

ANEXOS

ANEXOS A: Procedimientos experimentales

SDS-TRIS-GLICINA-PAGE

Procedimiento A.1. Descripción del método de preparación de geles de poliacrilamida.

Se trata de un sistema vertical de electroforesis, se prepara primero el gel separador al 10% en bis acrilamida.. Se mezclan el agua, el tampón, la bis/acrilamida y el SDS, y se gasifica la disolución con N₂ durante 10 minutos. A continuación, se añaden el APS y el TEMED e inmediatamente, se vierte la mezcla en el molde hasta llenar ¾ partes de la altura de los cristales. Se cubre con agua ultrapura para evitar la formación de meniscos y se deja gelificar durante al menos media hora.

Una vez el gel separador ha polimerizado, se procede a preparar el gel concentrador al 4 % en bis acrilamida. La preparación es similar a la del gel separador. Se elimina el agua que cubre el gel separador con papel absorbente e inmediatamente, se vierte la mezcla en el molde. Se colocan los peines y se deja polimerizar.

En las tablas A.2. y A.3. del Anexo A se presentan las composiciones de los geles según el porcentaje de bis/acrilamida final que se deseé obtener.

Los geles resultantes tienen un grosor de 0,75 mm, un tamaño de unos 8 cm x 7 cm y 10 pocillos de muestra.

Las muestras de patrones de proteínas y de las incubaciones se mezclan con el tampón de carga en relación 1:1 y se calienta durante cinco minutos a 100 °C para desnaturalizar las proteínas.

Posteriormente se inyectan todas las muestras, incluido el patrón de proteínas de peso molecular conocido, en los correspondientes carriles del sistema de electroforesis, se vierte el tampón de electroforesis en la cubeta y se conecta el sistema a una fuente de alimentación. Durante los primeros diez minutos se mantiene una intensidad de 20 mA y posteriormente se aumenta a 30 mA hasta el final del proceso.

Tabla A.1. Composición de tampones y disoluciones empleadas en SDS-Tris-Glicina-PAGE.

Tampón del gel separador (4x)*	1,5M Tris-HCl pH 8,8
Tampón del gel concentrador (4x)*	0,5M Tris-HCl pH 6,8
Tampón de electroforesis	25mM Tris 192mM Glicina 0,1% (p/v) SDS pH 8,3
Tampón de carga	50 mM Tris-HCl pH 6,8 2,4% (p/v) SDS 20% (v/v) Glicerol. 5% (v/v) β-ME 0,02% (p/v) Azul de bromofenol

SDS 20%	20% (p/v) SDS
APS 10%	10% (p/v) APS

*(Nx) indica que la concentración de esta disolución es N veces mayor que la concentración final requerida en el proceso electroforético.

Tabla A.2. Composición gel separador en SDS- Tris-Glicina-PAGE.

%Bis/acrilamida gel separador	10%
Agua ultrapura (mL)	4,01
Tampón del gel separador 50(4x) (mL)	2,5
30% Bis/acrilamida (mL)	3,33
SDS 20% (μ L)	50
APS 10% (μ L)	100
TEMED (μ L)	5

Tabla A.3. Composición gel concentrador en SDS- Tris-Glicina-PAGE.

%Bis/acrilamida gel separador	4%
Agua ultrapura (mL)	6,04
Tampón del gel separador 50(4x) (mL)	2,5
30% Bis/acrilamida (mL)	1,33
SDS 20% (μ L)	50
APS 10% (μ L)	100
TEMED (μ L)	5

Tabla A.4. Tinción de Coomassie.

Disolución de tinción	25% (v/v) Metanol 10% (v/v) Ácido acético 0,1% (p/v) Coomassie®Brilliant Blue R-250	Toda la noche
Disolución de lavado	25% (v/v) Metanol	2 horas (renovaciones sucesivas)

Tabla A.5. Tinción con plata.

Disolución de fijación	30% (v/v) Etanol 10% (v/v) Ácido acético
Disolución de incubación	30% (v/v) Etanol 6,8% (p/v) Acetato de sodio 0,2% (p/v) Tiosulfato de sodio pentahidratado (se adiciona justo antes de usar la disolución)
Disolución de lavado	Agua ultra pura 0,2% (p/v) Nitrato de plata 20 µL formaldehído / 100 mL disolución (se adiciona justo antes de usar la disolución)
Disolución de procesado	2,5% (p/v) Carbonato de sodio anhidro 10 µL formaldehído / 100 mL disolución (se adiciona justo antes de usar la disolución)
Disolución de lavado	Agua ultrapura

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Procedimiento A.2. Descripción del método de preparación de geles de agarosa.

El procedimiento seguido para preparar el gel de agarosa consiste en mezclar las cantidades correspondientes de agarosa y de tampon de electroforesis en un erlenmeyer. En nuestro caso se usó un gel del 0,5 % de agarosa, por tanto, se pesó 0,45 gramos de agarosa y se disolvieron en 90 ml de tampon de electroforesis. En la Tabla A.6. del Anexo A se muestra la composición del tampon del electroforesis. A continuación se llevan hasta ebullición en un microondas para que se mezclen correctamente. La mezcla resultante se enfria lentamente a una temperatura entre 50 y 60 °C y se vierte sobre el sistema horizontal de electroforesis. Antes de que comience a gelificar se pone un peine para los pocillos y por último se deja enfriar durante 60 minutos.

También se deben de preparar las muestras a inyectar, los precipitados obtenidos en la incubación con proteínas para los patrones de NPs con distintos recubrimientos se disuelven en 40 µL de tampon de carga sin azul de bromofenol, La composición del tampon de carga se muestra en la Tabla A.7. del Anexo A. Además se introdujeron en dos pocillos una muestra de Collargol de distinta concentración (25 mg.L^{-1} y 1000 mg.L^{-1}) que se mezclo con el tampon de carga. Como blanco se introdujo agua Milli-Q mezclada con tampon de carga al que se le había añadido bromofenol para visualizar el avance de la electroforesis.

Se usó la muestra de Colargol como muestra de referencia ya que otro miembro del grupo está trabajando en la optimización del método electroforético para la

caracterización de dicha muestra y debido a su elevada concentración nos sirve como referencia visual.

Cuando el gel se encuentra totalmente gelificado se inyectan 20 µL en cada uno de los pocillos y se lleva a cabo la electroforesis a voltaje constante de 150 V.

Una vez que la electroforesis ha acabado, los geles se colocan sobre papel de filtro, se cubren con film y se sacan en el secador de geles durante 2 horas a 80 °C.

Tabla A.6. Composición del tampon de electroforesis empleado en la electroforesis en gel de agarosa.

Tampon de electroforesis	25mM Tris 192mM Glicina 1% (p/v) SDS
---------------------------------	--

Tabla A.7. Composición de tampones de carga empleado en la electroforesis en gel de agarosa.

Tampon de carga y azul de bromofenol	25 mM Tris-HCl pH 6,8 2% (p/v) SDS 30% (v/v) Glicerol. 0,3% (p/v) Azul de bromofenol, 75 mg
Tampon de carga	25 mM Tris-HCl pH 6,8 2% (p/v) SDS 30% (v/v) Glicerol.

MÉTODO ICP-MS

Tabla A.8. Condiciones instrumentales de ICP-MS

Potencia	1200 W
Caudal gas plasmógeno	13 L/min
Barridos	20
lecturas/barrido	1
réplicas	3
Dwell time	50 ms
Modo de adquisición	peak hopping
Modo del detector	Dual

MÉTODO LA-ICP-MS

Tabla A.9. Condiciones instrumentales de LA-ICP-MS

Fuente de luz	Ring
Energía del láser	80 % (9,6 J cm)
Frecuencia	20 Hz
Tamaño del orificio del láser	100 µm
Modo de disparo	Continuo, línea
Longitud de la línea	90000 µm
Velocidad de barrido	60 µm/s
Caudal de gas portados (Ar)	1 L/min

ANEXOS B

Método EAM-UV-Vis

Figura B.1. Recta de calibrado método Bradford

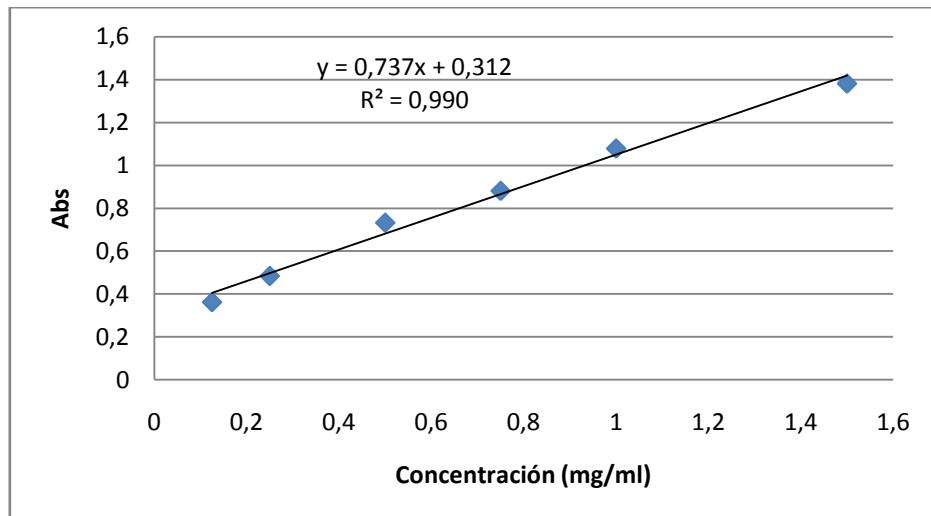


Tabla B.1. Concentraciones de proteínas en los sobrenadantes tras la incubación de AgNPs con albúmina y transferrina

(a) Albúmina

	Abs	[sobrenadante] (mg.L ⁻¹)	"proteína corona" (mg.L ⁻¹)	% PC	Media %	s	DER
Alb + AgNPcit	1,145	1131	225,5	16,62	16,33	1,522	9,321
	1,165	1157	199,1	14,68			
	1,135	1116	239,8	17,68			
Alb + AgNPpvp	1,012	949,7	406,5	29,97	25,36	5,996	23,65
	1,126	1104	252,0	18,58			
	1,036	983,0	373,2	27,52			
Alb + AgNPpeg	1,087	1051	304,8	22,48	23,21	5,035	21,69
	1,126	1104	252,1	18,59			
	1,026	968,6	387,6	28,58			
Albúmina pura	1,312	1356					

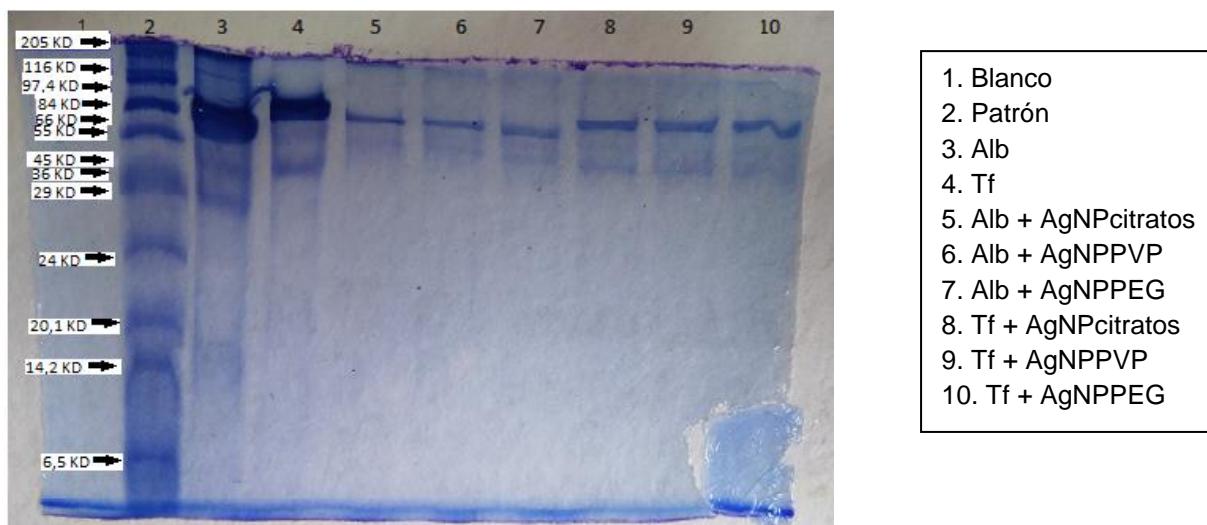
(b) Transferrina

	Abs	[sobrenadante] (mg.L ⁻¹)	"proteína corona" (mg.L ⁻¹)	% PC	Media %	s	DER
Tf + AgNPcit	0,6571	849,3	403,9	32,23	32,54	0,6713	2,063
	0,6585	851,1	402,1	32,08			
	0,6471	835,7	417,5	33,31			
Tf + AgNPPVP	0,6798	880,0	373,2	29,78	30,89	1,423	4,608
	0,6547	846,0	407,2	32,49			
	0,6741	872,3	380,8	30,39			
Tf + AgNPpeg	0,6391	824,8	428,4	34,19	34,82	0,7313	2,100
	0,6347	818,9	434,3	34,66			
	0,6258	806,8	446,4	35,62			
Transferrina pura	0,9548	1253					

Método SDS-TRIS-GLICINA-PAGE

Figura B.2. SDS-Tris-Glicina-PAGE.

(a) Tinción de Azul de Coomassie



(b) Tinción de plata



Método LA-ICP-MS

Figura B.3. Detección de Ag en el gel para Colargol (1000 mg.L^{-1}) por LA-ICP-MS tras la separación mediante electroforesis en gel de agarosa.

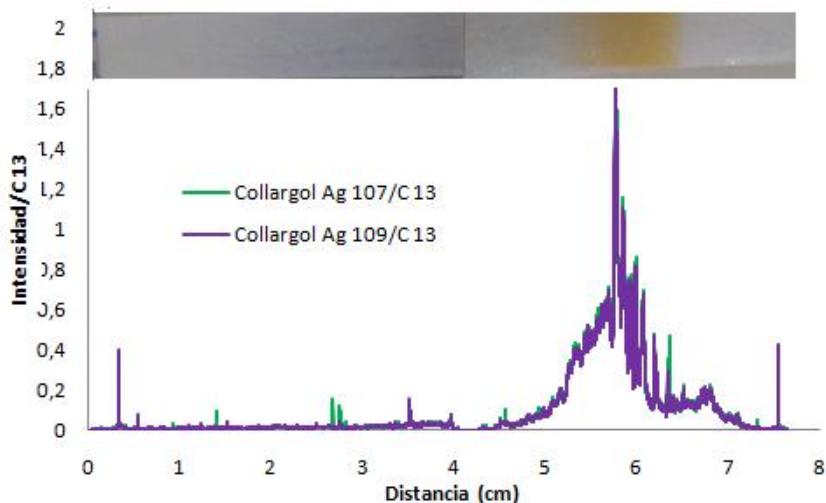


Figura B.4. Detección de Ag en el gel para AgNP citratos por LA-ICP-MS tras la separación mediante electroforesis en gel de agarosa.

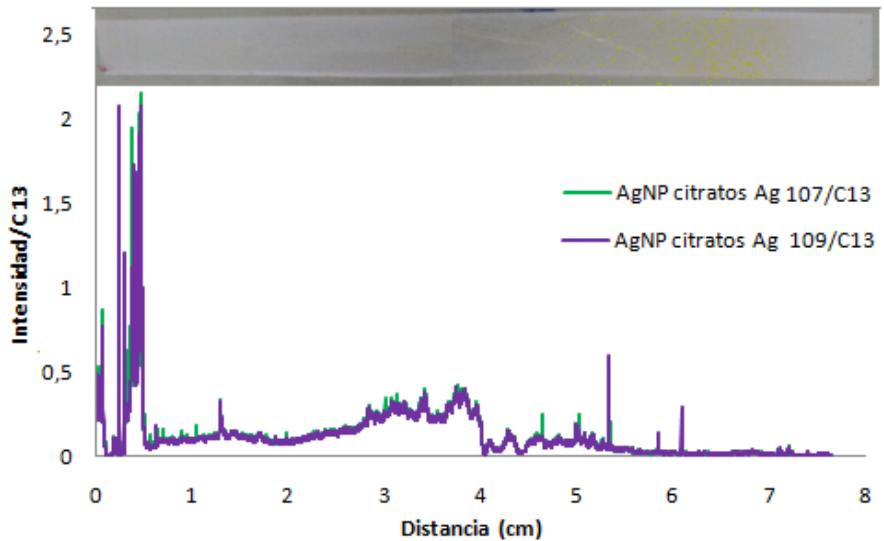


Figura B.5. Detección de Ag en el gel para AgNP citratos incubadas con albúmina por LA-ICP-MS tras la separación mediante electroforesis en gel de agarosa.

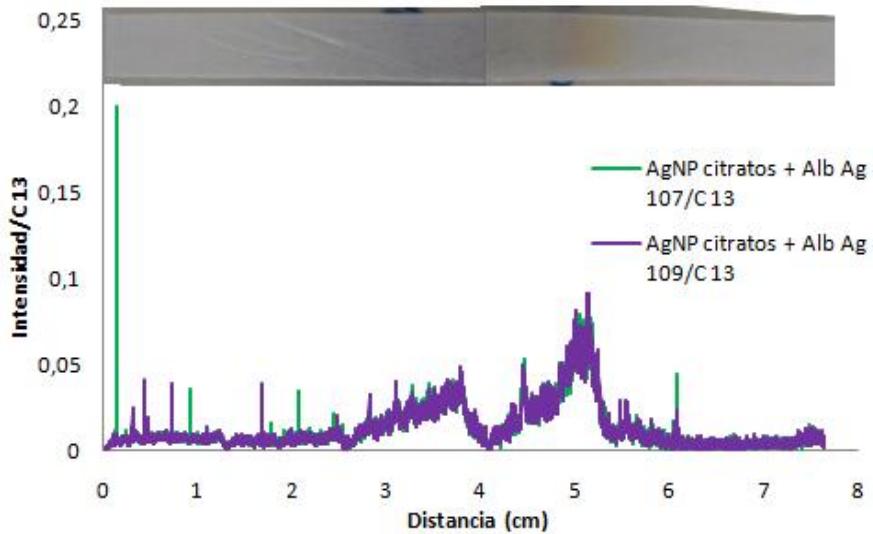


Figura B.6. Detección de Ag en el gel para AgNP citratos incubadas con transferrina por LA-ICP-MS tras la separación mediante electroforesis en gel de agarosa.

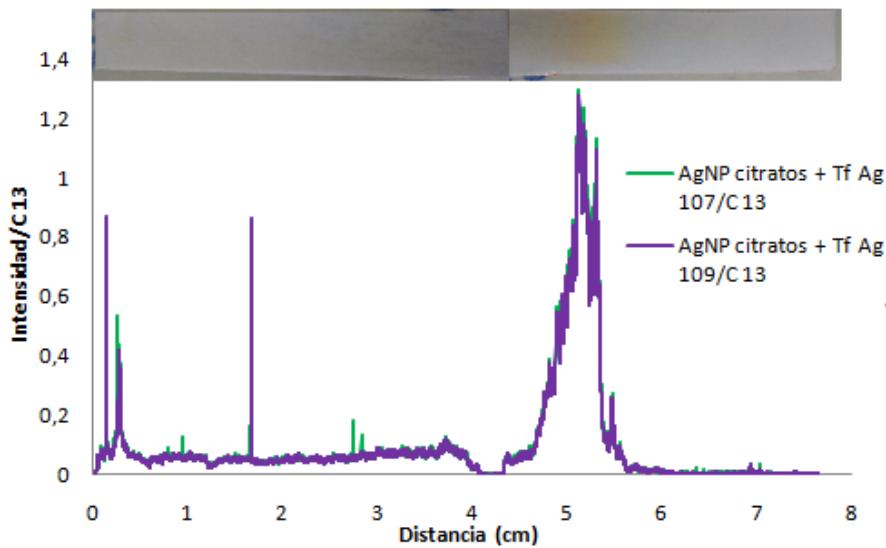


Figura B.7. Detección de Ag en el gel para AgNP PVP por LA-ICP-MS tras la separación mediante electroforesis en gel de agarosa.

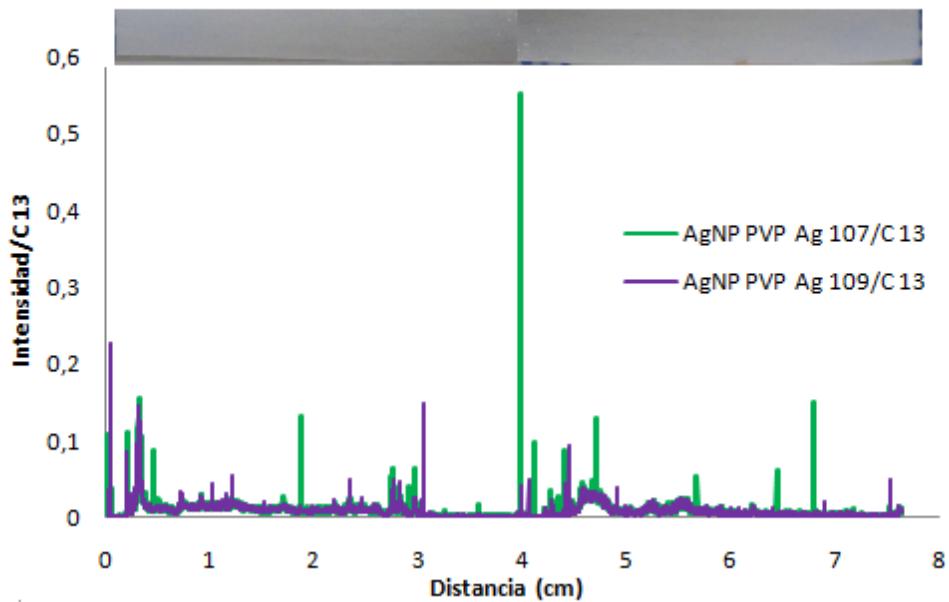


Figura B.8. Detección de Ag en el gel para AgNP PVP incubadas con albúmina por LA-ICP-MS tras la separación mediante electroforesis en gel de agarosa.

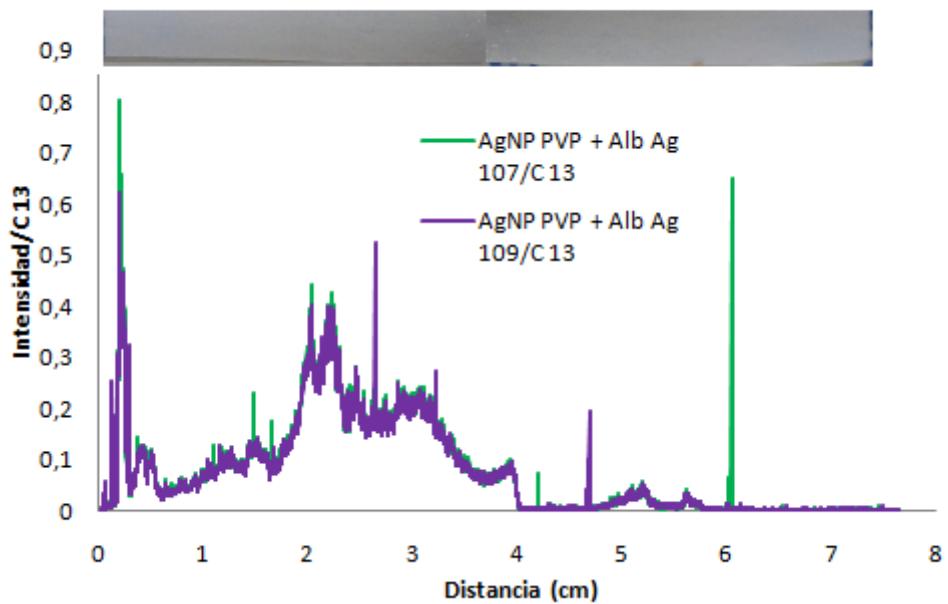


Figura B.9. Detección de Ag en el gel para AgNP PVP incubadas con transferrina por LA-ICP-MS tras la separación mediante electroforesis en gel de agarosa.

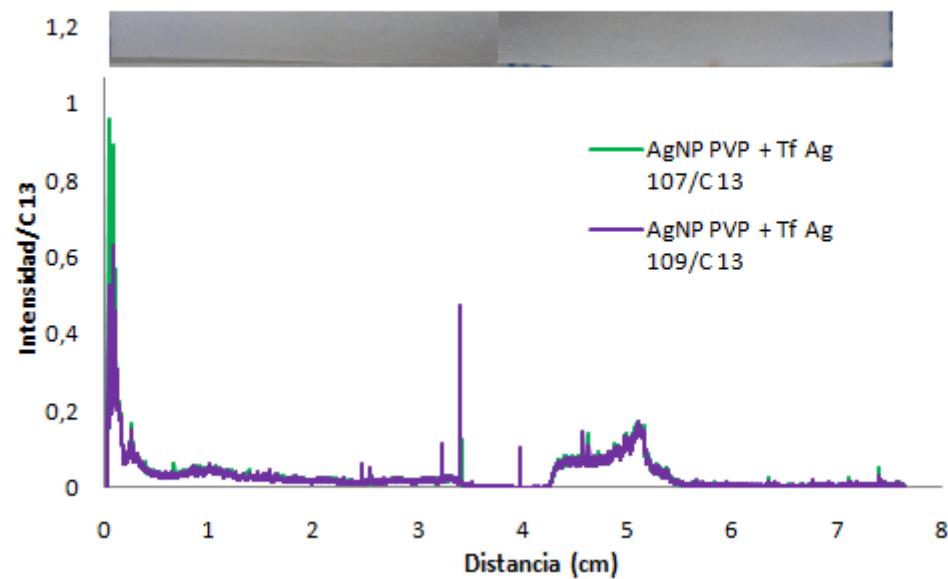


Figura B.10. Detección de Ag en el gel para AgNP PEG por LA-ICP-MS tras la separación mediante electroforesis en gel de agarosa.

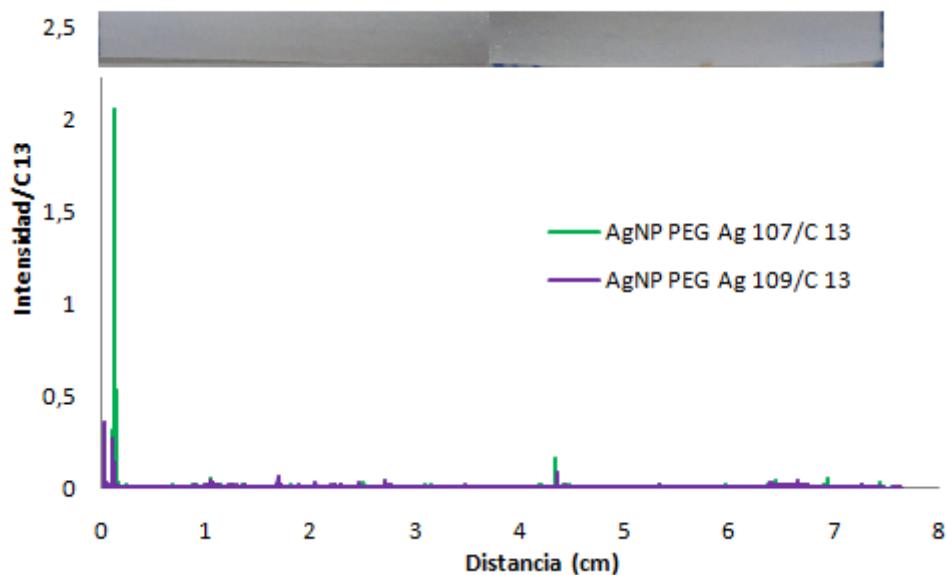
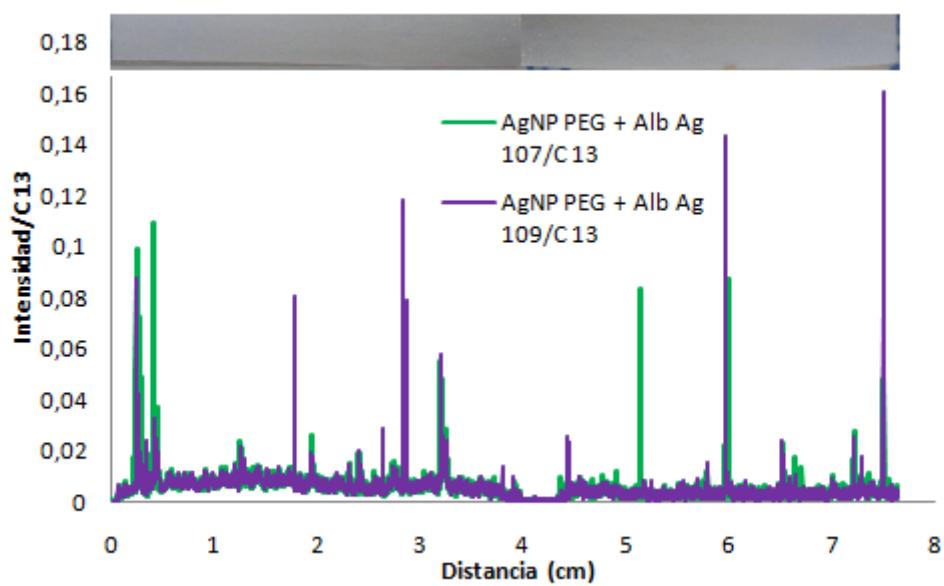


Figura B.11. Detección de Ag en el gel para AgNP PEG incubadas con albúmina por LA-ICP-MS tras la separación mediante electroforesis em gel de agarosa.



Método ICP-MS

Tabla B.2. Concentraciones de Ag obtenidas en los sobrenadantes tras la incubación de las AgNPs con distintos recubrimientos con albúmina y transferrina. Se incluyen también los sobrenadantes de incubar las proteínas y las NPs solas con agua milli Q. Se ha usado la recta de calibración ponderada sin patrón interno.

Muestra	[Ag 107] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Media [Ag 107] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	s ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	[Ag 109] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Media [Ag 107] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	s ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Albúmina	28,25	-	-	28,23	-	-
Transferrina	10,01	-	-	11,10	-	-
AgNPs citratos	247,9	-	-	269,0	-	-
AgNPs PVP	328,1	-	-	371,8	-	-
AgNPs PEG	240,3	-	-	352,8	-	-
Alb + AgNPs citratos	5831	5522	638,4	5804	5513	619,0
	4788			4802		
	5947			5933		
Alb + AgNPs PVP	3686	3627	203,3	3671	3600	198,8
	3794			3754		
	3400			3375		
Alb + AgNPs PEG	3740	3923	164,3	3701	3897	171,6
	3973			3976		
	4057			4016		
Tf + AgNPs citratos	5007	4715	258,5	4977	4709	240,8
	4514			4509		
	4625			4643		
Tf + AgNPs PVP	1521	1604	336,0	1508	1594	338,7
	1317			1307		
	1973			1968		
Tf + AgNPs PEG	848,6	887,0	54,33	844,8	885,8	57,90
	925,4			926,7		
	-			-		

Tabla B.3. Concentraciones de Ag obtenidas en los sobrenadantes tras la incubación de las AgNPs con distintos recubrimientos con albúmina y transferrina. Se incluyen también los sobrenadantes de incubar las proteínas y las NPs solas con agua milli Q. Se ha usado la recta de calibración ponderada con patrón interno.

Muestra	[Ag 107] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Media [Ag 107] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	s ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	[Ag 109] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Media [Ag 107] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	s ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Albúmina	26,76	-	-	26,74	-	-
Transferrina	8,951	-	-	10,07	-	-
AgNPs citratos	261,8	-	-	283,7	-	-
AgNPs PVP	352,9	-	-	399,3	-	-
AgNPs PEG	257,3	-	-	377,7	-	-
Alb + AgNPs citratos	6181	5688	709,7	6140	5668	687,0
	4874			4880		
	6008			5983		
Alb + AgNPs PVP	3802	3719	204,8	3779	3685	201,1
	3870			3821		
	3486			3454		
Alb + AgNPs PEG	3849	3980	137,8	3802	3946	137,0
	3967			3963		
	4124			4074		
Tf + AgNPs citratos	5066	4826	218,2	5026	4811	201,8
	4639			4626		
	4773			4783		
Tf + AgNPs PVP	1569	1666	380,4	1553	1653	382,5
	1343			1330		
	2085			2075		
Tf + AgNPs PEG	-	904,8	145,6	-	902,1	148,9
	801,8			796,8		
	1008			1007		

Tabla B.4. Porcentaje de Ag (I) liberada en los sobrenadantes. Sin patrón interno.

Muestra	% Ag 107	Intervalo de confianza 95%	% Ag 109	Intervalo de confianza 95%
Albúmina	0,1412	-	0,1412	-
Transferrina	0,05005	-	0,05548	-
AgNPs citratos	1,239	-	1,345	-
AgNPs PVP	1,640	-	1,859	-
AgNPs PEG	1,201	-	1,764	-
Alb + AgNPs citratos	27,61	± 4,336	27,57	± 4,205
Alb + AgNPs PVP	18,13	± 1,381	18,00	± 1,351
Alb + AgNPs PEG	19,62	± 1,116	19,49	± 1,166
Tf + AgNPs citratos	23,58	± 1,756	23,55	± 1,636
Tf + AgNPs PVP	8,019	± 2,282	7,972	± 2,301
Tf + AgNPs PEG	4,435	± 0,369	4,429	± 0,3933