de muestra además de la simple adición de tampón de carga (con TMA al 0,1%) a la disolución de NPs (A). Los dos tratamientos previos (B y C) descritos en la figura 3.4.3, tratan de la adición del tampón de carga a las AgNPs y posterior agitación de la mezcla (B) y de la adición del tampón de carga a las AgNPs y posterior sonicación de la mezcla (C).

Observando el gel, aparecen bandas para todas las AgNPs estudiadas. Las AgNPs patrón recubiertas con citratos (carriles 2-4, 7-9 y 11-13) avanzan y parecen no quedarse en el pocillo ni interaccionar con el gel, pero el orden obtenido no es el esperado en función del tamaño. Para los tres tratamientos previos de muestra que hemos probado, las AgNPs patrón recubiertas de citratos aparecen como una banda estrecha (con una pequeña cola en algunos casos) y coloreada. Lo que nos hace pensar que las AgNPs han avanzado sin interaccionar con el gel y están ahora concentradas en una pequeña banda, por lo que podemos pensar que la razón de que ahora observemos el color y con los otros procedimientos no lo observásemos (siendo los patrones de la misma concentración en todos procedimientos) sea porque antes las AgNPs estaban dispersas por el gel y ahora están concentradas en una banda estrecha. La pequeña cola que se observa hace indicar que parte de las AgNPs si interaccionan algo con el gel, pero en todo caso, a simple vista esta interacción parece muy pequeña comparada con la banda

## Experimental

estrecha de intenso color. Así mismo, se observa la ausencia de color negro en el pocillo, que es indicador de que las AgNPs se han agregado y no han entrado en el gel.

Por otro lado, estas AgNPs patrón recubiertas de citratos no avanzan en el gel de acuerdo a su tamaño ya que teóricamente las que más deberían avanzar serían las de 10 nm (carriles 2, 7 y 11), seguidas por las de 20 nm (carriles 3, 8 y 12) y las que menos avanzarían serían las de 40 nm (carriles 4, 9 y 13). Sin embargo, las de 40 nm son las que más avanzan y las de 10 nm las que menos. Lo que nos hace pensar que si las AgNPs se mueven según su relación tamaño-carga, las AgNPs de mayor tamaño han cogido mayor cantidad de TMA y por lo tanto tienen mayor carga negativa. Como ya hemos comentado anteriormente, una NP de 40 nm tiene mayor superficie que una NP de 20 nm y como se considera que una AgNP coge tantas moléculas de TMA como Ag(I) tiene en su superficie<sup>29</sup>, el patrón de 40 nm tendrá mayor cantidad de Ag(I) en su superficie y cogerá así un mayor número de moléculas de TMA que una AgNP de 20 nm. Lo cual sirve para explicar el resultado obtenido de porque las AgNPs de mayor tamaño tienen una menor relación tamaño-carga y avanzan más que las de menor tamaño. Lo cual no es útil para nosotros que queremos obtener una calibración en función de tamaños y que todos los patrones tengan la misma carga.

Además los tres patrones de AgNPs recubiertas de citratos (10, 20 y 40 nm) avanzan más que el Colargol (carriles 5, 6, 10, 14 y 15), lo que no era coherente de acuerdo a una calibración en función del tamaño sabiendo el tamaño de las AgNPs en la muestra de Colargol (15,4 nm)<sup>67</sup>. Si las AgNPs se movían de acuerdo a su relación tamaño-carga esto significa que las AgNPs patrón recubiertas con citratos han adquirido más carga negativa que las AgNPs en la muestra de Colargol. Las AgNPs en la muestra de Colargol se encuentran recubiertas de una matriz proteica que está fuertemente adsorbida sobre la superficie de la NP lo cual le permite permanecer estable y no aglomerarse, pero dificulta la unión del TMA o la sustitución de estas proteínas por el TMA, por lo que la carga superficial es menor que la de las AgNPs patrón recubiertas con citratos que pierden el recubrimiento muy fácilmente y por lo tanto los citratos son rápidamente intercambiados por el TMA.

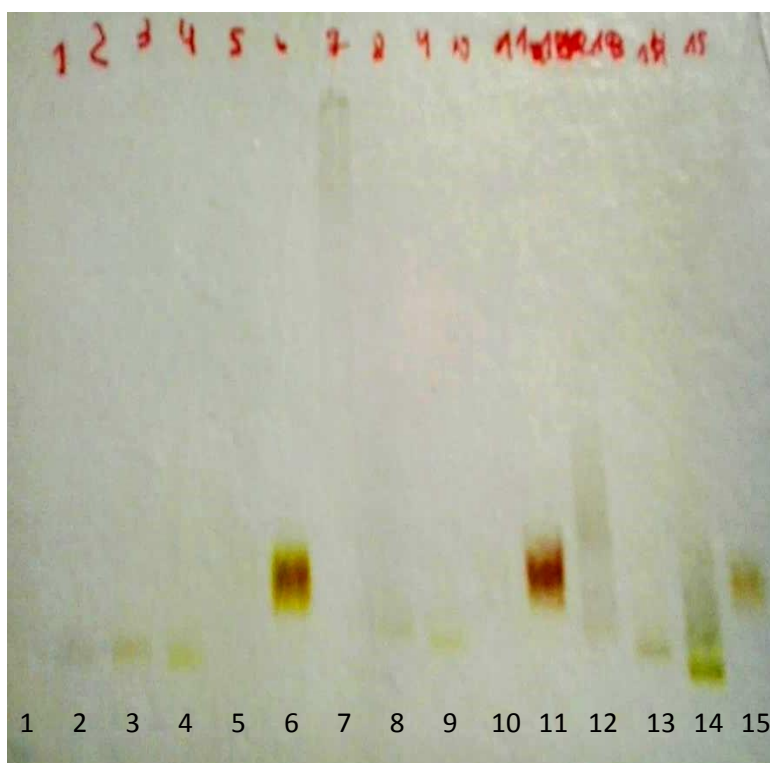
En cuanto a las diferencias en los tratamientos previos de muestra con agitación y sonicación con el tampón de carga no observamos mucha diferencia. Si que se puede

## Experimental

observar que cuando las AgNPs y el tampón de carga han sido sometidos a agitación o sonicación la banda aparece un poco más intensa.

Posteriormente, se procedió a aumentar la cantidad de TMA a 0,15% en lugar de 0,1% y se añadió 1% de SDS en el tampón de carga. Para ello se aplicó el procedimiento descrito en la tabla A.6.2. (0,15%TMA+1%SDS en tampón de carga). Los resultados obtenidos se pueden observar en la siguiente figura (Figura 3.4.4).

Figura 3.4.4. Gel obtenido con el método SDS-TMA-Tris-Glicina-AGE



1. Blanco **A**
2. Patrón AgNPs 10 nm (cit) **A**
3. Patrón AgNPs 20 nm (cit) **A**
4. Patrón AgNPs 40 nm (cit) **A**
5. Col 25 mgL<sup>-1</sup> **A**
6. Col 1000 mgL<sup>-1</sup> **A**
7. Patrón AgNPs 10 nm (cit) **B**
8. Patrón AgNPs 20 nm (cit) **B**
9. Patrón AgNPs 40 nm (cit) **B**
10. Col 25 mgL<sup>-1</sup> **B**
11. Col 1000 mgL<sup>-1</sup> **B**
12. Patrón AgNPs 10 nm (cit) **C**
13. Patrón AgNPs 20 nm (cit) **C**
14. Patrón AgNPs 40 nm (cit) **C**
15. Col 1000 mgL<sup>-1</sup> **C**

**T.C.:** 30% glicerol, 25 mM Tris, 1% SDS, 0.15% TMA, pH 8.55

**A:** T.C.

**B:** T.C. + agitación (2 horas)

**C:** centrifugación (preconcentración) + T.C.

En este caso se han llevado a cabo otros dos tratamientos previos de muestra además de la simple adición de tampón de carga a la disolución de NPs (A). Los dos tratamientos previos (B y C), se tratan de la adición del tampón de carga a las AgNPs y posterior agitación de la mezcla (B) y de la preconcentración de la disolución de NPs mediante centrifugación y posterior adición del tampón de carga a las AgNPs precipitadas por centrifugación (C).

Como se puede observar, en el gel obtenido se obtienen los mismo resultados que los obtenidos en el gel de la Figura 3.4.3. Además, se ve que los tratamientos previos de muestra no son eficaces, puesto que las AgNPs patrón recubiertas de citratos sometidas

## Experimental

a agitación (carriles 7-10) y las preconcentradas (carriles 12-14) aparecían en el gel con una cola más grande que las que estaban sin tratar (carriles 2-4). Además, en las AgNPs de 10 nm sometidas a agitación (carril 7) observamos que se han quedado en el pocillo, cabe destacar que esta disolución después de la agitación mostró un color rojizo. Este color rojizo se ha observado también en una muestra que dejamos durante media hora (aproximadamente) en presencia de TMA, lo que hace indicar que el nuevo reactivo produce transformaciones si está en contacto con la muestra durante un periodo largo de tiempo y a una concentración elevada.

En cuanto a la separación en función de tamaños, no se observó ninguna mejora, las AgNPs no se movían de acuerdo a su tamaño sino que las AgNPs de mayor tamaño (40 nm) avanzaban más.

### b) Influencia del tamaño de poro.

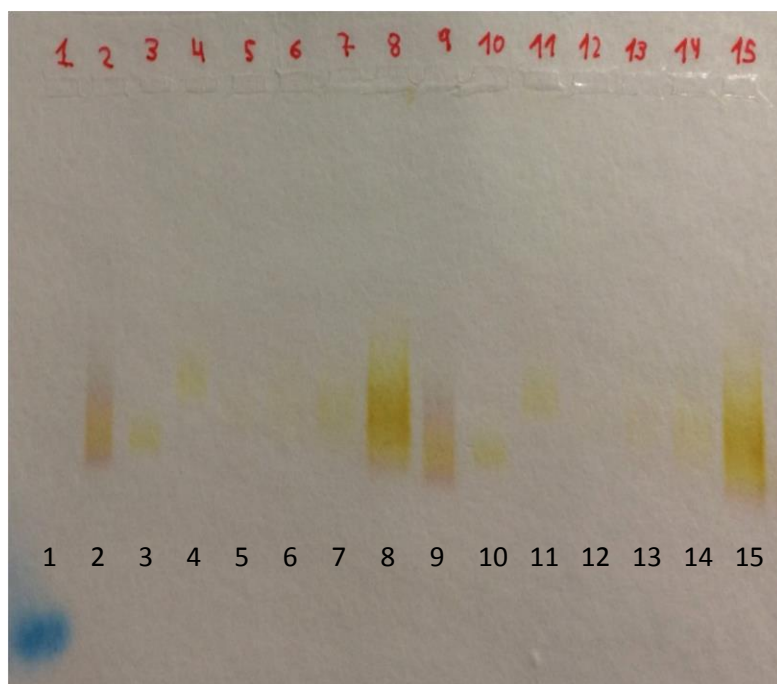
Debido a que el patrón de 20 y 40 nm utilizando TMA en el tampón de electroforesis y en el tampón de carga tienen una relación tamaño-carga menor y avanzan más que el patrón de 10 nm, probamos a disminuir el tamaño de poro con el objetivo de imponer mayor impedimento estérico para las NPs más grandes.

Para ello se aplicó los procedimientos descritos en las tablas A.6.3.-A.6.7. del Anexo A, correspondiente al método SDS-TMA-Tris-Glicina-AGE descrito en el apartado 3.3.1.5. Se varió el porcentaje de Agarosa entre 0,75 y 2%. Los geles correspondientes a los porcentajes de Agarosa (0,75%-1,75%) se muestran en las figuras B12-B15 correspondientes al anexo B donde se describe el proceso de optimización del porcentaje de agarosa y los resultados obtenidos mostraban la necesidad de aumentar el porcentaje de agarosa hasta el 2%.

En la figura 3.4.5 se observa el resultado de la electroforesis con 2% de Agarosa. Las condiciones del procedimiento se indican en la tabla A.6.7. correspondiente al anexo A.

## Experimental

Figura 3.4.5. Gel obtenido con el método SDS-TMA-Tris-Glicina-AGE (2% AGE)



1. Blanco
2. Patrón AgNPs 10 nm (cit)
3. Patrón AgNPs 20 nm (cit)
4. Patrón AgNPs 40 nm (cit)
5. Col 25 mgL<sup>-1</sup>
6. Col 50 mgL<sup>-1</sup>
7. Col 100 mgL<sup>-1</sup>
8. Col 1000 mgL<sup>-1</sup>
9. Patrón AgNPs 10 nm (cit)
10. Patrón AgNPs 20 nm (cit)
11. Patrón AgNPs 40 nm (cit)
12. Col 25 mgL<sup>-1</sup>
13. Col 50 mgL<sup>-1</sup>
14. Col 100 mgL<sup>-1</sup>
15. Col 1000 mgL<sup>-1</sup>

**T.C.:** 30% glicerol, 25 mM Tris, 1% SDS, 0.05% TMA, pH 8.40

A simple vista los resultados que obtenemos parecen mejorar los obtenidos con los otros procedimientos. La banda correspondiente al patrón de 10 nm (carriles 2 y 9) vuelve a ser muy ancha. Los RFs no siguen una relación en función de su tamaño, ya que el patrón de 10 nm (RF=0,6; carril 2) se queda por arriba del patrón de 20 nm (RF=0,64; carril 3). En cambio, si nos fijamos en la distancia máxima que recorren las AgNPs (final de la banda), las AgNPs patrón recubiertas de citratos parecen moverse ahora en función del tamaño: 5,2 cm avanza el patrón de 10 nm (carril 2); 4,9 cm avanza el patrón de 20 nm (carril 3) y 4,2 cm el patrón de 40 nm (carril 4). Además, la separación entre los patrones de distintos tamaños es mayor que para el gel de 1,75% de Agarosa (5,5 cm; 5,3 cm y 4,7 cm respectivamente). Esto también se puede observar en los carriles 9, 10 y 11, ya que se ha usado el mismo T.C., por lo tanto estos carriles deben mostrar un comportamiento idéntico a los carriles 2, 3 y 4.

Por lo que, como se comenta en la figura B15 correspondiente al anexo B con 1,75% de Agarosa en el gel, al aumentar la cantidad de Agarosa en el gel el final de la banda correspondiente a las AgNPs más pequeñas avanza más pero el ensanchamiento de la banda también es mayor, lo que dificulta la interpretación de los resultados.

Las AgNPs en la muestra de Colargol (RF=0,61; carril 8) vuelven a aparecer por encima del patrón de 20 nm (RF=0,64; carril 3), lo cual no es coherente de acuerdo con una

## Experimental

movilidad en función del tamaño. Sin embargo, al igual que el patrón de 10 nm, debido al gran ensanchamiento de la banda de Colargol el final de la banda aparece en medio de las dos bandas correspondientes a los patrones de 10 y 20 nm (carriles 2 y 3) (5,1 cm para el Colargol; 5,2 cm para el patrón de 10 nm y 4,9 cm para el patrón de 20 nm). Lo mismo sucede en la segunda mitad del gel (carriles 9-15), el RF del Colargol es menor que el del patrón de 20 nm (0,63 y 0,67 respectivamente), sin embargo el final de la banda de Colargol (carril 15; distancia 5,2 cm) aparecen entre los finales de las dos bandas correspondientes a los patrones de 10 y 20 nm (carriles 9 y 10; distancias 5,3 y 5,1 cm respectivamente).

Por otro lado, las AgNPs en la muestra de Colargol a  $1000 \text{ mgL}^{-1}$  se observa fácilmente (carriles 8 y 15), sin embargo a más baja concentración (25, 50 y  $100 \text{ mgL}^{-1}$ ) se observan con dificultad y no somos capaces de definir la anchura de la banda de forma visual. Estos resultados podrían ser estudiados mediante Densitometría para obtener una comparativa que nos aportaría más información sobre las bandas de las AgNPs en el gel. De esta forma seríamos capaces de obtener el máximo de la banda de una forma más precisa y comprobar si es posible la detección de las AgNPs en la muestra de Colargol de menor concentración que no se pueden apreciar mediante detección visual.

Por último, cabe comentar que en esta electroforesis no se probaron dos tampones de carga distintos (como se hizo en procedimientos anteriores), sino que se inyectó cada patrón/muestra por duplicado con el objetivo de estudiar la reproducibilidad del método optimizado. Para ello se prepararon muestras por duplicado de los patrones y del Colargol a distintas concentraciones. El primer carril se usó como blanco, de los catorce restantes en los siete primeros (2-8) se inyectaron las disoluciones de los patrones y el Colargol con el tampón de carga y en los siete últimos (9-15) se volvieron a inyectar otras disoluciones de los patrones y el Colargol con el tampón de carga preparadas exactamente igual que las anteriores. En cuanto a la reproducibilidad, como se puede observar en la tabla B1 correspondiente al anexo B donde se exponen los RFs y las correspondientes RSD, los carriles de la segunda mitad (9-15) las AgNPs avanzan un poco más que en los carriles de la primera mitad, pero la RSD es relativamente pequeña. En cuanto al ensanchamiento, como se puede observar visualmente en la figura 3.4.5 más o menos todas las bandas de la primera mitad presentan una anchura muy similar a su homóloga en la segunda mitad.



## Experimental

A la vista de los resultados obtenidos visualmente en esta electroforesis, donde la detección visual nos hace pensar que hemos podido encontrar un procedimiento útil para caracterizar las AgNPs en función del tamaño (sobre todo para los patrones de 20 y 40 nm), se procedió a realizar su análisis por LA-ICP-MS para obtener una mayor información que confirmase los resultados obtenidos.

Para ello, se sometieron a ablación láser y posterior análisis por ICP-MS los carriles de la electroforesis mostrada en la figura 3.4.5 siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3.2 (Método LA-ICP-MS).

En la figura B16 correspondiente al anexo B podemos ver los electroferogramas obtenidos correspondientes a los carriles de los patrones de AgNPs de 10, 20, 40 nm (carriles 2, 3 y 4 respectivamente) y Colargol (carril 8) de la electroforesis mostrada en la figura 3.4.5.

Como se puede observar en la figura B16, las señales obtenidas para las distintas AgNPs no se corresponden con el resultado esperado de acuerdo al análisis visual. Las AgNPs no solo están ampliamente distribuidas por el gel, sino que tan solo en el caso del Colargol el máximo se corresponde con la banda coloreada. Las AgNPs tanto en la disolución patrón recubiertas de citratos como en la muestra de Colargol interaccionan con el gel y se quedan distribuidas a lo largo del gel. Este comportamiento puede ser debido a que al aumentar la cantidad de agarosa en el gel quedan más residuos libres y por lo tanto es más fácil que las AgNPs interaccionen con el gel.

Los diferentes resultados obtenidos mediante detección visual y por LA-ICP-MS nos hacen pensar que puede ser que la funcionalización con TMA no haya sido completa y parte de las AgNPs se han quedado sin funcionalizar y pierden su carga o interaccionan con el gel. Habría que profundizar en este estudio ya que el experimento solo se ha realizado una vez y comprobar si se repiten los resultados obtenidos.

### **3.4.1.2. Caracterización de PC tras la incubación de AgNPs con Albúmina y Transferrina por AGE y detección por LA-ICP-MS.**

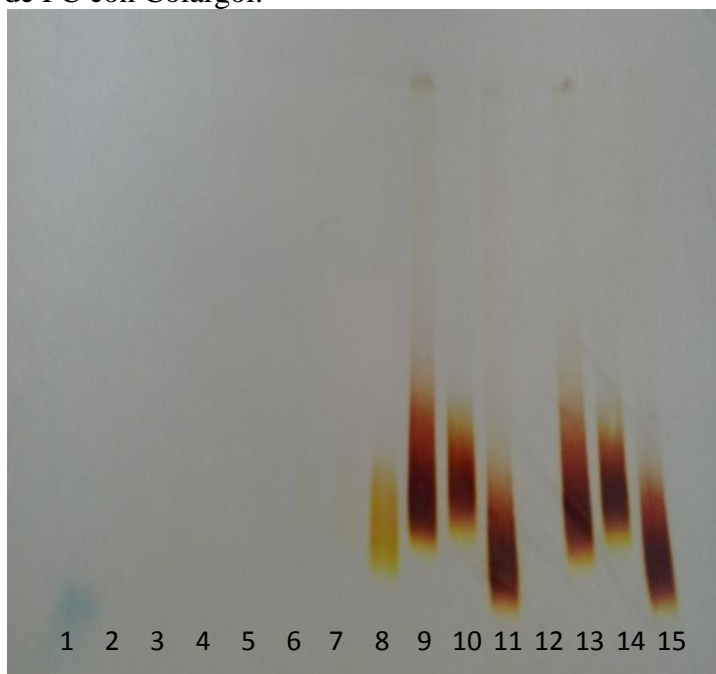
Como se comentó en la introducción, hasta ahora la caracterización de las PC mediante técnicas electroforéticas se ha descrito en la bibliografía utilizando métodos basados en PAGE. Estos métodos tienen la limitación de que tan solo permite el análisis proteómico ya que el tamaño de poro de los geles de Poliacrilamida no es lo suficiente

## Experimental

grande para dejar pasar el conjugado de NP-PC y solo las proteínas son capaces de entrar en el gel. Además en la preparación de la muestra para someterlas a SDS-PAGE se rompe el enlace del complejo NP-Proteína. Por lo tanto, el interés de introducir los geles de Agarosa para el estudio de las PC recae en la posibilidad de realizar el análisis sin romper la interacción NP-PC, de esta manera podemos realizar tanto el análisis proteómico como el análisis de la parte metálica en el mismo gel. En este caso se ha estudiado la formación de PC entre la muestra comercial de Colargol y los patrones de AgNPs (10, 20 y 40 nm) con dos proteínas (Albumina y Transferrina) mayoritarias en el suero humano. Para el estudio de la PC mediante técnicas electroforéticas se ha utilizado el método descrito en el apartado 3.3.1.4 (Método SDS-Tris-Glicina-AGE). Este método fue optimizado obteniendo la mejor eficiencia hasta ahora para la muestra de Colargol, por lo que lo usaremos para estudiar la formación de PC en las diferentes AgNPs (Colargol y patrones de AgNPs recubiertas de citratos).

Para ello, someteremos a electroforesis los precipitados obtenidos en el método de incubación descrito en el apartado 3.3.3.1. En la siguiente figura se puede observar el gel obtenido con las disoluciones de las AgNPs incubadas y sin incubas.

Figura 3.4.6. Gel obtenido con el método SDS-Tris-Glicina-AGE para la caracterización de PC con Colargol.



1. *Blanco*
2. *Patrón AgNPs 10 nm (PVP) sin incubas*
3. *Patrón AgNPs 10 nm (cit) sin incubas*
4. *Patrón AgNPs 10 nm (PEG) sin incubas*
5. *Colargol 25 mgL<sup>-1</sup> sin incubas*
6. *Colargol 50 mgL<sup>-1</sup> sin incubas*
7. *Colargol 100 mgL<sup>-1</sup> sin incubas*
8. *Colargol 1000 mgL<sup>-1</sup> sin incubas*
9. *Colargol incubado con Albúmina*
10. *Colargol incubado con Transferrina*
11. *Colargol incubado con H<sub>2</sub>O*
12. *Patrón AgNPs 10 nm (PEG) sin incubas.*
13. *Colargol incubado con Albúmina*
14. *Colargol incubado con Transferrina*
15. *Colargol incubado con H<sub>2</sub>O*

El análisis visual confirma que las NPs incubadas con las proteínas (carriles 9, 10, 13 y 14) se mueven más lentamente en el gel que las NPs sin incubas o las incubadas con

## Experimental

H<sub>2</sub>O (carriles 8, 11 y 15), lo que confirma la formación de PC. Las disoluciones de los carriles 9 y 13 (Colargol + Albúmina) avanzan más en el gel que las de los carriles 10 y 14 (Colargol + Transferrina), esto es debido a que la Transferrina (76,5 KDa) tiene un tamaño mayor que la Albúmina (67 KDa), por lo que la PC formada tendrá mayor tamaño y avanza menos en el gel. Por otra parte las bandas correspondientes a los carriles 11 y 15 (Colargol incubado con H<sub>2</sub>O) son más anchas y la intensidad del color es mayor que la banda del carril 8 (Colargol 1000 mgL<sup>-1</sup>) debido a que los precipitados fueron redissueltos en 60 µl y por lo tanto la concentración es mayor que 1000 mgL<sup>-1</sup>.

Los factores de retención (RF) se calcularon como  $\frac{\text{máximo de intensidad de la banda}}{\text{dist blanco}}$  y son mostrados en la tabla 3.4.1. En la tabla 3.4.2 se puede observar la RSD de los distintos RFs correspondientes a las muestras que se inyectaron por duplicado en la electroforesis (Col+Alb, Col+Trans y Col+ H<sub>2</sub>O).

Tabla 3.4.1. Distancias y R.F para la caracterización de PC con Colargol.

Muestra	Blanco	Col 1000 mgL <sup>-1</sup>	Col + Alb	Col + Transf	Col + H <sub>2</sub> O	Col + Alb	Col + Transf	Col + H <sub>2</sub> O
Distancias (cm)	7,70	6,30	5,90	5,60	6,40	5,80	5,60	6,50
R.F.	1	0,82	0,77	0,73	0,83	0,75	0,73	0,84

Tabla 3.4.2. RSDs y promedios de los RFs correspondientes a las muestras de Col+Alb, Col+Trans y Col+ H<sub>2</sub>O.

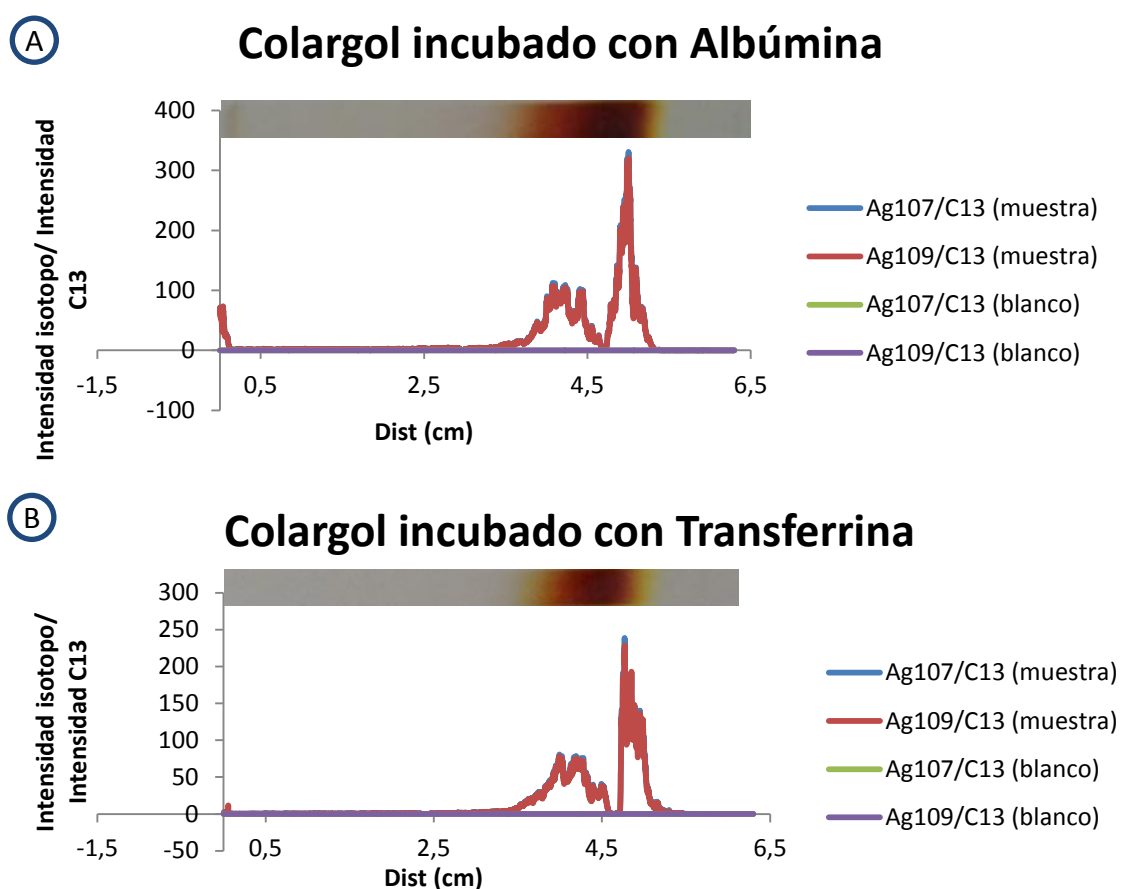
	Col + Alb	Col + Transf	Col + H <sub>2</sub> O
RSD de los RFs (%)	1,21%	0,00%	1,10%
Promedio RFs	0,76	0,73	0,84

Con los RFs obtenidos podemos confirmar la formación de la PC que ya observábamos visualmente en la electroforesis (figura 3.4.6), ya que el RF del carril correspondiente a Colargol incubado con proteína (RF=0,76 para la Albúmina y RF=0,73 para la Transferrina) es menor que el RF del carril que corresponde a Colargol incubado con agua (RF=0,84) o al del Colargol sin incubar (RF=0,82). Esto ocurre para las dos proteínas con la muestra de Colargol. Además, se confirma que se puede caracterizar la formación de la PC sin romper la interacción NP-proteína, algo que no se puede conseguir con los métodos basados en geles de poliacrilamida (PAGE).

## Experimental

Posteriormente se realizó el correspondiente análisis por LA-ICP-MS del gel obtenido en la electroforesis anterior. En las siguientes figuras (3.4.7 y 3.4.8) se muestran los electroferogramas obtenidos para las diferentes AgNPs en la muestra de Colargol tras la incubación con Albúmina y Transferrina, así como la muestra incubada con H<sub>2</sub>O y sin incubarse.

Figura 3.4.7. Electroferogramas obtenidos mediante LA-ICP-MS para la muestra de Colargol tras la incubación con proteínas. Colargol incubado con Albúmina (A) y Colargol incubado con Transferina (B).



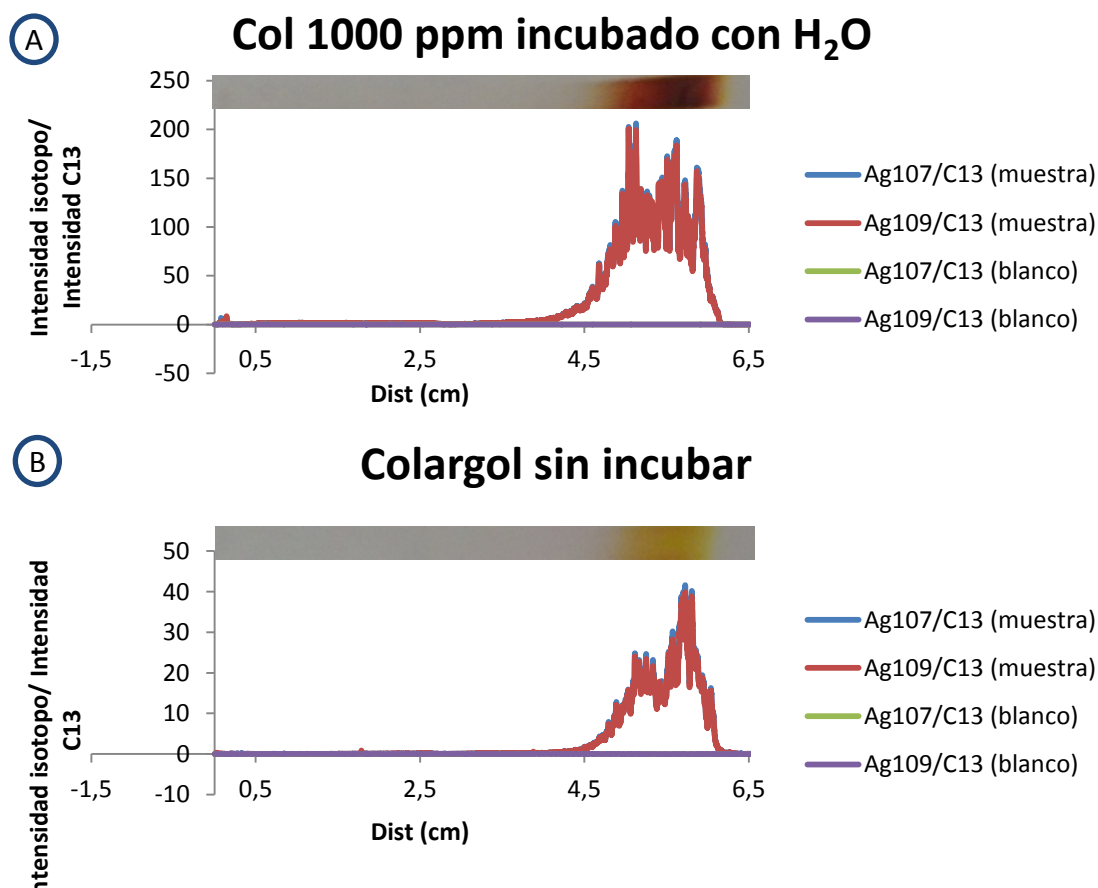
Las señales obtenidas en los electroferogramas concuerdan con los observados visualmente. Cabe destacar que ambos electroferogramas tienen una forma muy similar y que ambos presentan dos picos, lo que sugiere que no todas las NPs han adsorbido la misma cantidad de proteínas o que las han perdido durante el proceso electroforético y por lo tanto no corren igual en el gel. Matczuk et al.<sup>62</sup> analizaron la adsorción de estas dos proteínas a AuNPs usadas para un tratamiento anticancer mediante CE-ICP-MS. Entre los resultados que obtienen cabe destacar que encontraron que la cantidad de

## Experimental

Albúmina que adsorbían las AuNPs era dependiente de la cantidad de Albúmina presente en el experimento de incubación, cuando la cantidad de Albúmina presente era 10 veces la cantidad de las AuNPs incluso después de 24 horas de incubación el 5% de las AuNPs detectadas mediante CE-ICP-MS pertenecían a las AuNPs sin adsorber proteínas. Lo que podría ser una explicación del doble pico en nuestro caso puesto que la cantidad de Albúmina presente en el experimento de incubación es solo el doble que la de AgNPs. Por otro lado, en los estudios de incubación que realizaron con Transferrina aparecían también dos picos, esta vez como consecuencia de dos formas distintas de Transferrina presente en el suero humano, una forma saturada con hierro y otra sin saturar. Así, estas dos formas producen dos picos dada la diferencia en la carga, puesto que el tamaño es el mismo para las dos formas de Transferina. Estos dos hechos, son dos posibles explicaciones a la obtención del doble pico en nuestros resultados.

En la figura 3.4.8 se muestran los electroferogramas del Colargol incubado con H<sub>2</sub>O y del Colargol sin incubar.

Figura 3.4.8. Electroferogramas obtenidos mediante LA-ICP-MS para la muestra de Colargol tras la incubación con H<sub>2</sub>O (A) y Colargol sin incubar (B).



## Experimental

Los resultados concuerdan con lo observado visualmente, se obtiene una banda al final del gel de acuerdo al tamaño del Colargol. Las AgNPs de Colargol, tanto incubadas con H<sub>2</sub>O Mili-Q como sin incubar, salen en la misma posición. La disolución de Colargol incubada está más concentrada debido a que el precipitado fue disuelto tan solo en 60 µl, por lo que ha sido preconcentrado y por ello da una banda muy grande y ancha. Sin embargo, es interesante observar que cuando las AgNPs no han sido incubadas con proteínas solo aparece un pico, a diferencia de lo observado en la figura 3.4.7 y ello sugiere lo ya explicado anteriormente que no todas las AgNPs cogen la misma cantidad de proteína o la pierden en la electroforesis.

En la figura B17 correspondiente al anexo B se puede observar una gráfica donde se ha superpuesto los cuatro electroferogramas anteriores. Se puede apreciar que las AgNPs en las muestras de Colargol incubadas con proteínas avanzan menos que la que ha sido incubada con agua y la que no ha sido incubada, lo que se corrobora con los RFs calculados (Col=0,82; Col+H<sub>2</sub>O=0,84; Alb+Col=0,76 Trans+Col=0,73) y esto confirma la formación de PC.

Los resultados obtenidos hasta ahora sobre la caracterización de las AgNPs por AGE y posterior detección por LA-ICP-MS han mostrado que el Colargol (que como se ha comentado anteriormente tiene en su estructura una matriz proteica que le confiere alta estabilidad) avanza de acuerdo a su relación tamaño-carga. Sin embargo, no ha sido posible conseguir que los patrones de AgNPs avancen en función de su relación tamaño-carga porque o bien interaccionan con el gel, o bien pierden su carga al someterlos a la electroforesis. Para confirmar estos resultados obtenidos previamente, se llevó a cabo también una incubación de los patrones de AgNPs recubiertas con citratos con las mismas proteínas (Albúmina y Transferrina). Los precipitados obtenidos correspondientes a las distintas PC formadas entre los patrones de AgNPs y las dos proteínas mencionadas anteriormente se sometieron a la electroforesis descrita de acuerdo al método 3.3.3.1. El gel obtenido se muestra en Figura 3.4.9.

## Experimental

**Figura 3.4.9.** Gel obtenido con el método SDS-Tris-Glicina-AGE para la caracterización de PC con los patrones de AgNPs



1. Blanco
2. Colargol incubado con Albúmina
3. Colargol incubado con Transferrina
4. Colargol incubado con H<sub>2</sub>O
5. Colargol sin incubar
6. Patrón Ag NPs 10 nm (cit) incubado con Albúmina
7. Patrón Ag NPs 20 nm incubado con Albúmina
8. Patrón Ag NPs 40 nm incubado con Albúmina
9. Patrón Ag NPs 10 nm (cit) incubado con Transferrina
10. Patrón Ag NPs 20 nm incubado con Transferrina
11. Patrón Ag NPs 40 nm incubado con Transferrina
12. Patrón Ag NPs 10 nm (PEG) incubado con Albúmina
13. Patrón Ag NPs 10 nm (PVP) incubado con Albúmina
14. Colargol incubado con Albúmina
15. Colargol incubado con Transferrina

Como se puede observar visualmente en el gel, si que se observa en esta ocasión movimiento de las distintas AgNPs patrón recubiertas con citratos (10, 20 y 40 nm) incubados con las dos proteínas (carriles 6-11), como consecuencia de la formación de la PC. Los RFs fueron medidos y mostrados en las tablas 3.4.3 y 3.4.4.

**Tabla 3.4.3.** Distancias y RFs de las AgNPs patrón recubiertas con citratos y las AgNPs en la muestra de Colargol) incubadas con Albúmina y RSD de las muestras Col+Alb.

Muestra	Blanco	Ag 10 nm (cit) + Alb	Ag 20 nm (cit) + Alb	Ag 40 nm (cit) + Alb	Col + Alb	Col + Alb2	Promedio Col + Alb	RSD Col+Alb
Distancias (cm)	8,20	6,30	6,45	6,20	6,20	6,30	6,25	1,13%
R.F.	1,00	0,77	0,79	0,76	0,76	0,77	0,76	1,13%



## Experimental

Tabla 3.4.4. Distancias y RFs de las AgNPs patrón recubiertas con citratos y las AgNPs en la muestra de Colargol incubadas con Transferrina y RSD de las muestras Col+Trans.

Muestra	Blanco	Ag 10 nm (cit) + transf	Ag 20 nm (cit) + transf	Ag 40 nm (cit) + transf	Col + transf	Col + transf2	Promedio Col + Trans	RSD Col+Trans
Distancias (cm)	8,20	5,90	6,10	5,80	5,80	6,00	5,90	2,40%
R.F.	1,00	0,72	0,74	0,71	0,71	0,73	0,72	2,40%

Si consideramos que las AgNPs en la muestra de Colargol y en los patrones de distinto tamaño cogen la misma o similar cantidad de proteína y las AgNPs se mueven en función de su tamaño-carga, las AgNPs de menor tamaño avanzarán más que las AgNPs de mayor tamaño. Por lo tanto, la banda correspondiente al patrón de 10 nm (carril 6) debería avanzar más que la bandas correspondientes a los patrones de 20 y 40 nm (carriles 7 y 8 respectivamente). Sin embargo, esto no ocurre ya que el patrón de 10 nm (RF=0,77) avanza menos (RF menor) que el patrón de 20 nm (RF=0,79), lo cual no es coherente con su relación tamaño-carga supuesta (misma carga o similar y menor tamaño para el complejo AgNP-Proteína para las AgNPs de 10 nm que para las de 20 nm). Además, la banda correspondiente a la muestra de Colargol (tamaño de 15.4 nm<sup>67</sup>) incubada con Albúmina (carriles 2 y 14) debe avanzar más que las bandas correspondientes a los patrones de AgNPs de 20 y 40 nm incubados con Albúmina (carriles 7-8) y menos que la banda correspondiente al patrón de 10 nm (carril 6). Esto tampoco ocurre puesto que el RF para la muestra de Colargol incubado con Albúmina es menor que el RF correspondiente a la muestra del patrón de 20 nm incubado con Albúmina (RFs: 0,76 y 0,79 respectivamente).

El mismo comportamiento se puede observar en las AgNPs incubadas con Transferrina, como se puede observar en los carriles 3, 9-11 y 15 de la Figura 3.4.9 y en los RFs obtenidos mostrados en la tabla 3.4.4. Las AgNPs de 10 nm incubadas con Transferrina (carril 9; RF=0,72) se quedan por encima de las AgNPs de 20 nm incubadas con Transferrina (carril 10; RF=0,74) y a su vez, ambas AgNPs se quedan por debajo de las AgNPs en la muestra de Colargol (carril 3; RF=0,71 o carril 15; RF=0,73), lo cual no es coherente con la teoría ya que las AgNPs de menor tamaño deberían quedarse por



## Experimental

encima de las de mayor tamaño y el Colargol debería quedarse en medio de los patrones de 10 y 20 nm.

Estos resultados ya se habían observado en la separación de los patrones de AgNPs al aplicar el método con TMA (Método SDS-TMA-Tris-Glicina-AGE), donde se observaba que los patrones no avanzan en función a su relación tamaño-carga.

Las AgNPs en los patrones incubadas con Albúmina se mueven más que las AgNPs incubadas con Transferrina, lo que era de esperar, puesto que el peso molecular de la Albúmina es menor que el de la Transferina.

Nuevamente el patrón de 10 nm posee una banda ancha que presenta diferentes colores, lo que se puede deber a la presencia de distintas formas en la disolución patrón de NPs<sup>21</sup>, como ya se había observado en la figura B13 correspondiente al anexo B.

Aunque no todas las AgNPs se muevan en función de la relación tamaño-carga esperada (movimiento en función de tamaños), se puede confirmar la formación de PC, ya que sin incubación las AgNPs de los distintos patrones no se desplazaban aplicando el mismo método electroforético, como hemos comentado a lo largo del apartado 3.4.1.

Para confirmar estas conclusiones obtenidas visualmente se procedió al estudio por LA-ICP-MS de los carriles del gel mostrados en la Figura 3.4.9.

Se empezó analizando los patrones de distintos tamaños de AgNPs (10, 20 y 40 nm) incubados con proteínas. Los electroferogramas obtenidos se muestran en las figuras B18-B20 correspondiente al anexo B. Como se puede observar en las figuras expuestas, los resultados para las PC formadas con los distintos patrones son bastante dispares. Los electroferogramas muestran que las AgNPs aparecen en una banda única algunas veces y varias bandas en otros casos.

Este comportamiento se observó en la figura B18 donde en el patrón 10 nm incubado con Albúmina aparecía una única banda y con Transferina aparecían dos bandas. Esta irregularidad puede ser debida a que algunas AgNPs pierden parte de las proteínas adsorbidas. Esta pérdida de proteínas puede ser debida al proceso electroforético en si o a la propia incubación como hemos comentado anteriormente en los resultados de la incubación de la muestra de Colargol con las dos proteínas.

## Experimental

Para el patrón de AgNPs de 20 nm (B19) ocurre al revés, se obtiene una banda intensa correspondiente a la PC formada con Transferrina pero con Albúmina se obtienen también varias bandas. Para el patrón de AgNPs de 40 nm se obtienen varias bandas para ambas proteínas (figura B20).

Los resultados obtenidos para las muestras de Colargol incubadas con Albúmina y Transferrina mediante detección con LA-ICP-MS tras la electroforesis correspondientes al gel de la Figura 3.4.9 se muestran en la figura B21 del anexo B y fueron muy similares a los obtenidos en las figuras 3.4.7 y 3.4.8, donde se observan dobles bandas correspondientes a NPs y PC. La conclusión a la que se puede llegar es que en el proceso de formación de PC, o bien durante el método de incubación y separación de precipitados, no todas las NPs forman PC<sup>62</sup>, o bien las PC se rompen durante el proceso electroforético. Habría que profundizar mejor en el estudio de estas conclusiones.

### **3.4.2. Determinación de Ag(I) liberada en la incubación de AgNPs con proteínas por ICP-MS.**

Como ya hemos comentado anteriormente, la disolución de las AgNPs es un tema de vital importancia para determinar su toxicidad, por ello se han descrito diferentes métodos para determinar la cantidad de Ag(I) liberada por las AgNPs<sup>72-77</sup>. Entre ellos, la ultrafiltración, que consiste en una membrana porosa de tamaño de unos pocos KDa y el uso de una fuerza centrífuga para forzar el paso de analitos a través de la membrana, ha sido ampliamente usada<sup>72,73,78</sup>. En nuestro caso, nos hemos centrado en estudiar la cantidad de Ag(I) liberada en presencia de proteínas. Esto es interesante debido a que las proteínas influyen en la capacidad de oxidación de las NPs. La presencia de proteínas que pueden formar complejos con la Ag(I) desplaza el equilibrio de oxidación hacia la derecha favoreciendo la liberación de Ag(I)<sup>79,80</sup>. Pero las proteínas también se pueden adsorber sobre las NPs disminuyendo la superficie disponible y bloqueando los sitios de unión de moléculas que catalizan el proceso de oxidación como O<sub>2</sub> y H<sup>+</sup><sup>81,82</sup>.

En este trabajo se ha realizado la determinación de Ag(I) liberada tras la incubación de la muestra comercial Colargol con las 2 proteínas puras (Albúmina y Colargol) de acuerdo al método descrito en el apartado 3.3.3.1. Se procedió a la determinación de Ag(I) en los sobrenadantes obtenidos según método descrito en el apartado 3.3.3.2. Los

## Experimental

resultados obtenidos se muestran a continuación. Se realizó la determinación de Ag utilizando calibración ponderada con y sin patrón interno (P.I.).

Las rectas de calibrado obtenidas con calibración ponderada sin y con patrón interno se muestra en la tabla 3.4.5. Como patrón interno se usó  $^{49}\text{In}$  (25  $\text{mgL}^{-1}$ ).

Tabla 3.4.5. Pendiente, ordenada en el origen, sus respectivas desviaciones estándar (SD) y coeficiente de correlación.

Isotopo	Pendiente (sin P.I.)	SD Pendiente (sin P.I.)	Ordenada origen (sin P.I.)	SD ordenada origen (sin P.I.)	Coefficiente Correlación (sin P.I.)
<b>Ag107</b>	8210	160,8	-1736	329,2	0,9992
<b>Ag109</b>	7928	161,1	-1557	329,8	0,9999
Isotopo	Pendiente (con P.I.)	SD pendiente (con P.I.)	Ordenada origen (con P.I.)	SD ordenada origen (con P.I.)	Coefficiente Correlación (con P.I.)
<b>Ag107</b>	0,1555	0,0040	0,0479	0,0083	0,9992
<b>Ag109</b>	0,1503	0,0040	0,0496	0,0081	0,9999

Se observa que los coeficientes de correlación son buenos tanto con P.I. como sin P.I..

Las RSD de la pendiente y la ordenada en el origen se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 3.4.6. RSDs de la pendiente y de la ordenada en el origen.

Isotopo	RSD Pendiente (sin P.I.)	RSD Pendiente (con P.I.)	RSD ordenada en el origen (sin P.I.)	RSD ordenada en el origen (con P.I.)
<b>Ag107</b>	1,96%	2,57%	18,96%	17,33%
<b>Ag109</b>	2,03%	2,66%	21,18%	16,33%

Los límites de detección y cuantificación son obtenidos a partir de los valores de desviación estándar (SD o  $\sigma$ ) de 10 medidas del blanco son,  $\frac{3\sigma}{k}$  y  $\frac{10\sigma}{k}$  respectivamente.

Cabe destacar que se han tenido en cuenta los factores de dilución para calcular ambos límites (límite detección y límite de cuantificación).

## Experimental

Tabla 3.4.7. Límites de detección y cuantificación.

Isotopo	LD ( $\mu\text{gL}^{-1}$ )	LC ( $\mu\text{gL}^{-1}$ )
<b>Ag107</b>	0,8135	2,712
<b>Ag109</b>	0,9188	3,063

En las tabla C1 correspondiente al anexo C, se muestran las concentraciones de Ag(I) liberada tras la incubación de la muestra de Colargol con Albúmina y Transferrina que se observaron en los distintos sobrenadantes. Se realizaron tres incubaciones distintas para cada una de las proteínas con el Colargol y un ensayo en blanco para el Colargol sin incubar.

En la tabla 3.4.8 observamos el promedio, la desviación estándar y desviación estándar relativa de la cantidad de Ag(I) liberada para las tres réplicas de las muestras de Colargol con proteínas.

Tabla 3.4.8. Promedio, desviación estándar y desviación estándar relativa de la cantidad de Ag(I) liberada en las muestras de Colargol con proteínas.

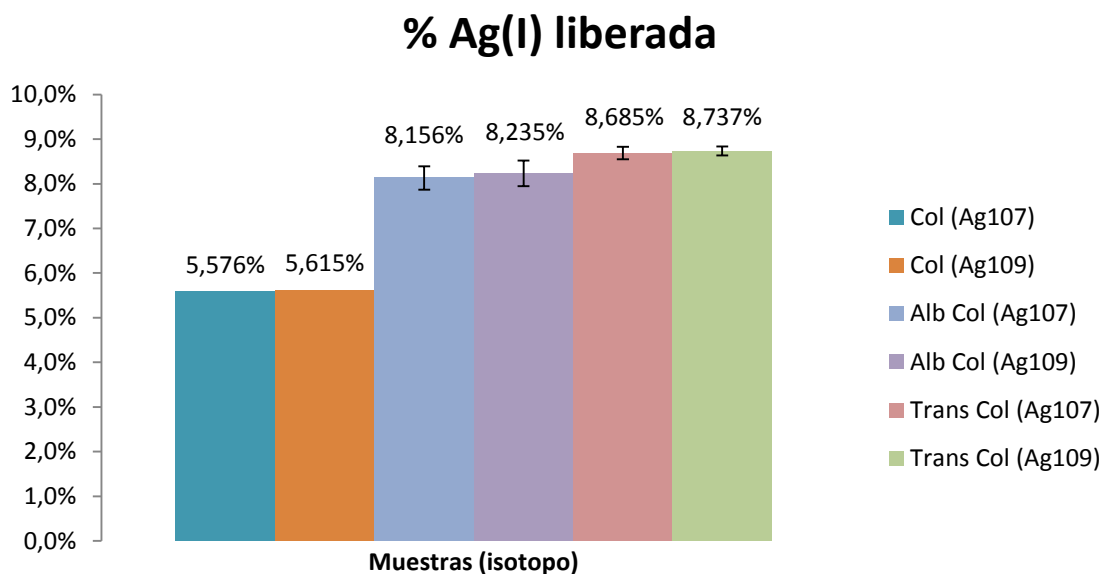
Muestra	Promedio (%)	SD (%)	RSD (%)	Valor (%)
<b>Alb Col</b>	8,196	0,261	0,200	$8,196 \pm 0,261$
<b>Trans Col</b>	8,711	0,120	0,0922	$8,711 \pm 0,12$

Teniendo en cuenta las tres réplicas realizadas para las distintas incubaciones del Colargol con Albúmina y Transferrina, la cantidad de Ag liberada en las incubaciones con Albúmina fue de  $8,196\% \pm 0,2607$ . La cantidad de Ag liberada en las incubaciones con Transferrina fue de  $8,711\% \pm 0,12\%$

En la siguiente figura se muestra la cantidad de Ag(I) liberada tanto para el Colargol sin incubar como para el Colargol incubado. Se han omitido las disoluciones de proteínas sin NPs puesto que no se espera Ag en la disolución, como se confirma en los resultados obtenidos en la tabla C1 correspondiente al anexo C con valores en torno al 0,004% de Ag(I) liberada en la disolución de proteínas, probablemente debido a algún tipo de contaminación.

## Experimental

Figura 3.4.10. Cantidad de Ag liberada en %.



El Colargol no presenta barras de error ya que tan solo se midió una réplica. Por su parte para el Colargol incubado con Albúmina y Transferrina se realizaron tres replicas distintas.

Los resultados de los sobrenadantes demostraron una mayor liberación de Ag en las muestras de Colargol incubada con proteínas que en la muestra sola. Siriwardana et al.<sup>83</sup> analizaron la interacción de AgNPs con proteínas que contenían residuos de cisteína oxidados y reducidos (Albúmina contiene 34 residuos de cisteína oxidados), los datos experimentales demostraron que las AgNPs en presencia de Albúmina liberaban más Ag(I) debido al desplazamiento del equilibrio por el principio de Chatelier. Un resultado parecido fue obtenido por Gondikas et al.<sup>84</sup>, que midieron la cantidad de Ag liberada por AgNPs recubiertas de citratos y PVP en presencia de cisteína, observando que la presencia de cisteína aumentaba la disolución de las AgNPs. Ellos mismos determinaron una cantidad de Ag(I) liberada de 3,7% ( $\pm 0,8$ ) a las 2 horas y de 6,8% ( $\pm 0,8$ ) a las 24 horas para las AgNPs recubiertas de citratos (8  $\mu\text{M}$  y 19,1 nm de tamaño) sometidas a incubación con 400  $\mu\text{M}$  de proteína. Para las AgNPs recubiertas de PVP (7,6  $\mu\text{M}$  y 7,6 nm de tamaño) con una incubación con 400  $\mu\text{M}$  de proteína la cantidad de Ag(I) determinada fue de 7,2% ( $\pm 0,7$ ) a las 2 horas y de 7,9% ( $\pm 0,3$ ) a las 24 horas. El pH varió entre 7,5 y 8,1 en ambos experimentos.

Que nosotros conozcamos, solo hemos encontrado un artículo en la bibliografía<sup>62</sup> acerca de la especiación de las AgNPs en presencia de Transferrina, por lo que aquí

## Experimental

presentamos un estudio novedoso. Además es interesante ya que la incubación con Transferrina conllevó una mayor liberación de Ag que la incubación con la Albúmina. Lo que sugiere una mayor afinidad de la Transferrina por los  $\text{Ag}^+$ , lo que repercute en la toxicidad de las AgNPs como se ha comentado anteriormente.

Sin embargo, el resultado del Colargol sin incubar con proteínas no es del todo satisfactorio. Jimenez-Lamana et al.<sup>85</sup> determinaron la cantidad de Ag(I) que liberan las AgNPs en una muestra de Colargol mediante ultrafiltración e ICP-MS. Como se puede observar en la Figura 3.4.10, la cantidad que obtenemos nosotros (5,596%) solo mediante centrifugación es bastante superior a la obtenida por Jimenez-Lamana et al. (0,542%  $\pm$  0,002%) utilizando ultrafiltración, esto sugiere que no todas las AgNPs han sido extraídas mediante la centrifugación y por ello la cantidad de Ag determinada en el ICP-MS puede no corresponder solamente a la Ag(I), como han señalado otros autores<sup>86</sup>, sino que esa señal también corresponde a AgNPs que no se han separado eficazmente en la centrifugación.

Lo que si se puede confirmar es que la presencia de proteínas favorece una mayor liberación de Ag(I) a partir de las NPs. Resulta también interesante conocer que concentración de la Ag total en disolución que puede estar en los sobrenadantes está como Ag(I) libre o formando complejos con las proteínas o en forma de AgNPs no separadas eficazmente, está como Ag(I) libre.

Para determinar la concentración de Ag(I) libre en disolución se realizó la incubación de las AgNPs con las proteínas para someterlas a ultrafiltración siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3.3.2. Los ultrafiltrados se diluyen para acondicionarlos a las condiciones de medida, estas diluciones se puede ver en la tabla A.10 correspondiente al anexo A. El problema que se observó es que en las muestras que contenían Coalrgol+Proteínas se obtenía un pequeño precipitado en la fracción correspondiente al ultrafiltrado, por lo que sospechamos que la membrana de ultrafiltración se había roto y parte de las NPs pasaban a disolución. Por lo tanto, un estudio más profundo sobre el ensayo de ultrafiltración debe llevarse a cabo con el fin de poder discriminar la Ag (I) libre en disolución de las otras especies derivadas de la incubación de las AgNPs con las proteínas (AgNPs, Ag(I) unida a proteínas y AgNPs unidas a proteínas).

# Conclusiones

## 4. CONCLUSIONES

Las conclusiones de la presente memoria, que se ha centrado en el desarrollo y optimización de métodos basados en el uso de electroforesis en gel de Agarosa e ICP-MS y LA-ICP-MS como técnicas de detección, para la caracterización por un lado de AgNPs, y por otro lado de proteínas corona formadas entre AgNPs y dos proteínas mayoritarias en el suero humano (Albúmina y Transferrina) (y especies derivadas) se exponen a continuación:

1. Del estudio de la optimización de la caracterización de AgNPs por AGE y detección por LA-ICP-MS, se puede concluir que:

- Se han optimizado los distintos parámetros relativos a la separación electroforética como son el gel, el tampón de electroforesis, el tampón de carga, el tamaño de poro del gel (relacionado con el % de agarosa utilizado), el voltaje de electroforesis, el uso de agentes pasivantes del gel (PEG, SDS y SDBS), de surfactantes (SDS y SDBS) y estabilizadores de las AgNPs (TMA).
- Se ha demostrado que el tampón compuesto por Tris-Glicina conteniendo 1% de SDS (pH=8,3) como tampón de electroforesis, 0,3% agarosa, 25 mM Tris, 192 mM Glicina y 1% SDS como gel de electroforesis, 30% glicerol, 25 mM Tris y 2% SDS como tampón de carga aplicando un voltaje de 150 V proporcionaba una buena separación para la muestra comercial de Colargol. Esta muestra contiene en su composición un 30% de matriz proteica que le confiere alta estabilidad y bajo las condiciones descritas avanza adecuadamente en el gel.
- En las condiciones electroforéticas anteriores no fue posible separar adecuadamente los patrones de AgNPs (10, 20 y 40 nm) disponibles (recubiertos con citratos) en función de su tamaño, debido a que o bien interaccionan con el gel o bien pierden su recubrimiento o carga durante el proceso electroforético. Por ello se optimizó la concentración y uso de SDS y SDBS como surfactantes sin conseguir resultados satisfactorios. Por otra parte, el uso de TMA en combinación con 1% de SDS como surfactante y un mayor porcentaje de agarosa en el gel (2%), si que permitió observar visualmente el avance de los distintos patrones de AgNPs en el gel, aunque debido a la distinta carga negativa aportada por el TMA según el tamaño de los patrones, no fue posible una

## Conclusiones

separación en función de los tamaños de los mismo. Además el posterior análisis por LA-ICP-MS demostró que había AgNPs distribuidas a lo largo del gel sin quedarse en una posición definida, sobre todo para el patrón de 10 nm que visualmente presentaba una banda ancha con diferentes colores que podría ser atribuida a diferentes formas presentes en el patrón. Por lo tanto, se debería profundizar más en el estudio del uso de TMA en relación al cálculo de potencial Z para los distintos patrones y en la influencia de usar mayores porcentajes de agarosa que pueden llevar a una mayor interacción con el gel.

2. Del estudio de la caracterización de PC formadas a partir de AgNPs, tanto patrones como la muestra de Colargol, y dos proteínas mediante AGE y detección por LA-ICP-MS, se puede concluir que el método desarrollado permitió llevar a cabo la caracterización de las PC sin romper la interacción NP-Proteína (a diferencia de otros métodos electroforéticos más habitualmente utilizados como SDS-PAGE) y además esta PC avanzaban en el gel de acuerdo a su tamaño.
  - El uso de Tris-Glicina conteniendo 1% de SDS (pH=8,3) como tampón de electroforesis, 0,3% agarosa, 25 mM Tris, 192 mM Glicina y 1% SDS como gel de electroforesis, 30% glicerol, 25 mM Tris y 2% SDS como tampón de carga aplicando un voltaje de 150 V, permitió caracterizar los complejos formados por Colargol-Albúmina ( $RF = 0,76 \pm 1,21\%$ ) y Colargol-Transferrina ( $RF = 0,73 \pm 0,00\%$ ) frente a Colargol ( $RF = 0,84 \pm 1,10\%$ ). Se confirma la formación de ambas PCs ya que los complejos avanzan menos en el gel (se obtiene mayor RF) con respecto a las NPs sin incubar. Además el complejo Colargol-Transferrina tiene un mayor tamaño que el complejo Colargol-Albúmina (de acuerdo a sus RFs) debido a que la Transferrina (76,5 KDa) tiene un mayor tamaño que la Albúmina (67 KDa).
  - La formación de PC entre los patrones de AgNPs de distintos tamaños con ambas proteínas, también permitió visualizar el avance de los patrones en el gel ya que las proteínas les conferían mayor estabilidad. Para un único patrón se confirmó la formación de PC con ambas proteínas de acuerdo a los RFs calculados (Patrón de 10 nm-Albúmina,  $RF=0,72$ ; Patrón de 10 nm-Transferrina,  $RF=0,67$ ). Sin embargo si se comparan los complejos de los distintos patrones (10, 20 y 40 nm) con una misma proteína, siguen sin avanzar en función de su



## Conclusiones

tamaño. Por ejemplo, el complejo patrón 10nm-Transferrina (RF= 0,67) avanza menos que el complejo patrón 20 nm-Transferrina (RF= 0,70).

3. Del estudio de la determinación de Ag (I) liberada en la incubación de la muestra de Colargol con ambas proteínas por ICP-MS se concluye que la presencia de las dos proteínas estudiadas favorece la oxidación de Ag (0) a Ag (I) ya que tras la determinación de Ag (I) en los sobrenadantes obtenidos tras la incubación de las AgNPs con las proteínas y posterior separación por centrifugación de las PC obtenidas se observa un mayor porcentaje de Ag (I) liberada en presencia de proteínas que en ausencia de las mismas ( $8,196 \pm 0,261\%$  con Albúmina,  $8,711 \pm 0,12\%$  con Transferrina y  $5,576\%$  para el Colargol sin incubar).

## Bibliografía

## Bibliografía

1. Segunda revisión de la normativa sobre nanomateriales. Comunicación al parlamento europeo, al consejo y al comité económico y social europeo. *COM*. Bruselas. 2012:572.
2. Meen T, Prior SD, Ji L, Hsiao Y. Nanotechnology for electrooptical and photovoltaic devices. *International Journal of Photoenergy*. 2013:292485.
3. Mihranyan A, Ferraz N, Stromme M. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. *Progress in Materials Science*. 2012;57(5):875-910.
4. Shtykov SN, Rusanova TY. Nanomaterials and nanotechnologies in chemical and biochemical sensors: Capabilities and applications. *Russian Journal of General Chemistry*. 2008;78(12):2521-2531.
5. Wu JiMin, Li ZiJian. Applications of nanotechnology in biomedicine. *Chinese Science Bulletin*. 2013;58(35):4515-4518.
6. Handford CE, Dean M, Spence M, Henchion M, Elliott CT, Campbell K. Awareness and attitudes towards the emerging use of nanotechnology in the agri-food sector. *Food Control*. 2015;57:24-34.
7. Sadik W. Environmental nanotechnology. *Journal of Environmental Monitoring*. 2011;13(5):1131-1131.
8. Handy RD, Owen R, Valsami-Jones E. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: Current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology*. 2008;17(5):315-325.
9. Tinkle SS. Nanotechnology: Collaborative opportunities for ecotoxicology and environmental health. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2008;27(9):1823-1824.
10. Bondarenko O, Ivask A, Kaekinen A, et al. Biological effects of nanoparticles of silver, gold, TiO<sub>2</sub> and nanoporous silica to selected invertebrate species and bacteria: FP7 project NanoValid. *Toxicol Lett*. 2013;221:S100-S100.
11. Griffitt RJ, Luo J, Gao J, Bonzongo J, Barber DS. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2008;27(9):1972-1978.
12. Kennedy AJ, Hull MS, Bednar AJ, et al. Fractionating nanosilver: Importance for determining toxicity to aquatic test organisms. *Environ Sci Technol*. 2010;44(24):9571-9577.

## Bibliografia

13. Zhao C, Wang W. Importance of surface coatings and soluble silver in silver nanoparticles toxicity to daphnia magna. *Nanotoxicology*. 2012;6(4):361-370.
14. Garcia-Reyero N, Kennedy AJ, Escalon BL, et al. Differential effects and potential adverse outcomes of ionic silver and silver nanoparticles in vivo and in vitro. *Environ Sci Technol*. 2014;48(8):4546-4555.
15. Fedotov PS, Vanifatova NG, Shkinev VM, Spivakov BY. Fractionation and characterization of nano- and microparticles in liquid media. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011;400(6):1787-1804.
16. Lapresta-Fernandez A, Salinas-Castillo A, de la Llana SA, et al. A general perspective of the characterization and quantification of nanoparticles: Imaging, spectroscopic, and separation techniques. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*. 2014;39(6):423-458.
17. Liu J, Yu S, Yin Y, Chao J. Methods for separation, identification, characterization and quantification of silver nanoparticles. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. 2012;33:95-106.
18. Lopez-Serrano A, Munoz Olivas R, Sanz Landaluze J, Camara C. Nanoparticles: A global vision. characterization, separation, and quantification methods. potential environmental and health impact. *Anal Methods*. 2014;6(1):38-56.
19. Lopez-Lorente AI, Simonet BM, Valcarcel M. Electrophoretic methods for the analysis of nanoparticles. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. 2011;30(1):58-71.
20. Surugau N, Urban PL. Electrophoretic methods for separation of nanoparticles. *Journal of Separation Science*. 2009;32(11):1889-1906.
21. Hanauer M, Pierrat S, Zins I, Lotz A, Sonnichsen C. Separation of nanoparticles by gel electrophoresis according to size-and shape. *Nano Letters*. 2007;7(9):2881-2885.
22. Beskorovaynyy AV, Kopitsyn DS, Novikov AA, et al. Rapid optimization of metal nanoparticle surface modification with high-throughput gel electrophoresis. *Acs Nano*. 2014;8(2):1449-1456.
23. Krizkova S, Dostalova S, Michalek P, et al. SDS-PAGE as a tool for hydrodynamic diameter-dependent separation of quantum dots. *Chromatographia*. 2015;78(11-12):785-793.
24. Capriotti AL, Caracciolo G, Cavaliere C, et al. Analytical methods for characterizing the nanoparticle-protein corona. *Chromatographia*. 2014;77(11-12):755-769.

## Bibliografia

25. Zhang H, Wu R. Proteomic profiling of protein corona formed on the surface of nanomaterial. *Science China-Chemistry*. 2015;58(5):780-792.
26. Cobb T. Gel-electrophoresis of nucleic-acids - a practical approach - rickwood,d, hames,bd. *Biochem Educ*. 1984;12(2):93-94.
27. Kim J, Kim SJ, Jang D. Laser-induced shape transformation and electrophoretic analysis of triangular silver nanoplates. *Journal of Separation Science*. 2009;32(23-24):4161-4166.
28. Xu X, Caswell KK, Tucker E, Kabisatpathy S, Brodhacker KL, Scrivens WA. Size and shape separation of gold nanoparticles with preparative gel electrophoresis. *Journal of Chromatography a*. 2007;1167(1):35-41.
29. Helfrich A, Bettmer J. Analysis of gold nanoparticles using ICP-MS-based hyphenated and complementary ESI-MS techniques. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2011;307(1-3):92-98.
30. Helfrich A, Bruchert W, Bettmer J. Size characterisation of au nanoparticles by ICP-MS coupling techniques. *J Anal At Spectrom*. 2006;21(4):431-434.
31. Raju D, Vishwakarma RK, Khan BM, Mehta UJ, Ahmad A. Biological synthesis of cationic gold nanoparticles and binding of plasmid DNA. *Mater Lett*. 2014;129:159-161.
32. Sperling RA, Pellegrino T, Li JK, Chang WH, Parak WJ. Electrophoretic separation of nanoparticles with a discrete number of functional groups. *Advanced Functional Materials*. 2006;16(7):943-948.
33. Wu W, Huang J, Wu L, et al. Two-step size- and shape-separation of biosynthesized gold nanoparticles. *Separation and Purification Technology*. 2013;106:117-122.
34. Pellegrino T, Sperling RA, Alivisatos AP, Parak WJ. Gel electrophoresis of gold-DNA nanoconjugates. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2007:26796.
35. Deka J, Mech R, Ianeselli L, et al. Surface passivation improves the synthesis of highly stable and specific DNA-functionalized gold nanoparticles with variable DNA density. *Acs Applied Materials & Interfaces*. 2015;7(12):7033-7040.
36. Yao G, Pei H, Li J, et al. Clicking DNA to gold nanoparticles: Poly-adenine-mediated formation of monovalent DNA-gold nanoparticle conjugates with nearly quantitative yield. *Npg Asia Materials*. 2015;7:UNSP e159.
37. Crew E, Rahman S, Razzak-Jaffar A, et al. MicroRNA conjugated gold nanoparticles and cell transfection. *Anal Chem*. 2012;84(1):26-29.

## Bibliografia

38. Bartczak D, Kanaras AG. Preparation of peptide-functionalized gold nanoparticles using one pot EDC/sulfo-NHS coupling. *Langmuir*. 2011;27(16):10119-10123.
39. Caballero-Diaz E, Pfeiffer C, Kastl L, et al. The toxicity of silver nanoparticles depends on their uptake by cells and thus on their surface chemistry. *Part Part Syst Charact*. 2013;30(12):1079-1085.
40. Franze B, Engelhard C. Fast separation, characterization, and speciation of gold and silver nanoparticles and their ionic counterparts with micellar electrokinetic chromatography coupled to ICP-MS. *Anal Chem*. 2014;86(12):5713-5720.
41. Liu FK, Ko FH, Huang PW, Wu CH, Chu TC. Studying the size/shape separation and optical properties of silver nanoparticles by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography a*. 2005;1062(1):139-145.
42. Qu H, Mudalige TK, Linder SW. Capillary electrophoresis/inductively-coupled plasma-mass spectrometry: Development and optimization of a high resolution analytical tool for the size-based characterization of nanomaterials in dietary supplements. *Anal Chem*. 2014;86(23):11620-11627.
43. Chang T, Liu F, Chang Y, Chu T. Rapidly characterizing the growth of au nanoparticles by CE. *Chromatographia*. 2008;67(9-10):723-730.
44. Lin K, Chu T, Liu F. On-line enhancement and separation of nanoparticles using capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography a*. 2007;1161(1-2):314-321.
45. Liu FK, Wei GT. Adding sodium dodecylsulfate to the running electrolyte enhances the separation of gold nanoparticles by capillary electrophoresis. *Anal Chim Acta*. 2004;510(1):77-83.
46. Liu FK, Lin YY, Wu CH. Highly efficient approach for characterizing nanometer-sized gold particles by capillary electrophoresis. *Anal Chim Acta*. 2005;528(2):249-254.
47. Lopez-Lorente AI, Laura Soriano M, Valcarcel M. Analysis of citrate-capped gold and silver nanoparticles by thiol ligand exchange capillary electrophoresis. *Microchimica Acta*. 2014;181(15-16):1789-1796.
48. Ban E, Yoo YS, Song EJ. Analysis and applications of nanoparticles in capillary electrophoresis. *Talanta*. 2015;141:15-20.
49. Sang F, Huang X, Ren J. Characterization and separation of semiconductor quantum dots and their conjugates by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2014;35(6):793-803.

## Bibliografia

50. Pozebon D, Scheffler GL, Dressler VL, Nunes MAG. Review of the applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) to the analysis of biological samples. *J Anal At Spectrom.* 2014;29(12):2204-2228.
51. Limbeck A, Galler P, Bonta M, Bauer G, Nischkauer W, Vanhaecke F. Recent advances in quantitative LA-ICP-MS analysis: Challenges and solutions in the life sciences and environmental chemistry. *Analytical and bioanalytical chemistry.* 2015;407(22):6593-617.
52. Jimenez MS, Rodriguez L, Bertolin JR, Gomez MT, Castillo JR. Evaluation of gel electrophoresis techniques and laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry for screening analysis of zn and cu-binding proteins in plankton. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2013;405(1):359-368.
53. Garcia-Otero N, Carmen Barciela-Alonso M, Bermejo-Barrera P, et al. Assessment of metals bound to marine plankton proteins and to dissolved proteins in seawater. *Anal Chim Acta.* 2013;804:59-65.
54. Cedervall T, Lynch I, Lindman S, et al. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(7):2050-2055.
55. Dell'Orco D, Lundqvist M, Oslakovic C, Cedervall T, Linse S. Modeling the time evolution of the nanoparticle-protein corona in a body fluid. *Plos One.* 2010;5(6):e10949.
56. Albanese A, Walkey CD, Olsen JB, Guo H, Emili A, Chan WCW. Secreted biomolecules alter the biological identity and cellular interactions of nanoparticles. *Acs Nano.* 2014;8(6):5515-5526.
57. Lartigue L, Wilhelm C, Servais J, et al. Nanomagnetic sensing of blood plasma protein interactions with iron oxide nanoparticles: Impact on macrophage uptake. *Acs Nano.* 2012;6(3):2665-2678.
58. Treuel L, Brandholt S, Maffre P, Wiegele S, Shang L, Nienhaus GU. Impact of protein modification on the protein corona on nanoparticles and nanoparticle-cell interactions. *Acs Nano.* 2014;8(1):503-513.
59. Fleischer CC, Payne CK. Nanoparticle-cell interactions: Molecular structure of the protein corona and cellular outcomes. *Acc Chem Res.* 2014;47(8):2651-2659.
60. Lee YK, Choi E, Webster TJ, Kim S, Khang D. Effect of the protein corona on nanoparticles for modulating cytotoxicity and immunotoxicity. *International Journal of Nanomedicine.* 2015;10:97-112.

## Bibliografía

61. Wolfram J, Yang Y, Shen J, et al. The nano-plasma interface: Implications of the protein corona. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 2014;124:17-24.
62. Matczuk M, Anecka K, Timerbaev A, et al. Speciation of metal-based nanomaterials in human serum characterized by capillary electrophoresis coupled to ICP-MS: A case study of gold nanoparticles. . 2015;7:1364-1370.
63. Zhu X, Mason TG. Passivated gel electrophoresis of charged nanospheres by light-scattering video tracking. *J Colloid Interface Sci*. 2014;428:199-207.
64. Villanueva C. Estudio de nanopartículas de plata. aplicación de electroforesis y ablación láser-ICP-MS. *Departamento Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza*. 2014.
65. Díez C. *Nuevas aportaciones para la caracterización de nanopartículas de plata mediante técnicas electelectroforéticas y LA-ICP-MS*. ; 2013.
66. Alonso I. Nuevas aportaciones a las separaciones de nanopartículas mediante electroforesis. *Memoria postgrado de investigación, Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza*. 2012.
67. Bolea E, Jimenez-Lamana J, Laborda F, Castillo JR. Size characterization and quantification of silver nanoparticles by asymmetric flow field-flow fractionation coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2011;401(9):2723-2732.
68. Soares DM, Gomes WE, Tenan MA. Sodium dodecyl sulfate adsorbed monolayers on gold electrodes. *Langmuir*. 2007;23(8):4383-4388.
69. Dubascoux S, Von Der Kammer F, Le Hecho I, Gautier MP, Lespes G. Optimisation of asymmetrical flow field flow fractionation for environmental nanoparticles separation. *J Chromatogr A*. 2008;1206(2):160-165.
70. Dubois LH, Nuzzo RG. Synthesis, structure, and properties of model organic-surfaces. *Annu Rev Phys Chem*. 1992;43:437-463.
71. Zhu T, Vasilev K, Kreiter M, Mittler S, Knoll W. Surface modification of citrate-reduced colloidal gold nanoparticles with 2-mercaptoposuccinic acid. *Langmuir*. 2003;19(22):9518-9525.
72. Grombe R, Allmaier G, Charoud-Got J, et al. Feasibility of the development of reference materials for the detection of ag nanoparticles in food: Neat dispersions and spiked chicken meat. *Accreditation and Quality Assurance*. 2015;20(1):3-16.

## Bibliografía

73. Li L, Wu H, Ji C, van Gestel CAM, Allen HE, Peijnenburg WJGM. A metabolomic study on the responses of daphnia magna exposed to silver nitrate and coated silver nanoparticles. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2015;119:66-73.
74. Lopez-Garcia I, Vicente-Martinez Y, Hernandez-Cordoba M. Speciation of silver nanoparticles and ag(I) species using cloud point extraction followed by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy.* 2014;101:93-97.
75. Mudalige TK, Qu H, Linder SW. Asymmetric flow-field flow fractionation hyphenated ICP-MS as an alternative to cloud point extraction for quantification of silver nanoparticles and silver speciation: Application for nanoparticles with a protein corona. *Anal Chem.* 2015;87(14):7395-7401.
76. Zhou X, Liu R, Liu J. Rapid chromatographic separation of dissoluble ag(I) and silver-containing nanoparticles of 1-100 nanometer in antibacterial products and environmental waters. *Environ Sci Technol.* 2014;48(24):14516-14524.
77. Huang K, Xu K, Tang J, et al. Room temperature cation exchange reaction in nanocrystals for ultrasensitive speciation analysis of silver ions and silver nanoparticles. *Anal Chem.* 2015;87(13):6584-6591.
78. Lee Y, Kim J, Oh J, et al. Ion-release kinetics and ecotoxicity effects of silver nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 2012;31(1):155-159.
79. Liu J, Sonshine DA, Shervani S, Hurt RH. Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces. *Acs Nano.* 2010;4(11):6903-6913.
80. Hsiao I-, Hsieh Y, Wang C, Chen I-, Huang Y. Trojan-horse mechanism in the cellular uptake of silver nanoparticles verified by direct intra- and extracellular silver speciation analysis. *Environ Sci Technol.* 2015;49(6):3813-3821.
81. Ostermeyer A, Mumupar CK, Semprini L, Radniecki T. Influence of bovine serum albumin and alginate on silver nanoparticle dissolution and toxicity to nitrosomonas europaea. *Environ Sci Technol.* 2013;47(24):14403-14410.
82. Martin MN, Allen AJ, MacCuspie RI, Hackley VA. Dissolution, agglomerate morphology, and stability limits of protein-coated silver nanoparticles. *Langmuir.* 2014;30(38):11442-11452.
83. Siriwardana K, Wang A, Gadogbe M, Collier WE, Fitzkee NC, Zhang D. Studying the effects of cysteine residues on protein interactions with silver nanoparticles. *J Phys Chem C.* 2015;119(5):2910-2916.



## Bibliografía

84. Gondikas AP, Morris A, Reinsch BC, Marinakos SM, Lowry GV, Hsu-Kim H. Cysteine-induced modifications of zero-valent silver nanomaterials: Implications for particle surface chemistry, aggregation, dissolution, and silver speciation. *Environ Sci Technol*. 2012;46(13):7037-7045.
85. Jimenez J. *Nanometrología analítica: Métodos analíticos para la detección, caracterización y cuantificación de nanopartículas sintéticas*. Departamento Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza; 2013.
86. Gimbert LJ, Haygarth PM, Beckett R, Worsfold PJ. Comparison of centrifugation and filtration techniques for the size fractionation of colloidal material in soil suspensions using sedimentation field-flow fractionation. *Environ Sci Technol*. 2005;39(6):1731-1735.