

## ANEXOS A

### ANEXOS A.

#### **Método Electroforético**

Tabla A.1. Rango de tamaños de NPs en función de la concentración de Agarosa.

% Agarosa en el Gel	Nanopartículas (nm)	
	Mínimo	Máximo
0.5	5	148
0.75	4	49.4
1	2.5	49.4
1.25	2	34.6
2	0.5	14.8
3	0.2	9.9
4	0.1	2

Tabla A.2. Condiciones de la electroforesis correspondientes al método PEG-Tris-Borato-EDTA-AGE

<b>Tampón de electroforesis</b>	0.5 x TBE, pH=8.33
<b>Tampón de carga</b>	30% glicerol, 0.5 x TBE, pH 8.33
<b>Gel de electroforesis</b>	0.5% agarosa, 0.5 x TBE, 1% PEG
<b>Voltage</b>	150 V
<b>Volumen muestra por pocillo</b>	15 µL (25% T.C./75% disolución NP)

## ANEXOS A

Tabla A.3. Condiciones de la electroforesis correspondientes al método SDS-Tris-Borato-AGE

### A.3.1. 0,1% SDS (T.E.)

<b>Tampón de electroforesis</b>	0.5 x TBE, 0.1%SDS, pH 8.33
<b>Tampón de carga</b>	30% glicerol, 0.5 x TBE, 0.1%SDS, pH 8.33
<b>Gel de electroforesis</b>	0.5% agarosa, 0.5 x TBE, 0.1%SDS
<b>Voltage</b>	150 V
<b>Volumen muestra por pocillo</b>	15 µL (25% T.C./75% disolución NP)

### A.3.2. 0,3% SDS (T.E.)

<b>Tampón de electroforesis</b>	0.5 x TBE, 0,3%SDS, pH 8.33
<b>Tampón de carga</b>	30% glicerol, 0.5 x TBE, 0.3%SDS, pH 8.33
<b>Gel de electroforesis</b>	0.5% agarosa, 0.5 x TBE, 0.3%SDS
<b>Voltage</b>	150 V
<b>Volumen muestra por pocillo</b>	15 µL (25% T.C./75% disolución NP)

### A.3.3. 1% SDS (T.E.)

<b>Tampón de electroforesis</b>	0.5 x TBE, 1%SDS, pH 8.33
<b>Tampón de carga</b>	30% glicerol, 0.5 x TBE, 1%SDS, pH 8.33
<b>Gel de electroforesis</b>	0.5% agarosa, 0.5 x TBE, 1%SDS
<b>Voltage</b>	150 V
<b>Volumen muestra por pocillo</b>	15 µL (25% T.C./75% disolución NP)

## ANEXOS A

### A.3.4. 2%SDS (T.E.)

<b>Tampón de electroforesis</b>	0.5 x TB, 2%SDS, pH 8.33
<b>Tampón de carga</b>	30% glicerol, 0.5 x TB, 2%SDS, pH 8.33
<b>Gel de electroforesis</b>	0.5% agarosa, 0.5 x TB, 2%SDS
<b>Voltage</b>	150 V
<b>Volumen muestra por pocillo</b>	15 µL (25% T.C./75% disolución NP)

Se probó a fijar la cantidad de SDS en el T.E. a 1% y a probar dos T.C. con diferentes surfactantes (2%SDS y 1%SDBS)

### A.3.5. 1%SDS (T.E.)

<b>Tampón de electroforesis</b>	0.5 x TB, 1%SDS, pH 8.33
<b>Tampón de carga</b>	1) 30% glicerol, 0.5 x TB, 2%SDS, pH 8.33 2) 30% glicerol, 0.5 x TB, 1%SDBS, pH 8.2
<b>Gel de electroforesis</b>	0.5% agarosa, 0.5 x TB, 1%SDS
<b>Voltage</b>	150 V
<b>Volumen muestra por pocillo</b>	15 µL (50% T.C./50% disolución NP)

Tabla A.4. Condiciones de la electroforesis correspondientes al método SDBS-Tris-Borato-AGE

<b>Tampón de electroforesis</b>	0.5 x TB, 1%SDBS, pH 8.2
<b>Tampón de carga</b>	30% glicerol, 0.5 x TB, 1%SDBS, pH 8.2
<b>Gel de electroforesis</b>	0.5% agarosa, 0.5 x TB, 1%SDBS
<b>Voltage</b>	150 V
<b>Volumen muestra por pocillo</b>	15 µL (25% T.C./75% disolución NP)

## ANEXOS A

Tabla A.5. Condiciones de la electroforesis correspondientes al método SDS-Tris-Glicina-AGE

### **A.5.1. 2% SDS (T.C.)**

<b>Tampón de electroforesis</b>	25 mM Tris, 192 mM Gli, 1% SDS, pH 8.3
<b>Tampón de carga</b>	30% glicerol, 25 mM Tris, 2% SDS, pH 8.3
<b>Gel de electroforesis</b>	0.3% agarosa, 25 mM Tris, 1% SDS
<b>Voltage</b>	150 V
<b>Volumen muestra por pocillo</b>	20 µL (50% T.C./50% disolución NP)

Tabla A.6. Condiciones de la electroforesis correspondientes al método SDS-TMA-Tris-Glicina-AGE

### **A.6.1. 0,1% TMA(T.C.)**

<b>Tampón de electroforesis</b>	25 mM Tris, 192 mM Gli, 1% SDS, pH 8.3
<b>Tampón de carga</b>	30% glicerol, 25 mM Tris, 0,1% TMA, pH 8.3
<b>Gel de electroforesis</b>	0.5% agarosa, 25 mM Tris, 1% SDS
<b>Voltage</b>	150 V
<b>Volumen muestra por pocillo</b>	20 µL (50% T.C./50% disolución NP)

### **A.6.2. 0,15% TMA (T.C.) + 1% SDS**

<b>Tampón de electroforesis</b>	25 mM Tris, 192 mM Gli, 1% SDS, pH 8.3
<b>Tampón de carga</b>	30% glicerol, 25 mM Tris, 1% SDS, 0.15% TMA, pH 8.55
<b>Gel de electroforesis</b>	0.5% agarosa, 25 mM Tris, 1% SDS
<b>Voltage</b>	150 V
<b>Volumen muestra por pocillo</b>	20 µL (50% T.C./50% disolución NP)

## ANEXOS A

Posteriormente se procedió a aumentar el porcentaje de agarosa. Se usaron varios tampones de carga distintos.

### A.6.3. 0.75%AGE

<b>Tampón de electroforesis</b>	25 mM Tris, 192 mM Gli, 1%SDS, pH 8.3
<b>Tampón de carga</b>	30% glicerol, 25 mM Tris, 1% SDS, 0.15% TMA, pH 8.55
<b>Gel de electroforesis</b>	0.75% agarosa, 25 mM Tris, 1%SDS
<b>Voltage</b>	150 V
<b>Volumen muestra por pocillo</b>	20 µL (50% T.C./50% disolución NP)

### A.6.4. 1.25%AGE

<b>Tampón de electroforesis</b>	25 mM Tris, 192 mM Gli, 1%SDS, pH 8.3
<b>Tampón de carga</b>	1) 30% glicerol, 25 mM Tris, 1% SDS, 0.05% TMA, pH 8.40 2) 30% glicerol, 25 mM Tris, 2%SDS, 0.05% TMA, pH 8.50 3) 30% glicerol, 25 mM Tris, 2%SDS, pH 8.3
<b>Gel de electroforesis</b>	1.25% agarosa, 25 mM Tris, 1%SDS
<b>Voltage</b>	150 V
<b>Volumen muestra por pocillo</b>	20 µL (50% T.C./50% disolución NP)

### A.6.5. 1.5%AGE

<b>Tampón de electroforesis</b>	25 mM Tris, 192 mM Gli, 1%SDS, pH 8.3
<b>Tampón de carga</b>	1) 30% glicerol, 25 mM Tris, 1% SDS, 0.05% TMA, pH 8.40 2) 30% glicerol, 25 mM Tris, 2%SDS, 0.05% TMA, pH 8.50 3) 30% glicerol, 25 mM Tris, 2%SDS, pH 8.3

## ANEXOS A

<b>Gel de electroforesis</b>	1.5% agarosa, 25 mM Tris, 1% SDS
<b>Voltage</b>	150 V
<b>Volumen muestra por pocillo</b>	20 µL (50% T.C./50% disolución NP)

### A.6.6. 1.75%AGE

<b>Tampón de electroforesis</b>	25 mM Tris, 192 mM Gli, 1% SDS, pH 8.3
<b>Tampón de carga</b>	1) 30% glicerol, 25 mM Tris, 1% SDS, 0.05% TMA, pH 8.40 2) 30% glicerol, 25 mM Tris, 1% SDS, 0.15% TMA, pH 8.55 3) 30% glicerol, 25 mM Tris, 2% SDS, pH 8.3
<b>Gel de electroforesis</b>	0.75% agarosa, 25 mM Tris, 1% SDS
<b>Voltage</b>	150 V
<b>Volumen muestra por pocillo</b>	20 µL (50% T.C./50% disolución NP)

### A.6.7. 2%AGE

<b>Tampón de electroforesis</b>	25 mM Tris, 192 mM Gli, 1% SDS, pH 8.3
<b>Tampón de carga</b>	30% glicerol, 25 mM Tris, 1% SDS, 0.05% TMA, pH 8.40
<b>Gel de electroforesis</b>	2% agarosa, 25 mM Tris, 1% SDS
<b>Voltage</b>	150 V
<b>Volumen muestra por pocillo</b>	20 µL (50% T.C./50% disolución NP)

## ANEXOS A

### Método LA-ICP-MS

Tabla A.7. Condiciones instrumentales de LA-ICP-MS

<b>ICP-MS</b>	
<b>Potencia (W)</b>	1100
<b>Caudal gas plasmógeno</b>	14 L/min
<b>Barridos/ lecturas</b>	1
<b>Lecturas /réplica</b>	Según longitud línea barrido láser
<b>Réplicas</b>	1
<b>Dwell time</b>	50 ms
<b>Modo de adquisición</b>	Peak hopping
<b>Detector mode</b>	Dual
<b>Autolens</b>	On
<b>UP- 213 laser system</b>	
<b>Fuente de luz</b>	Ring
<b>Energía del láser</b>	80% (4,6 Jcm <sup>-2</sup> )
<b>Frecuencia</b>	20 Hz
<b>Tamaño orificio láser</b>	20 μm
<b>Modo de disparo</b>	Contínuo, línea
<b>Longitud de la línea</b>	De acuerdo a la longitud del gel (barrido de todo el gel)
<b>Velocidad de barrido</b>	60 μm/s
<b>Profundidad</b>	5 μm
<b>Caudal gas portador (Ar)</b>	1 L/min

## ANEXOS A

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

Tabla A.8. Diluciones de los sobrenadantes.

Muestra	Factor de dilución
Alb	0,0489
Trans	0,04643
Alb Col 1	0,04445
Alb Col 2	0,04621
Alb Col 3	0,04585
Trans Col 1	0,04605
Trans Col 2	0,04596
Trans Col 3	0,04665
Col	0,04672

Tabla A.9. Condiciones instrumentales de ICP-MS

<b>ICP-MS</b>	
<b>Potencia (W)</b>	1100
<b>Caudal gas plasmógeno</b>	14 L/min
<b>Barridos/ lecturas</b>	3
<b>Lecturas /réplica</b>	1
<b>Réplicas</b>	5
<b>Dwell time</b>	50 ms
<b>Modo de adquisición</b>	Peak hopping
<b>Detector mode</b>	Dual

## ANEXOS A

Tabla A.10. Diluciones de los ultrafiltrados.

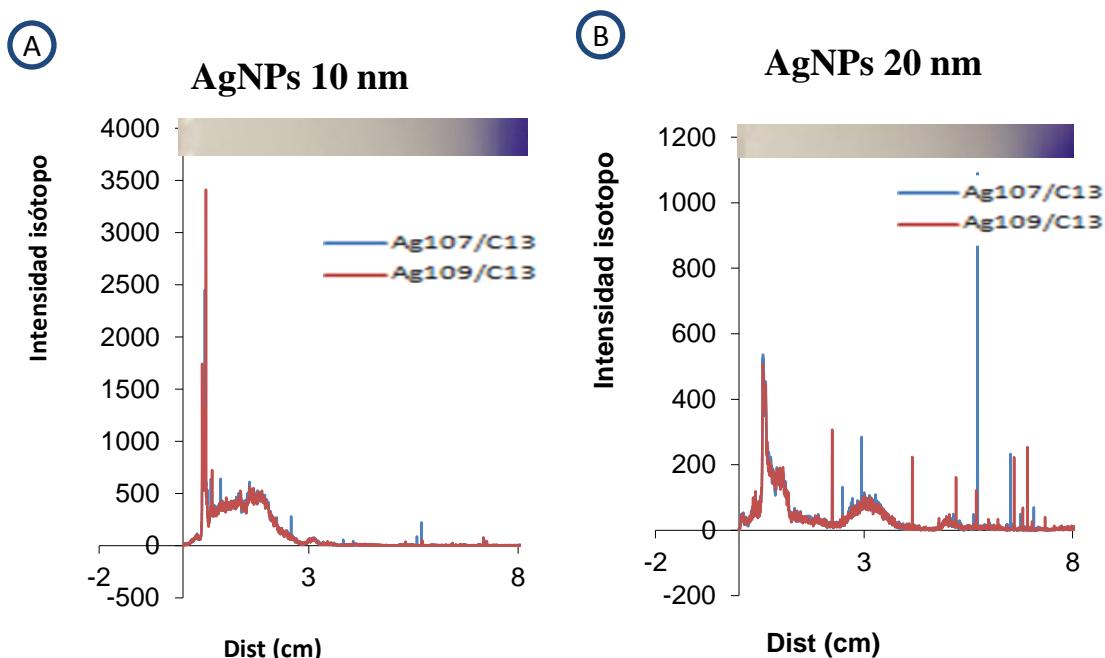
Muestra	Factor de dilución
Alb	0,04026
Trans	0,03784
Col	0,04285
Alb Col 2	0,0454
Trans Col 2	0,03955

## ANEXOS B

### ANEXOS B.

#### Optimización de la caracterización de Ag NPs por electroforesis en gel de agarosa y detección por LA-ICP-MS

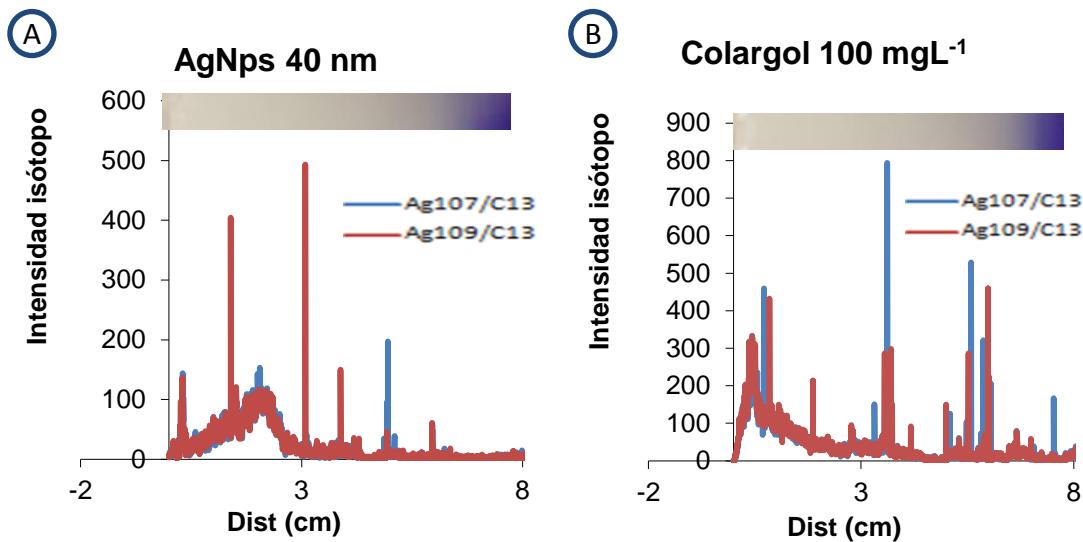
Figura B1. Electroferogramas obtenidos mediante LA-ICP-MS tras la separación por 0,5%AGE; 0,5xTBE; 1%PEG para los patrones de AgNPs. Patrón de 10 nm (A) y patrón de 20 nm (B).



Como se puede observar, las AgNPs no se mueven de acuerdo a su relación tamaño-carga en el gel, tanto el patrón de 10 nm como el de 20 nm se encuentran distribuidos en la primera mitad del gel.

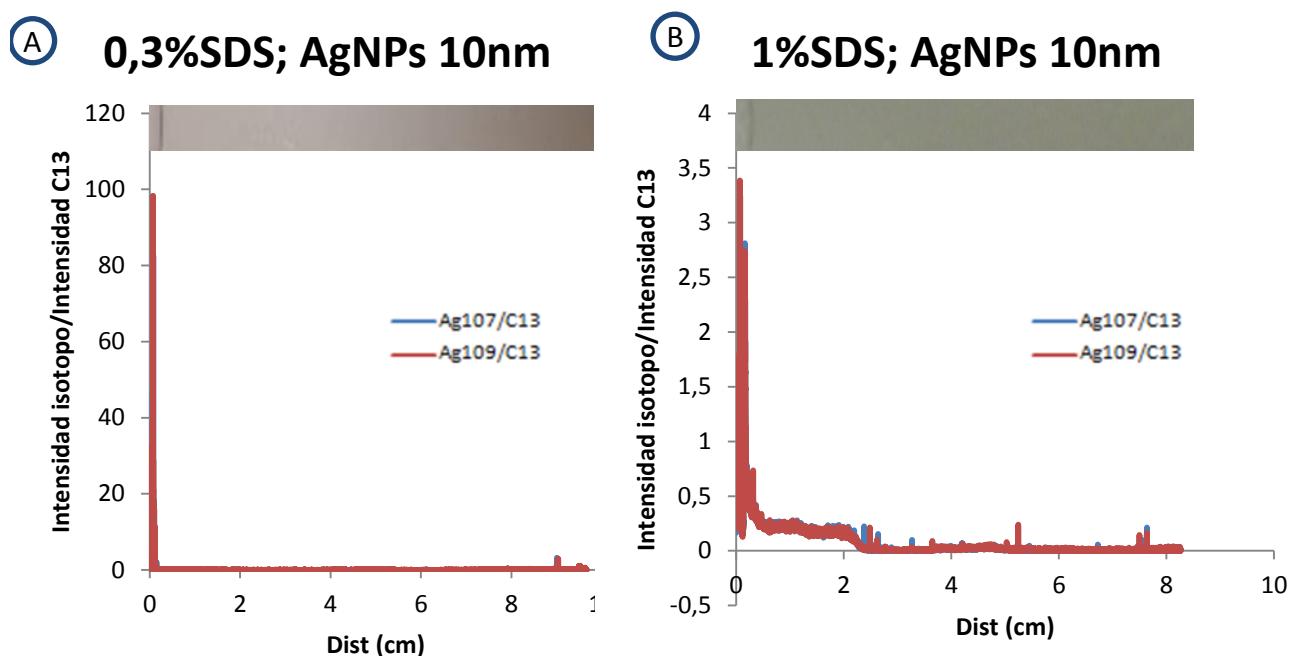
## ANEXOS B

Figura B2. Electroferogramas obtenidos mediante LA-ICP-MS tras la separación por 0,5%AGE; 0,5xTBE; 1%PEG para el patrón de AgNPs y la muestra de Colargol. Patrón de 40 nm (A) y Colargol 100 mgL<sup>-1</sup> (B).



Como se puede observar, la muestra de Colargol se comporta igual que los patrones de AgNPs. En todos los casos, las AgNPs se quedan en el principio del gel.

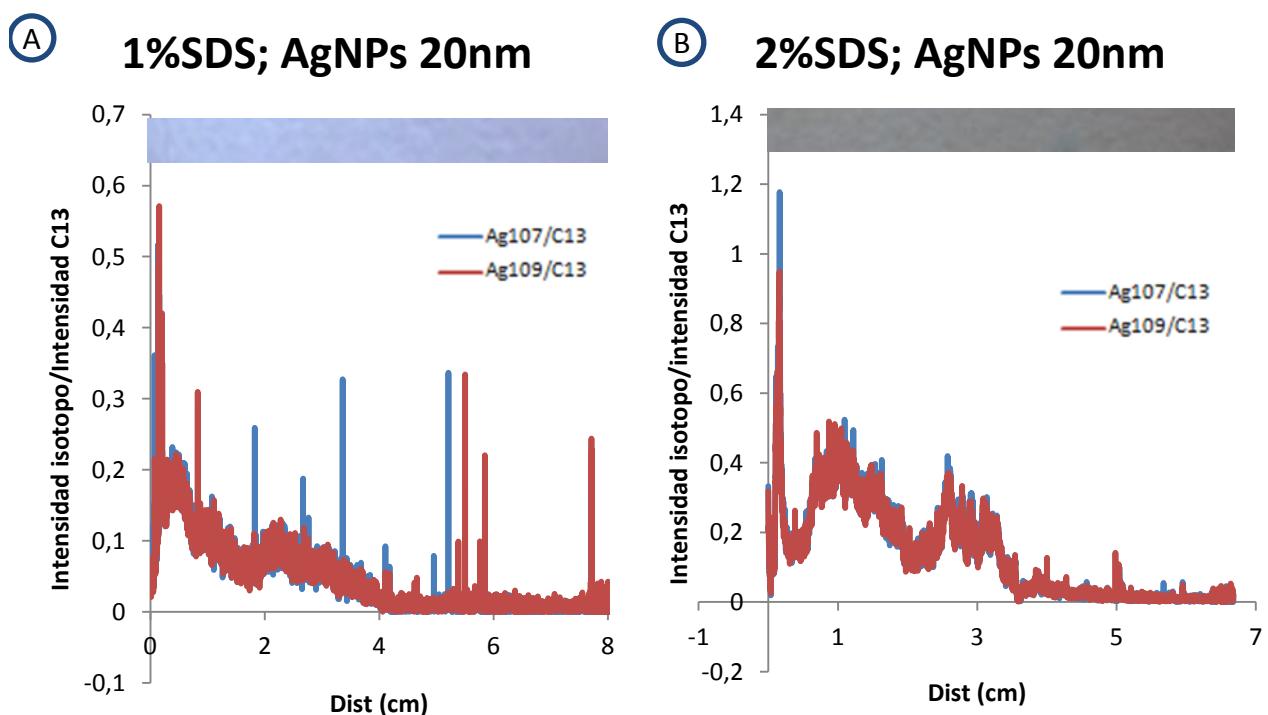
Figura B3. Electroferogramas obtenidos mediante LA-ICP-MS tras la separación por 0,5%AGE; %SDS; 0,5xTBE para los patrones de AgNPs. Patrón de 10 nm con 0,3%SDS en T.E., T.C. y gel (A) y patrón de 10 nm con 1%SDS en T.E., T.C. y gel (B).



## ANEXOS B

Las AgNPs se quedan en el pocillo y no entran en el gel. Se observa un pico alto en el pocillo y ninguna o casi ninguna señal de Ag en el resto del gel. Con 1%SDS se observa que algunas AgNPs entran un poco en el gel y aparece una pequeña banda al principio del gel.

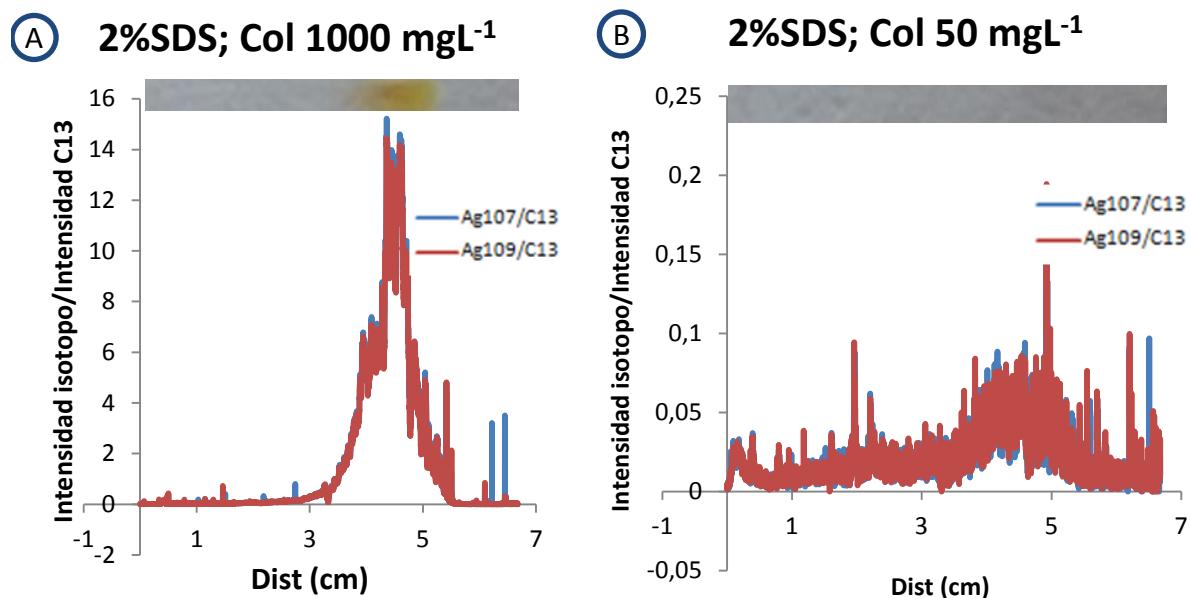
Figura B4. Electroferogramas obtenidos mediante LA-ICP-MS tras la separación por 0,5%AGE; SDS; 0,5xTBE para los patrones de AgNPs. Patrón de 20 nm con 1%SDS en T.E., T.C. y gel (A) y patrón de 20 nm con 2%SDS en T.E., T.C. y gel (B).



Como podemos observar las AgNPs (cit) en el patrón de 20 nm con 1%SDS entran un poco en el gel, pero se obtienen bandas muy dispersas y no avanzan de acuerdo a su relación tamaño-carga. Por otra parte, las AgNPs (cit) en el patrón de 20 nm con 2%SDS entra un poco más que la anterior en el gel, pero al igual que la figura de la izquierda se obtienen bandas muy difusas y siguen sin moverse de acuerdo a su relación tamaño-carga.

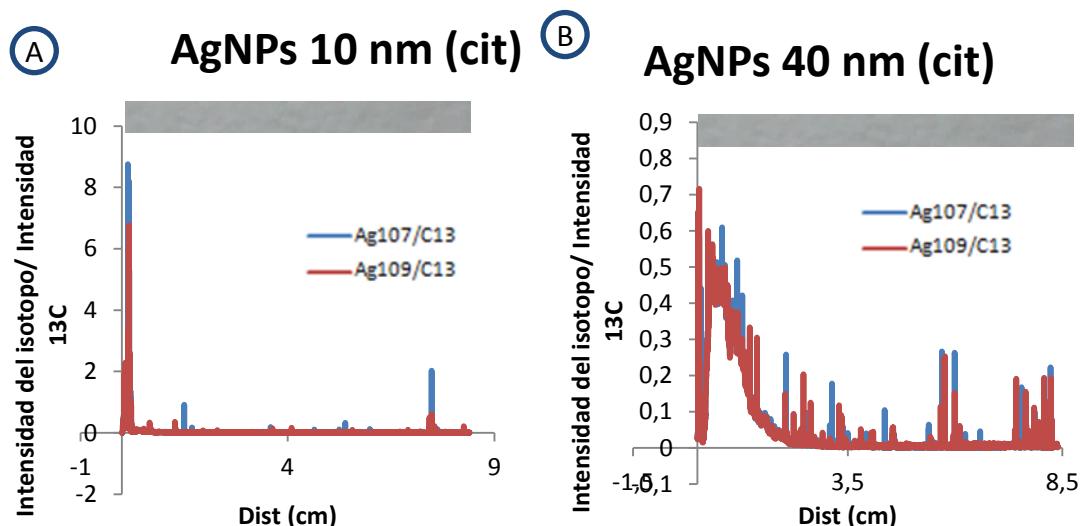
## ANEXOS B

Figura B5. Electroferogramas obtenidos mediante LA-ICP-MS tras la separación por 0,5%AGE; 2%SDS; 0,5xTB para la muestra de Colargol. Colargol 1000 mgL<sup>-1</sup> (A) y Colargol 50 mgL<sup>-1</sup> (B).



En ambas muestras se observan las AgNPs en la segunda mitad del gel, lo que puede ser coherente con que las AgNPs en la muestra de Colargol avanzan de acuerdo a su tamaño-carga. Cabe destacar que la muestra de 50 mgL<sup>-1</sup> aparece un pico muy pequeño.

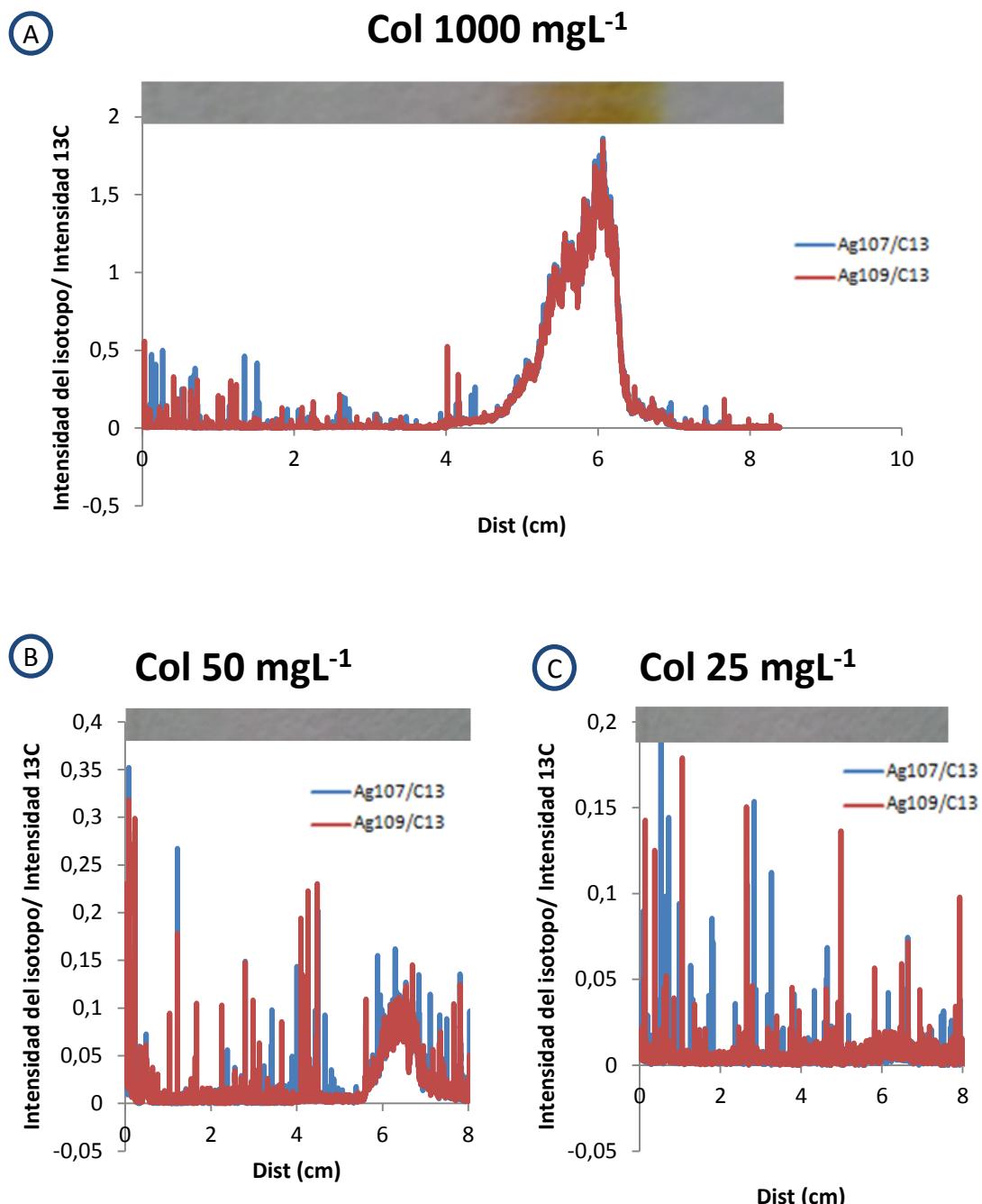
Figura B6. Electroferogramas obtenidos mediante LA-ICP-MS tras la separación por 0,5%AGE; 1%SDBS; 0,5xTB para los patrones de AgNPs. Patrón de 10 nm (A) y patrón de 40 nm (B).



## ANEXOS B

Ambos patrones de AgNPs (10 y 40 nm) se quedan en el pocillo o entran un poco en el gel pero en ningún caso se mueven de acuerdo a su relación tamaño-carga.

Figura B7. Electroferogramas obtenidos mediante LA-ICP-MS tras la separación por 0,5%AGE; 1%SDBS; 0,5xTB para la muestra de Colargol. Colargol de  $1000 \text{ mgL}^{-1}$  (A), Colargol de  $50 \text{ mgL}^{-1}$  (B) y Colargol de  $25 \text{ mgL}^{-1}$  (C).

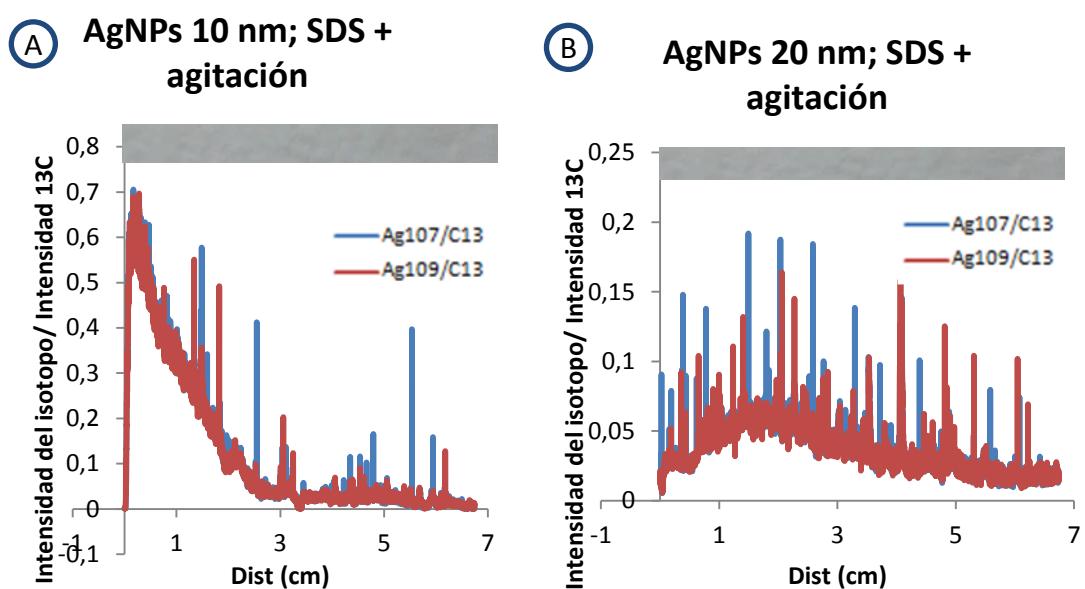


Como se puede ver las AgNPs en la muestra de Colargol de  $1000 \text{ mgL}^{-1}$  parecen avanzar en relación a su tamaño-carga. Además, el pico del electroferograma coincide

## ANEXOS B

con el observado visualmente. Las AgNPs en la muestra de Colargol de  $50 \text{ mgL}^{-1}$  se observan en un pico estrecho que parece corresponderse a su relación tamaño-carga, pero se obtiene bastante ruido de fondo. Por otro lado, las AgNPs en la muestra de Colargol de  $25 \text{ mgL}^{-1}$  no se aprecian debido al ruido de fondo.

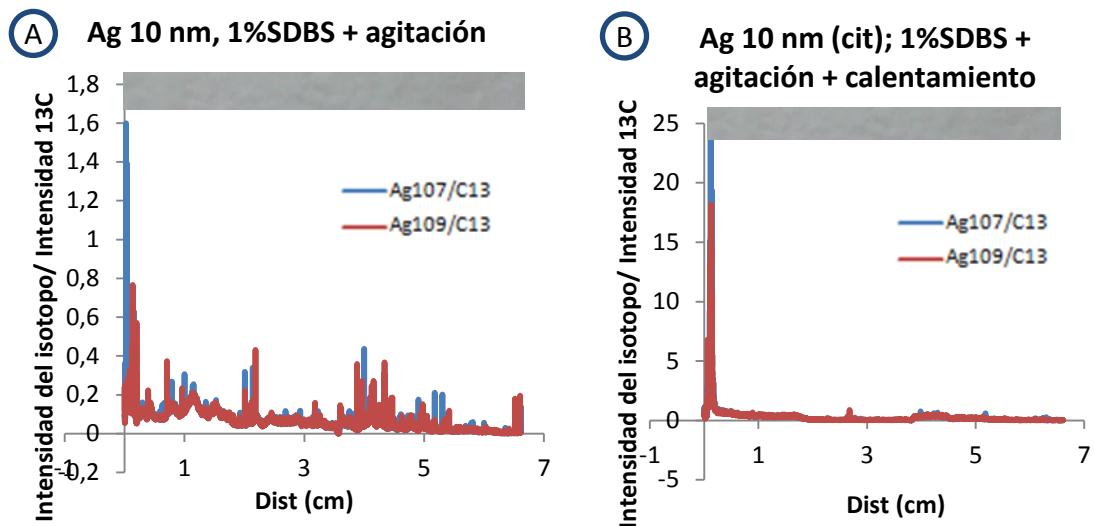
**Figura B8.** Electroferogramas obtenidos mediante LA-ICP-MS tras la separación por 0,5%AGE; 1%SDS; 0,5xTB con 2%SDS en T.C. para los patrones de AgNPs. Patrón de 10 nm con agitación (A) y patrón de 20 nm con agitación (B).



Ambos patrones de AgNPs (10 y 20 nm) se observan al principio del gel y no se mueven de acuerdo a su relación tamaño-carga. Por lo tanto podemos concluir que la agitación no es una solución a nuestro problema.

## ANEXOS B

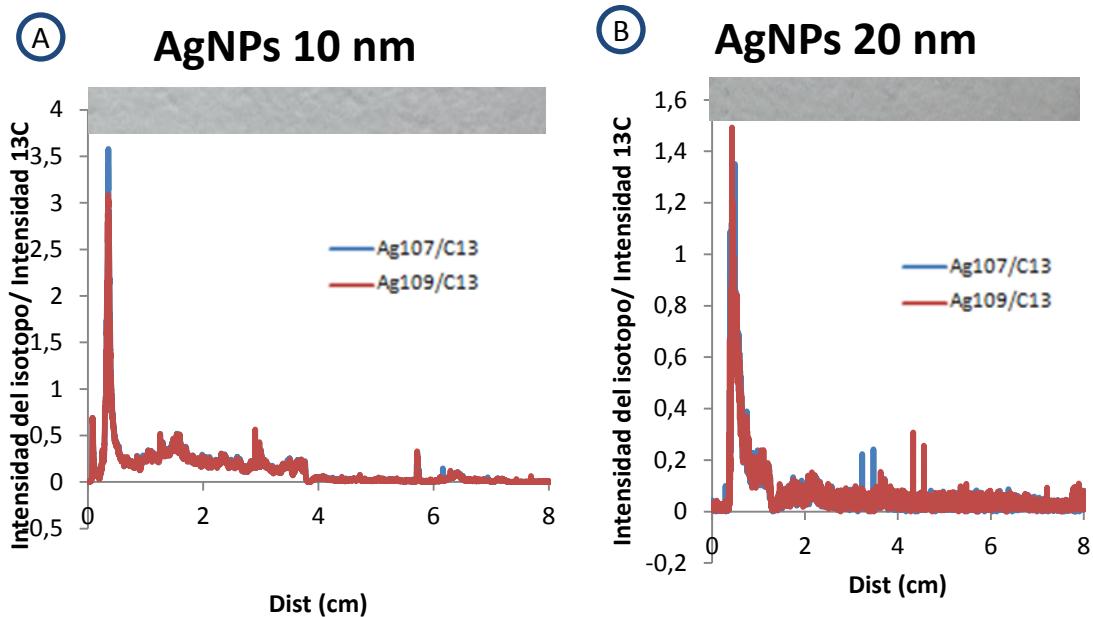
Figura B9. Electroferogramas obtenidos mediante LA-ICP-MS tras la separación por 0,5%AGE; 1%SDS; 0,5xTB con 1%SDBS en T.C. para los patrones de AgNPs. Patrón de 10 nm con agitación (A) y patrón de 10 nm con agitación y calentamiento (B).



Las AgNPs casi no entran en el gel y no se mueven de acuerdo a su relación tamaño-carga. El calentamiento unido a la agitación no consigue que las AgNPs interaccionen correctamente con el surfactante ya que los electroferograms obtenidos de las muestras sometidas a ambos tratamientos previos son muy parecidos y ninguno de ellos soluciona el problema.

## ANEXOS B

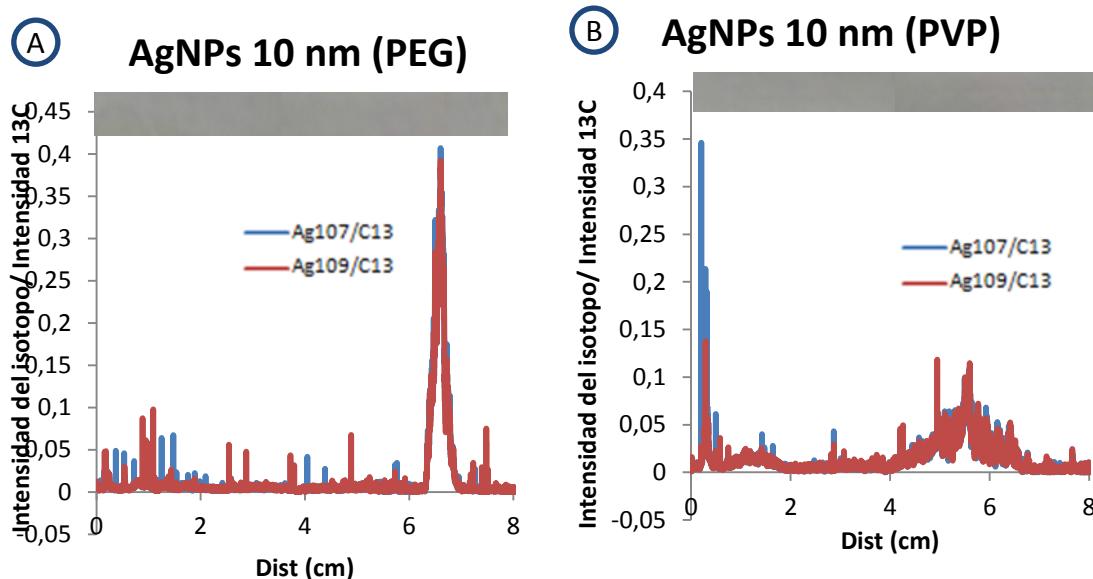
Figura B10. Electroferogramas obtenidos mediante LA-ICP-MS tras la separación por 0,3%AGE; 1%SDS; 25 mM Tris; 192 mM Glicina con 2% en T.C. para los patrones de AgNPs. AgNPs patrón de 10 nm recubiertas de citratos (A) y AgNPs patrón de 10 nm recubiertas de citratos (B).



Como se puede observar este nuevo tampón tampoco consigue que las AgNPs patrón recubiertas con citratos avancen y se quedan en el pocillo o entran muy poco.

## ANEXOS B

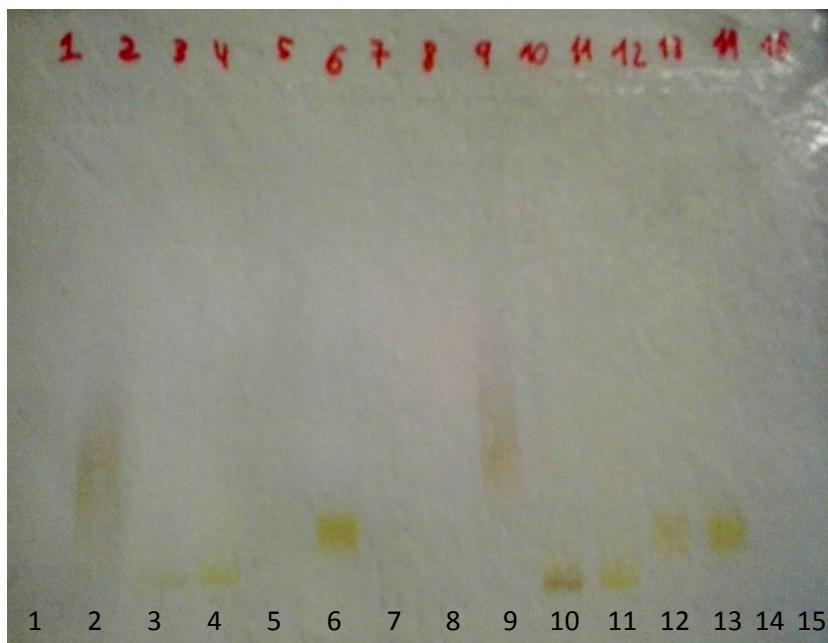
Figura B11. Electroferogramas obtenidos mediante LA-ICP-MS tras la separación por 0,3%AGE; 1%SDS; 25 mM Tris; 192 mM Glicina con 2% en T.C. para los patrones de AgNPs. Patrón de 10 nm recubiertas con PEG (A) y patrón de 10 nm recubiertas con PVP (B).



Ambas AgNPs se mueven aparentemente de acuerdo a su relación tamaño-carga. Las AgNPs patrón recubiertas con PEG avanzan más que las de PVP y además también presentan un pico bastante más grande. El hecho de que avancen más puede ser porque las AgNPs patrón de 10 nm recubiertas con PEG cogen más moléculas de SDS que las AgNPs patrón de 10 nm recubiertas con PVP y por lo tanto tienen más carga negativa o bien porque las AgNPs patrón de 10 nm recubiertas con PVP interaccionan con el gel y por eso avanzan menos. Este pico en el electroferograma de las AgNPs patrón recubiertas con PEG lo podemos atribuir a la mayoría de las AgNPs ya que el espectro no presenta ningún otro pico de intensidad considerable. Por otra parte el pico correspondiente a las AgNPs patrón recubiertas con PVP no se puede asignar a todas las AgNPs puesto que la intensidad es muy baja y además aparecen dos picos más, un pico grande en el pocillo y otro muy pequeño al principio del gel, por lo tanto podemos pensar que las AgNPs se encuentran distribuidas por el gel y mayormente en esos tres picos. Puesto que las dos disoluciones de AgNPs tienen la misma concentración el área de los picos tendría que ser la misma y no lo es, lo que nos vuelve a sugerir que las NPs en la muestra recubierta con PVP están distribuidas por el gel

## ANEXOS B

Figura B12. Gel obtenido con el método SDS-TMA-Tris-Glicina-AGE (0,75% AGE)

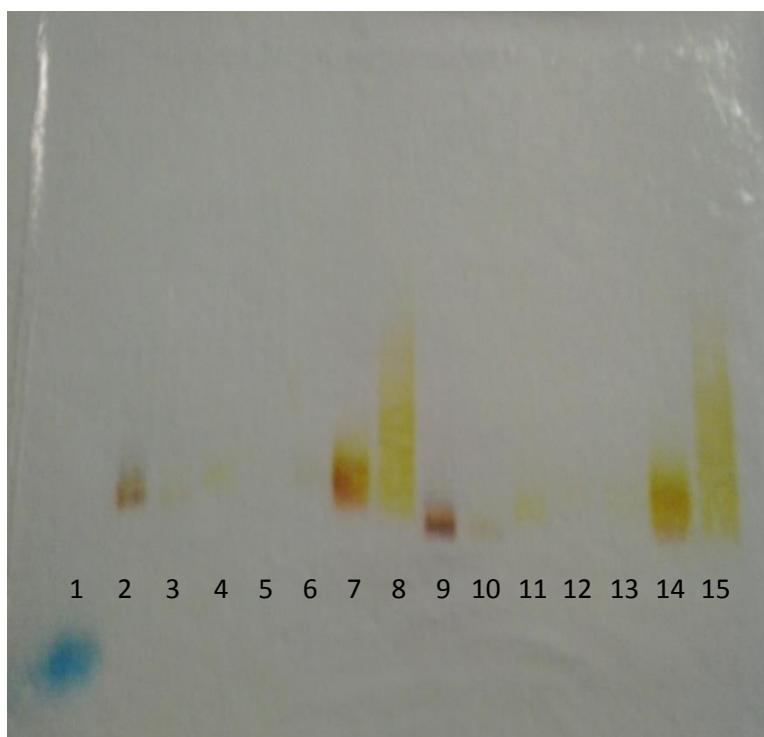


1. *Blanco*
2. *Patrón AgNPs 10 nm (cit)*
3. *Patrón AgNPs 20 nm (cit)*
4. *Patrón AgNPs 40 nm (cit)*
5. *Col 25 mgL<sup>-1</sup>*
6. *Col 1000 mgL<sup>-1</sup>*
7. *Patrón AgNPs 10 nm (PVP)*
8. *Patrón AgNPs 10 nm (PEG)*
9. *Patrón AgNPs 10 nm (cit)*
10. *Patrón AgNPs 20 nm (cit)*
11. *Patrón AgNPs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

Se empezó aumentando la cantidad de agarosa hasta 0,75%, el procedimiento se describe en la tabla A.6.3. correspondiente al anexo A. Como se puede observar en la figura B12, en el patrón de 10 nm (carriles 2 y 9) aparece una banda muy ancha, esto puede tener varias explicaciones. La más sencilla podría ser que la disolución patrón de 10 nm (100 mgL<sup>-1</sup>) está más concentrada que la de los patrones de 20 y 40 nm (20 mgL<sup>-1</sup>). Sin embargo la muestra de Colargol (1000 mgL<sup>-1</sup>; carriles 6 y 13) aparece en una banda más estrecha, por lo pensamos en otras posibilidades. Otra explicación puede ser que al usar una cantidad mayor de Agarosa hay más residuos libres y por lo tanto se produce interacción entre las AgNPs y el gel, por lo que no todas las AgNPs se mueven igual y aparecen muy dispersas en el gel formando una banda muy ancha. Por otro lado, también se puede deber a que las AgNPs han estado mucho tiempo en contacto con el TMA y se ha estropeado la muestra ya que cuando inyectamos la disolución en el pocillo se observó un leve color rojizo, lo que como ya hemos comentado se asocia con una mayor presencia de las AgNPs en el pocillo debido a la aglomeración de las AgNPs.

## ANEXOS B

Figura B13. Gel obtenido con el método SDS-TMA-Tris-Glicina-AGE (1,25% AGE)



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

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

**T.C.2.:** 30% glicerol, 25 mM Tris, 2% SDS, 0.05% TMA, pH 8.50

**T.C.3.:** 30% glicerol, 25 mM Tris, 2% SDS, pH 8.3

Se continuó la optimización aumentando la cantidad de Agarosa con el objetivo de disminuir el tamaño de poro, para ello se usó 1,25% de agarosa en el gel. El procedimiento seguido se indica en la tabla A.6.4. correspondiente al anexo A.

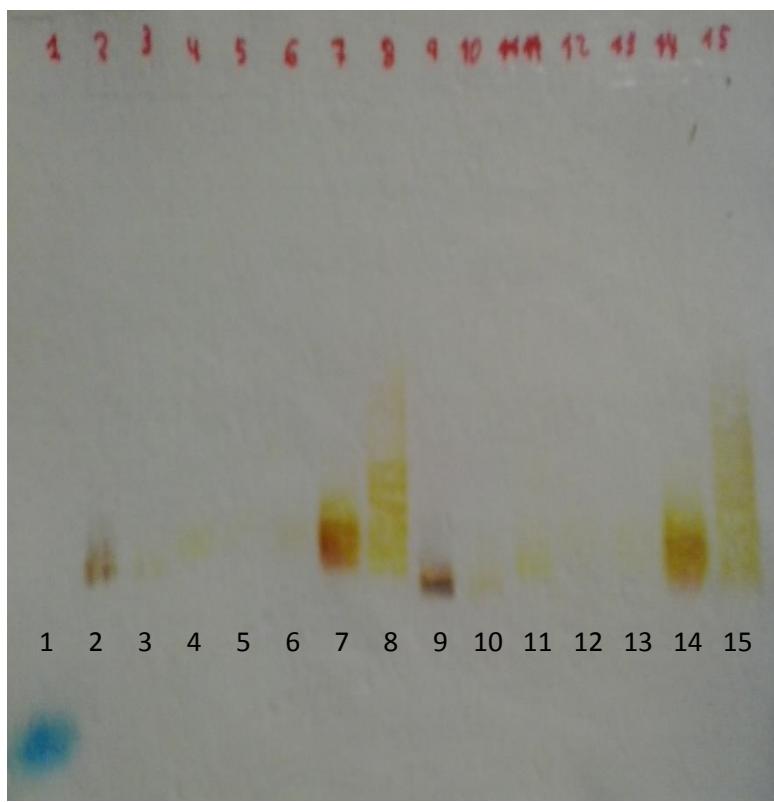
Se utilizan tres tampones de carga distintos: T.C.1 y T.C.2 con 0,05%TMA y distinta concentración de SDS y T.C.3 con 2%SDS y sin TMA. El resultado no fue satisfactorio para ningún tampón pero si se puede obtener alguna información de gran utilidad.

Las AgNPs patrón recubiertas de citratos aparecen bastante juntas y no se puede apreciar muy bien la separación entre ambas bandas. Sin embargo el patrón de 40 nm (carril 4) si que se queda por encima de los patrones de 10 y 20 nm. Por otro lado, el patrón de 10 nm (carriles 2 y 9) vuelve a aparecer en una banda más ancha que los patrones de 20 nm (carriles 3 y 10) y de 40 nm (carriles 4 y 11). Además se observa para la banda del patrón de 10 nm pequeñas bandas con diferente coloración lo que en la bibliografía<sup>21</sup> aplicando Espectroscopía de Extinción Local y TEM llevó a la conclusión de la presencia de distintas formas. Aunque no se ha realizado, la comprobación mediante Microscopía Electrónica permitiría conocer si el patrón de 10 nm utilizado presenta diferentes formas.

## ANEXOS B

Por otro lado, se observan diferencias en los carriles correspondientes a la muestra de Colargol para los tres tampones diferentes. Los dos carriles correspondientes a Colargol de  $1000 \text{ mgL}^{-1}$  con TMA en T.C.(carriles 7 y 14 (T.C.1 y T.C.2 respectivamente)) , mostraban bandas más estrechas que los carriles correspondientes a Colargol de  $1000 \text{ mgL}^{-1}$  sin TMA en T.C. (carriles 8 y 15 (T.C.3)) . Lo que hace indicar que las AgNPs en la muestra de Colargol también se ve influenciada por la presencia del TMA.

Figura B14. Gel obtenido con el método SDS-TMA-Tris-Glicina-AGE (1,5% AGE)



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

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

**T.C.2.:** 30% glicerol, 25 mM Tris, 2% SDS, 0.05% TMA, pH 8.50

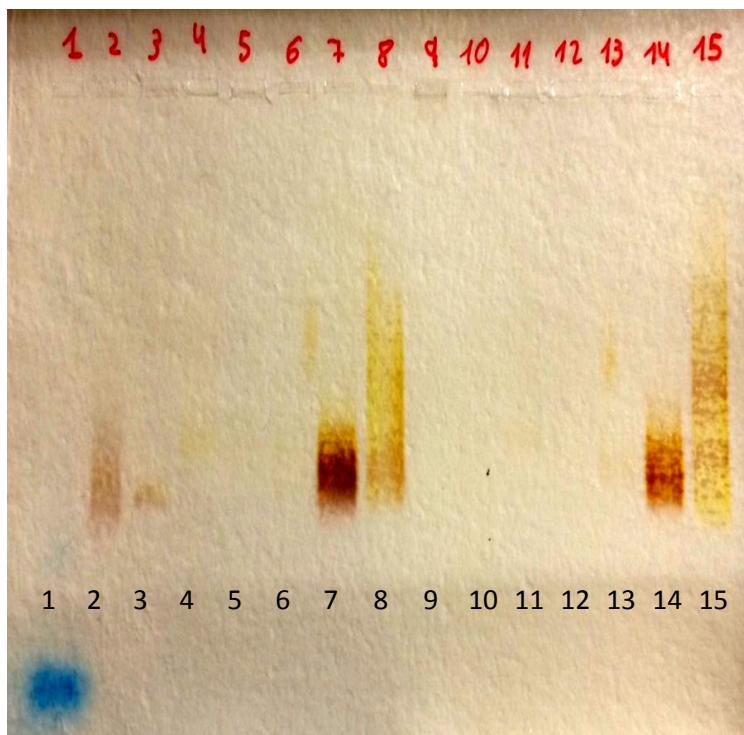
**T.C.3.:** 30% glicerol, 25 mM Tris, 2% SDS, pH 8.3

En la figura B14 se puede observar el resultado de la electroforesis con 1,5% de agarosa, el procedimiento seguido se indica en la tabla A.6.5. perteneciente al anexo A.

Parece que se mejora un poco la separación respecto a la electroforesis con 1,25% de agarosa en el gel. El patrón de 40 nm aparece por encima de los otros dos patrones (10 y 20 nm), pero la resolución sigue siendo bastante mala.

## ANEXOS B

Figura B15. Gel obtenido con el método SDS-TMA-Tris-Glicina-AGE (1,75%AGE)



1. *Blanco*
2. *Patrón AgNPs 10 nm (cit) T.C.1*
3. *Patrón AgNPs 20 nm (cit) T.C.1*
4. *Patrón AgNPs 40 nm (cit) T.C.1*
5. *Col 25 mgL⁻¹ T.C.1*
6. *Col 50 mgL⁻¹ T.C.1*
7. *Col 1000 mgL⁻¹ T.C.1*
8. *Col 1000 mgL⁻¹ T.C.3*
9. *Patrón AgNPs 10 nm (cit) T.C.2*
10. *Patrón AgNPs 20 nm (cit) T.C.2*
11. *Patrón AgNPs 40 nm (cit) T.C.2*
12. *Col 25 mgL⁻¹ T.C.2*
13. *Col 50 mgL⁻¹ T.C.2*
14. *Col 1000 mgL⁻¹ T.C.2*
15. *Col 1000 mgL⁻¹ T.C.3*

**T.C.1.:** 30% glicerol, 25 mM Tris, 1% SDS, 0,05% TMA, pH 8.40

**T.C.2.:** 30% glicerol, 25 mM Tris, 1% SDS, 0,3% TMA, pH 8,4

**T.C.3.:** 30% glicerol, 25 mM Tris, 2% SDS, pH 8.3

Debido a que los resultados obtenidos no mostraban ninguna mejora considerable en cuanto a resolución para los patrones de 10 y 20 nm se aumentó el porcentaje de agarosa hasta 1,75% (figura B15). Las condiciones del procedimiento se indican en la tabla A.6.6. correspondiente al anexo A.

Para realizar el análisis visual nos ayudaremos de los RFs (Factores de Retención) calculados. Los RFs fueron obtenidos como  $\frac{\text{máximo de intensidad de la banda}}{\text{distancia del blanco}}$ .

En la figura B15 se observa que la banda correspondiente a las AgNPs patrón de 10 nm (RF=0,66; carril 2) parece avanzar menos que la banda correspondiente al patrón de 20 nm (RF=0,68; carril 3). En cambio, si nos fijamos en la distancia máxima que recorre la banda (5,7 cm avanza el patrón de 10 nm y 5,3 cm el patrón de 20 nm) podríamos pensar que el patrón de 10 nm avanza más que el patrón de 20 nm. Esto es debido a que la banda correspondiente al patrón de 10 nm es muy ancha por lo que no se puede conseguir una separación total de las dos bandas (patrón de 10 y 20 nm). Sin embargo, las bandas correspondientes a los patrones de 20 nm (carril 2) y de 40 nm (carril 3) si que están resueltas totalmente y se observa que la separación entre las bandas (5,3 cm avanza el patrón de 20 nm con RF=0,68 y 4,7 cm el patrón de 40 nm con RF=0,60) es

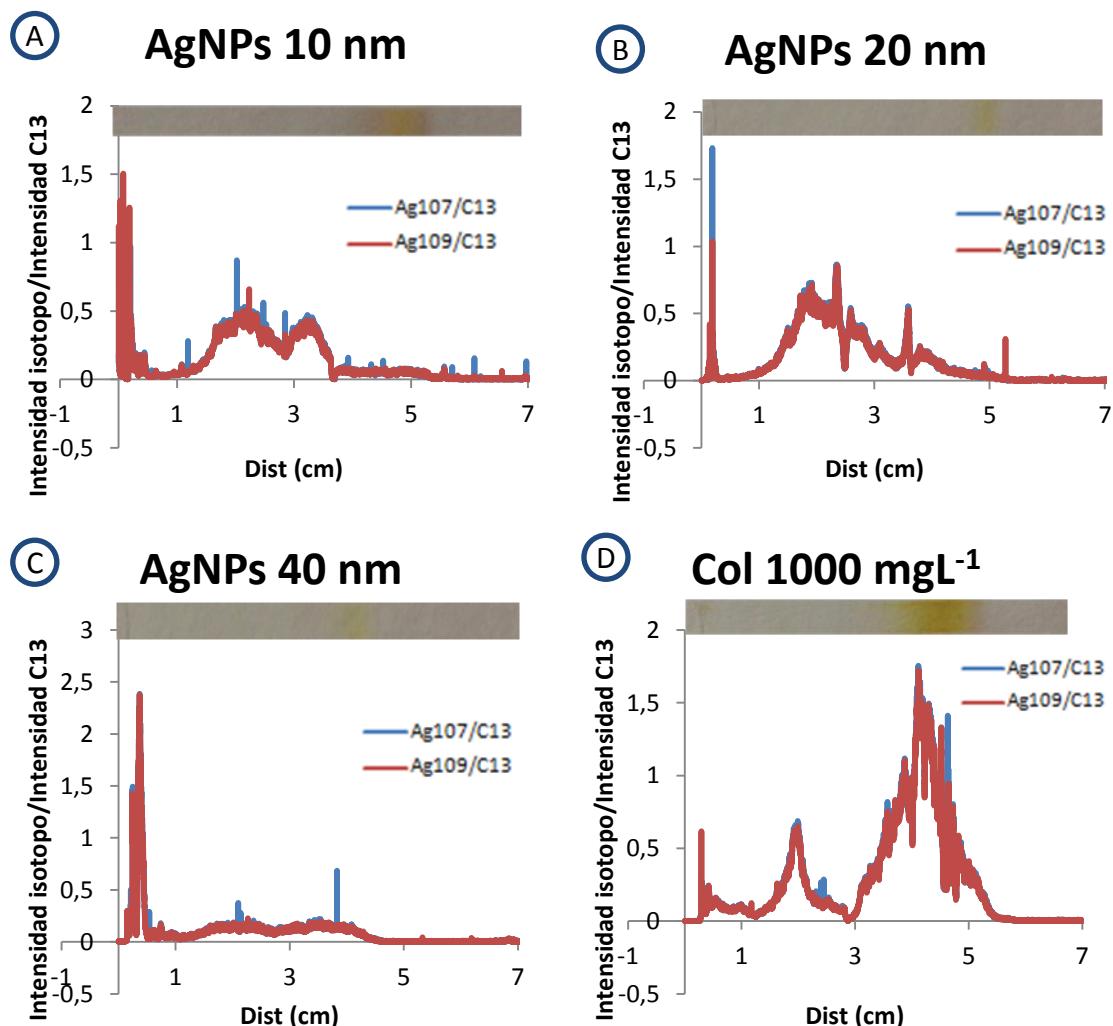
## ANEXOS B

mayor que para el gel de 1,5% de agarosa (5,1 cm y RF=0,68 para el patrón de 20 nm y 4,8 cm y RF=0,64 para el patrón de 40 nm en el gel de 1,5%AGE). Por otro lado, el ensanchamiento de la banda del carril correspondiente a las AgNPs patrón recubiertas de citratos de 10 nm es mayor con 1,75% de agarosa en el gel (1,2 cm) que con 1,5% (1 cm), mientras que el ensanchamiento de las bandas correspondientes a los patrones de 20 y 40 nm es a simple vista muy similar que el que se produjo con 1,5% de agarosa en el gel. Así, al disminuir el tamaño de poro por un lado conseguimos que las bandas correspondientes a las AgNPs más pequeñas avancen más y se queden por debajo de las bandas correspondientes a AgNPs más grandes, pero por otro lado el ensanchamiento de las bandas es mayor y esto impide que las bandas estén totalmente resueltas, sobre todo las bandas correspondientes a los patrones de 10 y 20 nm.

Por otro lado, el ensanchamiento para la muestra de Colargol es también mayor con 1,75% de agarosa en el gel (1 cm para la muestra de Colargol de  $1000 \text{ mgL}^{-1}$ ) que con 1,5% (0,8 cm para la muestra de Colargol de  $1000 \text{ mgL}^{-1}$ ), como se puede ver en los carriles 7 y 14 de las figuras B14 (1,5%AGE) y B15 (1,75% AGE).

## ANEXOS B

Figura B16. Electroferogramas obtenidos mediante LA-ICP-MS tras la separación por 2%AGE+1%SDS+25mMTris+192mMGli para los patrones de AgNPs y la muestra de Colargol. Patrón de 10 nm (A), patrón de 20 nm(B), patrón de 40 nm(C) y Colargol de 1000 mgL<sup>-1</sup> (D).

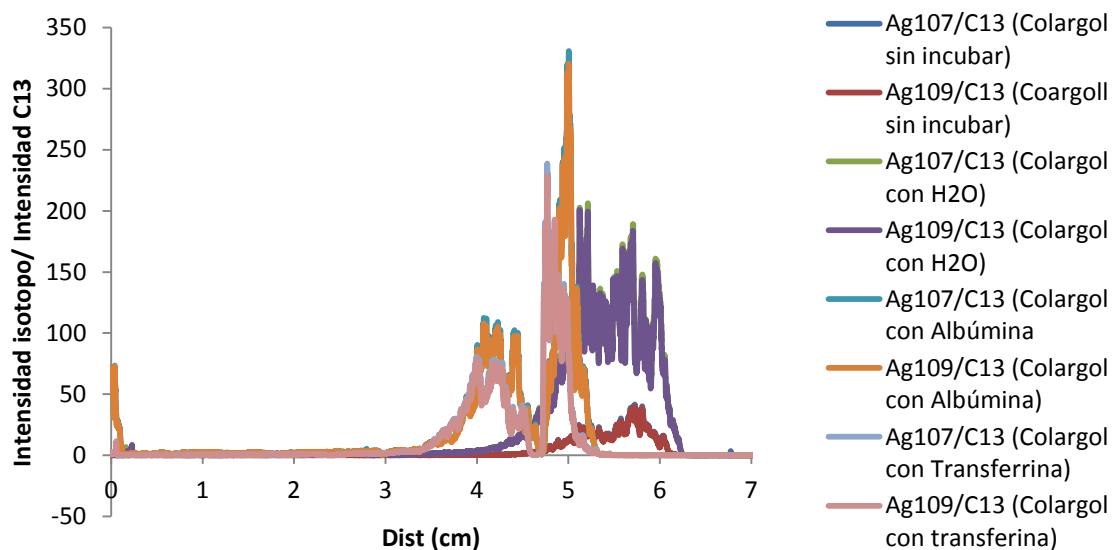


Como se puede observar en los electroferogramas obtenidos mediante LA-ICP-MS las AgNPs aparecen distribuidas a lo largo del gel. Además, en las muestras correspondientes a los patrones de AgNPs aparecen en los electroferogramas un pico al principio que no se corresponden con las bandas coloreadas observadas visualmente en el carril del gel y una banda cuyo fin si que se corresponde a la distancia a la que se observa la banda visualmente. En cambio, en la muestra de Colargol se observan varios picos, pero el pico más grande parece corresponder a la banda coloreada.

## ANEXOS B

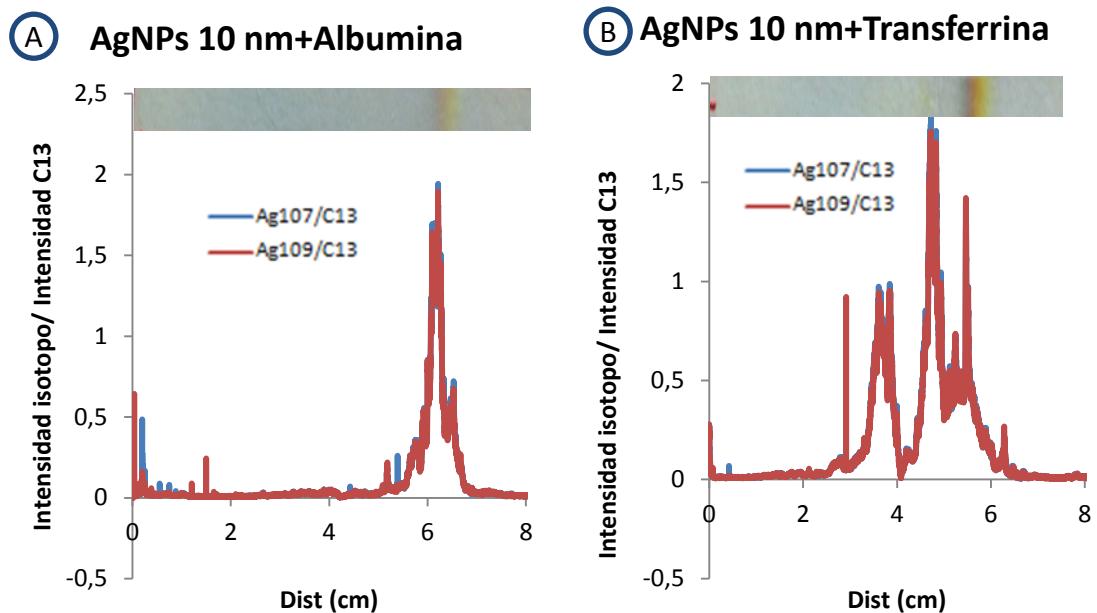
Figura B17. Electroferogramas obtenidos mediante LA-ICP-MS por superposición de las AgNPs en las muestras de Colargol tras las incubaciones. AgNPs en la muestra de Colargol sin incubar, AgNPs en la muestra de Colargol de incubado con  $H_2O$ , AgNPs en la muestra de Colargol incubado con Albúmina y AgNPs en la muestra de Colargol incubado con Transferrina.

### Colargol sin incubar, Colargol incubado con $H_2O$ , Colargol incubado con Albúmina y Colargol incubado con Transferrina



## ANEXOS B

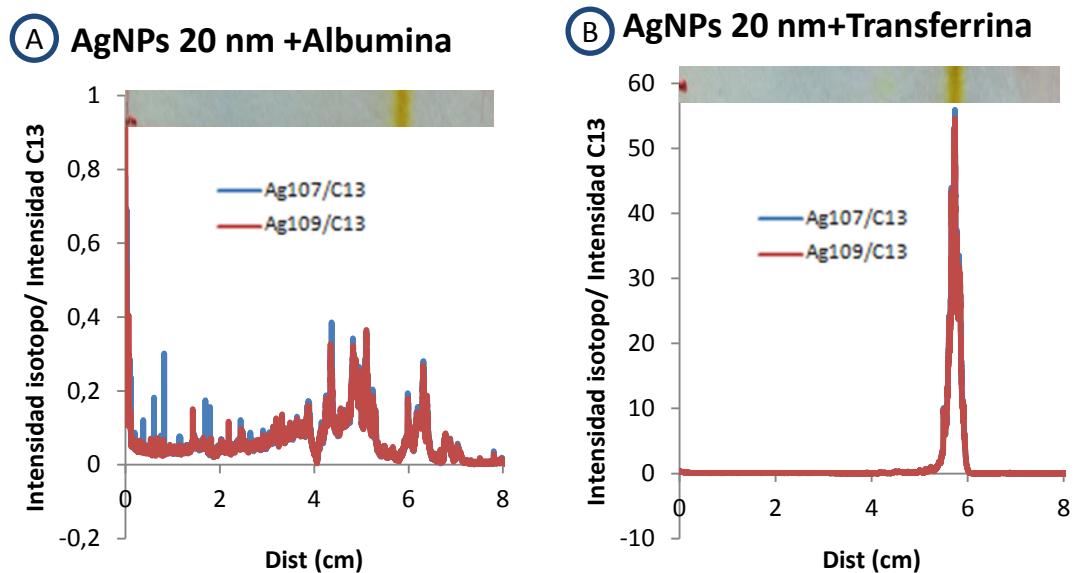
Figura B18. Electroferogramas obtenidos mediante LA-ICP-MS para el patrón de 10 nm tras la incubación con las proteínas. Patrón de 10 nm incubado con Albúmina (A) y patrón de 10 nm incubado con Transferrina (B).



En primer lugar, podemos confirmar que los picos en los electroferogramas corresponden con las bandas observadas visualmente. Además, podemos confirmar que las AgNPs en el patrón de 10 nm incubada con Albúmina avanza menos que las AgNPs de 10 nm incubadas con Transferrina, como ya se comentó anteriormente. Por otro lado, se puede observar que las AgNPs incubadas con Transferrina aparecen dos picos diferentes.

## ANEXOS B

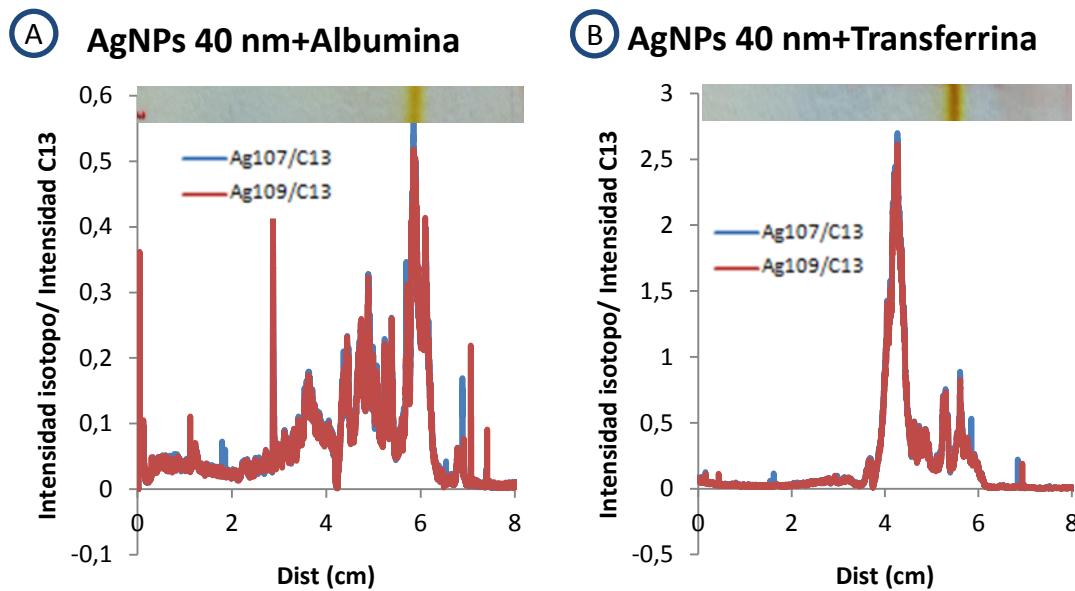
Figura B19. Electroferogramas obtenidos mediante LA-ICP-MS para el patrón de 20 nm tras la incubación con las proteínas. Patrón de 20 nm incubado con Albúmina (A) y patrón de 20 nm incubado con Transferrina (B).



En este caso, se observa que las AgNPs en el patrón de 20 nm incubadas con Albúmina aparecen distribuidas por el gel y el pico es muy poco uniforme y de muy poca intensidad. En cambio las AgNPs en el patrón de 20 nm incubadas con Transferrina aparecen en el electroferogramas como un pico muy estrecho y muy grande que corresponde a la banda observada visualmente.

## ANEXOS B

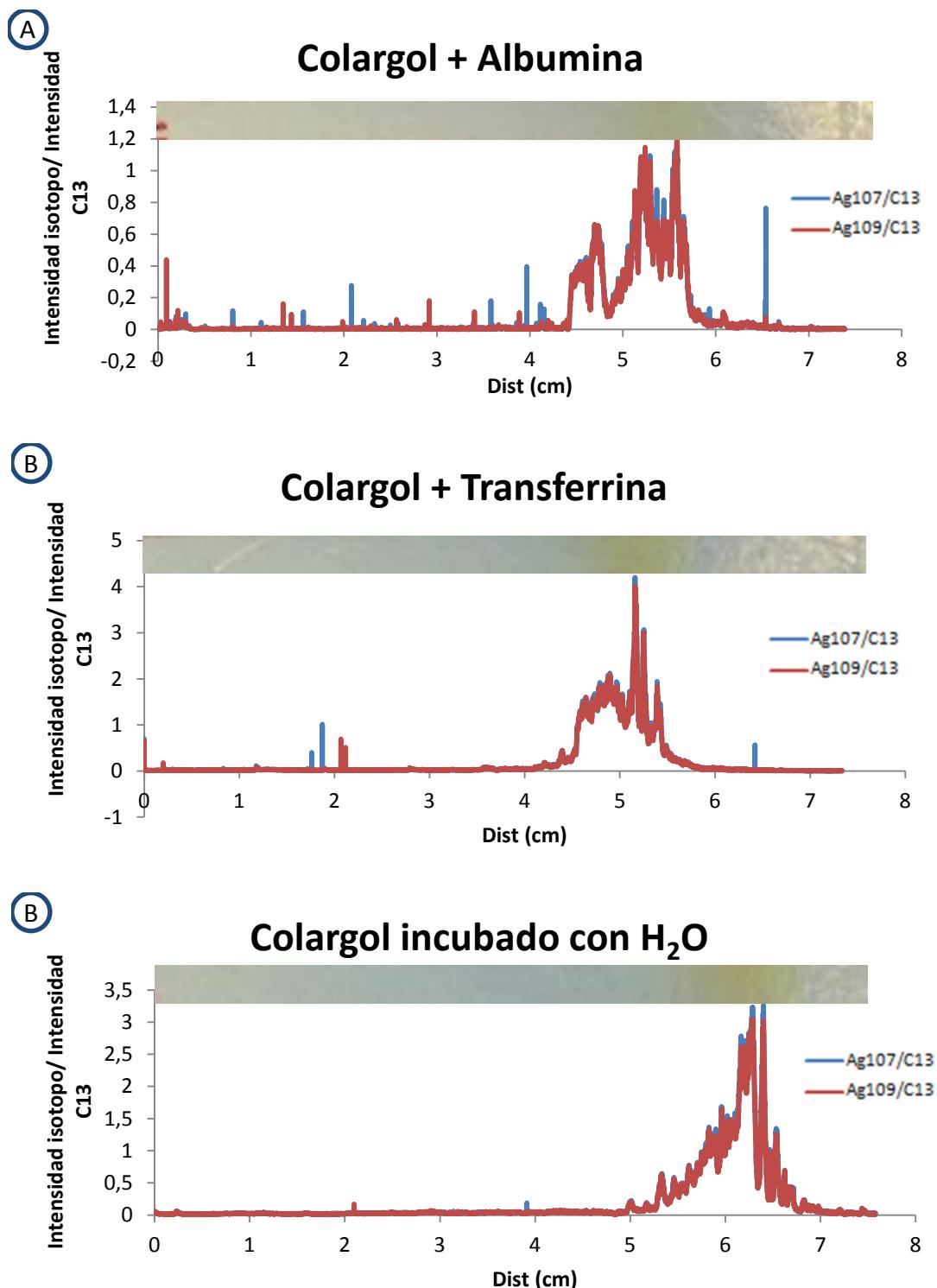
Figura B20. Electroferogramas obtenidos mediante LA-ICP-MS para el patrón de 40 nm tras la incubación con las proteínas. Patrón de 40 nm incubado con Albúmina (A) y patrón de 40 nm incubado con Transferrina (B).



Podemos observar que las AgNPs en el patrón de 40 nm incubado con Albúmina aparecen distribuidas por el gel pero mayoritariamente en un pico que puede corresponderse con la banda observada visualmente. En cambio las AgNPs en el patrón de 40 nm incubado con Transferrina aparecen dos picos, uno de gran tamaño pero que se encuentra muy atrás para corresponder a la banda del carril y otro más pequeño que si que puede corresponderse a la banda observada.

## ANEXOS B

Figura B21. Electroferogramas obtenidos mediante LA-ICP-MS para la muestra de Colargol tras la incubación con proteínas. Colargol incubado con Albúmina (A), Colargol incubado con Transferina (B) y Colargol incubado con  $\text{H}_2\text{O}$  (C).



Como se puede observar las AgNPs en las muestras de Colargol aparecen en picos más o menos uniformes y se mueven en función de su relación tamaño-carga. Las AgNPs

## ANEXOS B

incubadas con Albúmina se mueven más lentamente que las AgNPs incubadas con H<sub>2</sub>O y más rápidamente que las AgNPs incubadas con Transferrina. Por otro lado, las AgNPs incubadas con proteínas muestran unos picos menos uniformes que las que han sido incubadas con H<sub>2</sub>O. En los electroferogramas correspondientes a las AgNPs incubadas con proteínas aparece un pico que parece ser un doble pico que en el caso de la Albúmina llega casi hasta la línea base y en el caso de la Transferrina aparece un hombro un poco antes del pico más grande.

Tabla B1. RFs y RSD de los RFs de la electroforesis correspondiente a la figura 3.4.5.

Muestra	AgNPs 10 nm (carril 2)	AgNPs 10 nm (carril 9)	RSD (%) AgNPs 10 nm
RF	0,69	0,71	1,35%

Muestra	AgNPs 20 nm (carril 3)	AgNPs 20 nm (carril 10)	RSD (%) AgNPs 20 nm
RF	0,65	0,68	2,83%

Muestra	AgNPs 40 nm (carril 4)	AgNPs 40 nm (carril 11)	RSD (%) AgNPs 40 nm
RF	0,57	0,59	1,63%

Muestra	Col 1000 ppm (carril 8)	Col 1000 ppm (carril 15)	RSD (%) Col 1000 ppm
RF	0,68	0,69	1,37%

Se puede observar como las RSD de los RFs son relativamente pequeñas.

## ANEXOS C

### ANEXOS C.

Tabla C1. Factor de dilución, concentración de plata y % de plata liberada en los sobrenadantes.

Muestra	Factor de dilución	isotopo	Conc Ag+ ICP-MS ( $\mu\text{gL}^{-1}$ )	Conc Ag+ en sobrenadantes ( $\text{mgL}^{-1}$ )	% Ag+ liberada
<b>Alb</b>	0,0489	Ag107	2,084	0,04262	0,0043%
		Ag109	2,44	0,04990	0,0050%
<b>Trans</b>	0,04643	Ag107	1,767	0,03806	0,0038%
		Ag109	1,595	0,03435	0,0034%
<b>Alb Col 1</b>	0,04445	Ag107	3751	84,39	8,424%
		Ag109	3815	85,82	8,567%
<b>Alb Col 2</b>	0,04621	Ag107	3700	80,07	7,993%
		Ag109	3727	80,66	8,052%
<b>Alb Col 3</b>	0,04585	Ag107	3699	80,67	8,053%
		Ag109	3714	81,01	8,087%
<b>Trans Col 1</b>	0,04605	Ag107	4041	87,74	8,759%
		Ag109	4054	88,04	8,788%
<b>Trans Col 2</b>	0,04596	Ag107	4039	87,89	8,774%
		Ag109	4052	88,16	8,800%
<b>Trans Col 3</b>	0,04665	Ag107	3983	85,39	8,524%
		Ag109	4029	86,37	8,622%
<b>Col</b>	0,04672	Ag107	2610	55,86	5,577%
		Ag109	2628	56,24	5,615%