

Trabajo de fin de grado

Estudio de asociaciones de nanopartículas de plata con medios biológicos mediante electroforesis en gel y detección por Ablación Láser-ICP-MS

VERÓNICA MORA SANZ



**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 de Química Analítica

Laboratorios de GEAS

Zaragoza, Septiembre 2015

ÍNDICE

Abreviaturas

Resumen

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 NANOMATERIALES Y NANOPARTÍCULAS: AgNPs	1
1.2 NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y PROTEÍNAS CORONA.....	1
1.3 CARACTERIZACIÓN DE PC MEDIANTE EAM-UV-VIS.....	2
1.4 TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE AgNPs y PC	3
1.5 LA-ICP-MS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE AgNPs y PC.....	3
2. OBJETIVOS	4
3. EXPERIMENTAL.....	5
3.1. INSTRUMENTACIÓN, APARATOS Y MATERIALES.....	5
3.1.1. Instrumentación.....	5
3.1.2. Aparatos.....	5
3.1.3. Materiales.....	5
3.2. REACTIVOS, MUESTRAS Y DISOLUCIONES PATRÓN.....	6
3.2.1. Reactivos.....	6
3.2.2. Muestras.....	7
3.2.3. Disoluciones patrón.....	7
3.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.....	8
3.3.1. Método de incubación.....	8
3.3.2. Métodos EAM-UV-Vis.....	9

3.3.2.1. Caracterización de PC mediante EAM-UV-VIS	9
3.3.2.2. Método Bradford.....	10
3.3.3. Métodos electroforéticos.....	10
3.3.3.1 SDS-Tris-Glicina-PAGE.....	10
3.3.3.2 Electroforesis en gel de agarosa.....	11
3.3.4. Determinación de Ag (I) liberada tras la incubación de AgNPs con distintos recubrimientos con proteínas por ICP-MS.....	11
3.3.5 Método LA-ICP-MS.....	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
4.1 Caracterización de PC tras la incubación de AgNPs con distintos recubrimientos con proteínas por EAM-UV-Vis	13
4.2 Caracterización de PC tras la incubación de AgNPs con distintos recubrimientos con proteínas por SDS-PAGE	16
4.3 Caracterización de PC tras la incubación de AgNPs con distintos recubrimientos con proteínas por AGE y detección por LA-ICP-MS	16
4.4 Determinación de Ag (I) liberada tras la incubación de AgNPs con distintos recubrimientos con proteínas por ICP-MS.....	19
5. CONCLUSIONES.....	23
6. BIBLIOGRAFÍA.....	24
7. ANEXOS	

ABREVIATURAS

AGE	Gel de agarosa
AgNPs	Nanopartículas de plata
AgNP citratos	Nanopartículas de plata recubiertas de citratos
AgNP PEG	Nanopartículas de plata recubiertas de PEG
AgNP PVP	Nanopartículas de plata recubiertas de PVP
Alb	Albúmina
APS	Persulfato de amonio
EAM	Espectroscopía de Absorción Molecular
GE	Electroforesis en gel
ICP-MS	Plasma de acoplamiento inductivo - Espectrometría de masas
LA	Ablación Láser
PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
PC	Proteína Corona
PEG	Polietilenglicol
PM	Peso Molecular
PVP	Polivinilpirrolidona
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina
Tf	Transferrina
UV-vis	Ultravioleta - Visible

RESUMEN

Cuando las nanopartículas de plata (AgNPs) entran en contacto con un fluido biológico tienden a unirse a moléculas presentes en el medio, en concreto, al entrar en contacto con la sangre se unen a proteínas, formando proteínas corona (PC). En este trabajo se quiere estudiar cómo afecta la funcionalización de las AgNPs en su afinidad para adsorberse a proteínas mayoritarias del plasma sanguíneo. En el presente trabajo se han usado tres tipos de AgNPs con distintos recubrimientos: citratos, polivinilpirrolidona (PVP) y polietilenglicol (PEG). Las proteínas utilizadas han sido albúmina de suero bovino y transferrina humana por ser las más abundantes en el plasma sanguíneo. Se realizaron incubaciones de AgNPs con proteínas, a un pH de 7,4 que es al que se encuentra la sangre y a 37 °C para simular la temperatura a la que se encuentra el cuerpo humano. Para llevar a cabo el estudio se han usado distintas técnicas, en primer lugar se ha usado la espectrometría de absorción molecular ultravioleta - visible (EAM-UV-Vis) y la electroforesis en gel de poliácridamida (PAGE) para evaluar cualitativamente si se formaban PC. Tras comprobar que sí se formaban PC, se llevo a cabo el método Bradford, también haciendo uso de la EAM-UV-Vis, para cuantificar el porcentaje de AgNPs que pasaban a formar parte de PC. También se realizaron electroforesis en gel de agarosa (AGE) y posteriormente las AgNPs y PC separadas en el gel se detectaron mediante ablación láser e ICP-MS. Por último se evaluó el porcentaje de Ag⁰ presente en las NPs que pasa a formar Ag (I) en presencia de las proteínas mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS).

SUMMARY

When silver nanoparticles (AgNPs) come into contact with a biological fluid they tend to join the molecules present in the environment, specifically, when they come into contact with blood they join proteins, creating protein corona (PC). The purpose of this dissertation is to study how the functionalization of the AgNPs affects its affinity to absorb into mainly blood plasma proteins. Three different types of AgNPs with different surface functionalization have been used in the present investigation: citrates, *polyvinylpyrrolidone* (PVP) y *polyethylene glycol* (PEG). The proteins used have been *bovine serum albumin* and *human transferrin*, since they are the most abundant in blood plasma. Incubations of AgNPs with proteins were made, using a pH of 7,4, which is the one present in blood, at 37°C to simulate human body temperature. To carry out this investigation, different techniques were used; first, UV-vis molecular absorption spectrometry (EAM-UV-Vis) and *polyacrylamide gel electrophoresis* (PAGE) to evaluate qualitatively if PC were formed. After verifying that PC were formed indeed, Bradford method was applied, using also EAM-UV-Vis, to quantify the percentage of AgNPs that became part of the PC. *Agarose gel electrophoresis* (AGE) was also applied and subsequently the AgNPs and PC separated in gel were detected through *laser ablation* and ICP-MS. To end up, the percentage of Ag (0) present in the NPs that became Ag (I) in presence of proteins was evaluated by *inductively coupled plasma mass spectrometry* (ICP-MS).

1. INTRODUCCIÓN

1.1. NANOMATERIALES Y NANOPARTÍCULAS: AgNPs

Actualmente una de las áreas más innovadoras en el campo científico y tecnológico es la de la nanotecnología y los nanomateriales.

Se 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. En casos específicos y cuando se justifique por preocupaciones de medio ambiente, salud, seguridad o competitividad, el umbral de la granulometría numérica del 50 % puede sustituirse por un umbral comprendido entre el 1 % y el 50 % [1].

Los nanomateriales sintéticos se pueden dividir en dos grupos: orgánicos e inorgánicos. Algunos ejemplos de nanomateriales sintéticos orgánicos son nanotubos de carbono o los fullerenos. Las nanopartículas de metales funcionalizadas con distintos recubrimientos, son nanomateriales sintéticos inorgánicos, de entre ellas las más usadas son las de plata, aproximadamente el 30 % de los productos registrados en bases de datos de nanoprodutos aseguran contener nanopartículas de plata (AgNPs) [2].

Las AgNPs se están usando cada vez más con fines médicos debido a su actividad antibacteriana y antifúngica, también se usan en la industria textil, tratamiento de aguas y para la conservación de alimentos en conserva [3].

Dado a la exposición que tienen los humanos a las AgNPs es importante que se encuentren perfectamente caracterizadas. Estudios in vitro han demostrado que la exposición a AgNPs pueden causar daño mitocondrial, producen especies reactivas de oxígeno, apoptosis y citotoxicidad [4].

Las suspensiones de AgNPs contienen al menos dos formas distintas de plata: Ag^0 y $Ag(I)$ (libre o acomplejada). La liberación de $Ag(I)$ por parte de las NPs en suspensiones acuosas se produce debido a distintos procesos de oxidación [5]. La producción de $Ag(I)$ puede incrementar los efectos tóxicos de las AgNPs [6], aunque todavía no se sabe si la toxicidad de las nanopartículas de plata es debida solo a la plata iónica si las NPs también muestran efecto tóxico por sí mismas [7].

1.2. NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y PROTEÍNAS CORONA

Se encuentra actualmente aceptado que las NPs se cubren con proteínas cuando entran a un medio biológico, también se unen a lípidos pero en menor medida.

Existen diversas vías por las que las NPs pueden entrar en cuerpo humano [8]. Tras la administración intravenosa lo primero que ve la NP es la sangre. El plasma sanguíneo contiene más de 3700 proteína distintas, en cuanto la NP entran en la sangre se

produce una competición de las proteínas por adsorberse en la superficie de la NP. En primer lugar se adsorben las proteínas más abundantes pero al pasar el tiempo estas se reemplazan por proteínas más afines (efecto Vroman's). Esta competición de las proteínas por adsorberse a la NP hace que la composición de la PC sea dinámica y que varíe con el tiempo.

La composición de las PC dependen de distintos factores como las propiedades químico-físicas de las NPs (tamaño, forma, grupos funcionales de la superficie...), la naturaleza del ambiente en que se encuentran y el tiempo de exposición.

Los distintos recubrimientos con los que puede estar funcionalizada un AgNP determinan algunas de las propiedades químico-físicas como la carga superficial y su hidrofobicidad/hidrofilia.

Al incrementar la carga superficial de las NPs la adsorción de proteínas aumenta. Las NPs cargadas positivamente presentan mayor afinidad por proteínas cuyo punto isoeléctrico (pI) es superior a 5,5 como la albúmina o la transferrina, mientras que la que están cargadas negativamente se unen con mayor facilidad a aquellas que poseen un pI inferior a 5,5 como la inmunoglobulinas.

La hidrofobicidad afecta tanto a la cantidad de proteína adsorbida como a su composición. Los recubrimientos más hidrófobos tienden a adsorber más proteínas y a desnaturalizarlas que las superficies neutras o hidrofílicas.

1.3. CARACTERIZACIÓN DE PC MEDIANTE EAM-UV-VIS

Las nanopartículas metálicas absorben en rangos concretos de la zona del visible, las nanopartículas de plata son amarillas y absorben en el rango de 390-410 nm.

La absorbancia en el rango del visible de estas NPs es debida a la resonancia del plasmón superficial. El plasmón superficial es un suceso de naturaleza cuántica que es consecuencia directa del pequeño tamaño de las NPs y de la elevada relación superficie/volumen.

En un gas en estado de plasma, los portadores de carga libre interaccionan con la radiación electromagnética de baja frecuencia oscilando con ella, produciéndose un fenómeno vibratorio conocido como plasmón. Los electrones de la superficie de las NPs son también capaces de interactuar con la radiación electromagnética de una forma muy compleja, muy dependiente de la forma, tamaño o funcionalización de las NPs [9].

La unión de proteínas a NPs hace que el espectro de absorción de las NPs cambie. Por lo que el uso de la EAM-UV-Vis para analizar la unión de la NP con la proteína es un método adecuado para evaluar cualitativamente si se forman PC. Comparado con otros métodos la EAM-UV-Vis es más rápida, más flexible y menos complicada que otros métodos pero sólo nos proporciona información a nivel cualitativo [10].

1.4. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE AgNPs y PC

La electroforesis es una técnica de separación en la que las sustancias a analizar se separan en función de su movilidad, en sentido y velocidad, bajo la acción de un campo eléctrico. Con el uso de técnicas electroforéticas se pueden conseguir separar aniones y cationes inorgánicos, aminoácidos, ácidos nucleicos y también proteínas, nanopartículas o proteínas corona.

La aplicación de las técnicas electroforéticas a la caracterización de nanomateriales nos da información sobre su estado de aglomeración, su carga superficial, su recubrimiento, su tamaño y distribución de tamaños y también de su forma.

La electroforesis PAGE separa mezclas complejas de proteínas en función de su tamaño y carga en presencia de un campo eléctrico. El tamaño de poro es demasiado pequeño para que las NPs lo puedan atravesar por lo que en el caso de las PC sólo se verán las proteínas. Es un técnica barata, rápida y un método fiable, pero no se puede usar como método cuantitativo y su sensibilidad es baja [11].

La electroforesis PAGE se ha utilizado ampliamente [12] para la caracterización de PC en la bibliografía. Así se han estudiado como afectan diversos parámetros a la formación de proteínas corona: tiempo de incubación [13], tipo de NPs [13], tamaño y forma de NPs [13], concentración de NPs [13], tipo de funcionalización o recubrimiento [14] y concentración de medio biológico [15].

La electroforesis AGE es una técnica electroforética no desnaturizante, con ella sí que podremos separar las PC sin separarlas de las NPs ya que el tamaño de poro es lo suficientemente grande para que las AgNPs lo puedan atravesar.

1.5 LA-ICP-MS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE AgNPs y PC

El uso de la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo acoplado a un sistema de ablación láser como introducción de muestra (LA-ICPS-MS) ha cobrado significativa importancia en los últimos diez años y ha sido ampliamente usada para el análisis de muestras biológicas. Permite la determinación de elementos e isótopos en muestras biológicas con una resolución espacial que varía de 10 a 100 mm. Posee una muy buena sensibilidad [16].

Además LA-ICP-MS constituye una potente técnica para la determinación de metales unidos a proteínas [17, 18].

Las proteínas son separadas previamente por técnicas electroforéticas y el gel es sometido a la acción del láser directamente y se lleva al ICP-MS como técnica de detección. Se ha empleado cada vez más para el análisis microlocal de proteínas en geles tras su separación por electroforesis, y para obtener la distribución elemental de muestras biológicas [19,20]. En este trabajo se pretende utilizar LA-ICP-MS para evaluar la formación de proteínas corona con NPs de distintos recubrimientos, tras su separación en un gel de agarosa.

2. OBJETIVOS

El objetivo fundamental del trabajo es el estudio de la formación de proteínas corona entre AgNPs y dos proteínas, albúmina y transferrina y su caracterización aplicando diferentes métodos analíticos.

Este objetivo general se divide a su vez en diferentes objetivos específicos:

- a) Evaluación de la influencia del recubrimiento de las AgNPs en la formación de PC. Para ello se utilizarán técnicas de EAM-UV-Vis y técnicas de separación electroforética. Las muestras de AgNPs son patrones comerciales con distintos recubrimientos: citratos, PVP y PEG. Las proteínas empleadas son albúmina y transferrina que son proteínas mayoritarias del plasma sanguíneo.
- b) Caracterización de AgNPs y PC atendiendo a su tamaño por electroforesis en gel de agarosa y detección posterior de la plata mediante Ablación Láser-ICP-MS.
- c) Cuantificación del porcentaje de nanopartículas de plata que se oxidan y pasan a formar Ag(I) mediante ICP-MS en el proceso de formación de PC. Estudio de la influencia del recubrimiento de las AgNPs y del tipo de proteína que forma la PC.

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[®] GT System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.).
 - Fuente de alimentación PowerPac Basic[™] Power Supply (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.).
 - Secador de geles 583 Gel Dryer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.).
- Espectrofotómetro UV-Vis Agilent 8453A. (Agilent Technologies, Tokio, Japon).
- 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).
- Medidor de pH microPH 2001 (Crison, Barcelona, España).

3.1.2 APARATOS

- 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).
- Agitador orbital analógico con movimiento bidimensional Rotamax 120 (Heidolph, Schwabach, Alemania).
- Micropipetas de 2-20 μ L, 20-200 μ L y 200-1000 μ L (Crison, Barcelona, España).
- Baño de Ultrasonidos (JP Selecta S.A., Barcelona, España).

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.

Experimental

- 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.).

3.2. REACTIVOS, MUESTRAS Y DISOLUCIONES PATRÓN

3.2.1 REACTIVOS

- 2-mercaptoetanol (Fluka BioChemika, Buchs, Suiza).
- Acetato de sodio anhidro, para análisis, ACS (Scharlau, Barcelona, España).
- Ácido acético glacial, para análisis, ACS, ISO (Scharlau, Barcelona, España).
- Ácido clorhídrico (HCl) 36-38% (J. T. Baker, Phillipsburg, EE.UU.).
- Ácido nítrico (HNO₃) 69-70% (J. T. Baker, Phillipsburg, EE.UU.).
- Azul de bromofenol (Doesder, Barcelona, España).
- Bis/acrilamida 30%, 29:1 (3.3% C), para electroforesis (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.).
- Carbonato de sodio anhidro, para análisis, ACS, ISO (Scharlau, Barcelona, España).
- Certified™ Megabase Agarose. (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EEUU)
- Coomassie® Brilliant Blue G-250, para electroforesis (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.).
- Dihidrógeno fosfato de sodio, para análisis, ACS (Sigma-Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania).
- Dodecilsulfato de sodio (SDS), para electroforesis (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.).
- Etanol 96% v/v, para análisis, ACS, Ph Eur (Scharlau, Barcelona, España).
- Formaldehído 35/40% (Probus, Barcelona, España).
- Glicerol anhidro, para análisis, ACS (Sigma-Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania).
- Glicina, para electroforesis (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.).

Experimental

- Hidrógeno fosfato de sodio, para análisis, ACS (Sigma-Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania).
- Kit de ensayo Bradford para proteínas (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.).
- Metanol, para análisis, ACS, ISO, Ph Eur (Scharlau, Barcelona, España).
- N, N, N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.).
- Nitrato de plata, para análisis (Panreac, Barcelona, España).
- Persulfato amónico (APS) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.).
- Tiosulfato de sodio pentahidratado, extra puro, DAB, Ph Eur, BP, ISO (Scharlau, Barcelona, España).
- 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 \approx 70%) siendo el resto una matriz proteica (\approx 30%).

3.2.3 DISOLUCIONES PATRÓN

- Patrones de peso molecular para proteínas:
 - SigmaMarker™ wide range, 6500-200000 Da (Sigma-Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania) para electroforesis desnaturalizantes.
- Disoluciones estándares de nanopartículas:
 - Estándar comercial de 100 mg.L⁻¹ de nanopartículas de 10 nm de tamaño recubiertas de citratos (PlasmaChem, Berlín, Alemania).
 - Estándar comercial de 20 mg.L⁻¹ de nanopartículas de 10 nm de tamaño recubiertas de PVP (Sigma-Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania).

Experimental

- Estándar comercial de 20 mg.L⁻¹ de nanopartículas de 10 nm de tamaño recubiertas de PEG (Sigma-Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania).
- Disoluciones estándares:
 - Plata estándar para ICP de 1000 ± 2 mg.L⁻¹ (Sigma-Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania).
 - Disolución de In (1 mg.L⁻¹ en ácido nítrico al 2%) (Perkin Elmer, Madrid, España).

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

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 HNO₃ 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°C antes de su uso.

3.3 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

3.3.1 MÉTODO DE INCUBACIÓN DE NPs

Se ha estudiado la posible formación de proteínas corona (PC) mediante la incubación de patrones de nanopartículas de plata (AgNPs) con distintos recubrimientos con disoluciones de proteínas puras. Las proteínas que se han usado han sido la albúmina (Alb) y la transferrina (Tf) ya que son las proteínas mayoritarias del plasma sanguíneo.

Procedimiento seguido:

- Se prepara un tampon de fosfatos a pH=7,4. Se usa este pH porque es al que se encuentra el plasma sanguíneo. El tampon de fosfatos se prepara pesando 42,6 gramos de hidrógenofosfato de sodio y pesando 24 gramos de dihidrógenofosfato de sodio.
- Se preparan disoluciones de proteínas pura de 2000 mg.L⁻¹. Se pesan 0,02 g. de proteína y por pesada se enrasa con el tampon de pH=7,4 hasta 10 g.

Experimental

- Se preparan disoluciones 1:1 (v/v) de volumen final de 400 μL o 1 mL de: proteína pura (2000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) - AgNPs (de distintos recubrimiento: citratos, PVP y PEG), proteína pura (2000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) - agua mili-Q, AgNPs (de distintos recubrimiento: citratos, PVP y PEG) - agua mili-Q.
- Se incuban las disoluciones a 37 °C, a 550 rpm durante 60 minutos.
- Se centrifugan a 12000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se separa el sobrenadante del precipitado, pipeteando éste con cuidado de no coger precipitado y se reserva. El sobrenadante es el que se usara para la posible formación de proteínas corona mediante el método de Bradford.
- Se lava el precipitado 3 veces con 0,5 mL de agua Mili-Q, y se centrifuga en las mismas condiciones después de cada lavado separando el sobrenadante.
- El precipitado obtenido se redissuelve en 200 μL de tampón de carga, para la realización de la electroforesis SDS-PAGE y en 60 μL de tampón de carga para la electroforesis en agarosa.

3.3.2 MÉTODOS EAM-UV-VIS

3.3.2.1 Caracterización de PC mediante EAM-UV-VIS

Se puede caracterizar de manera cualitativa la posible formación de PC mediante EAM-UV-VIS.

Cuando las proteínas se adsorben a la superficie de las NPs y se forman proteínas corona, el máximo de absorbancia se desplaza hacia mayores longitudes de onda. Por lo que realizar un espectro en la zona del visible de las NPs y de las PC es un método adecuado para evaluar cualitativamente si se forman PC.

Se incuban la albúmina y la transferrina con las AgNPs de diferentes recubrimientos (citratos, PVP, PEG), también se incuban disoluciones de proteínas y AgNPs puras, como se ha explicado en el método de incubación de NPs (Apartado 3.3.1). Se preparan disoluciones de volumen final de 400 μL , sólo que en este caso no se centrifuga.

Para realizar los espectros, de las disoluciones preparadas anteriormente se toman 250 μL y se llevan a un volumen final de 750 μL .

Se obtiene una concentración final de proteínas de 333,33 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y de AgNPs de 6,66 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Para realizar los espectros se usan cubetas de volumen reducido de 1 mL de cuarzo, ya que no se dispone de mucha cantidad de muestra. Se obtienen los espectros de absorción frente a la longitud de onda para cada una (λ).

3.3.2.2 Método Bradford

Para determinar cuantitativamente que cantidad de proteína interacciona con las AgNPs y pasa a formar posibles PC se usa el método de Bradford.

Con este método se determina que concentración de proteínas hay en el primer sobrenadante y por diferencia con la concentración total de proteína que se ha añadido se calcula cuántas están formando parte de las PC [18].

Se usa el reactivo Coomassie G-250 que se une a aminoácido de arginina y en menor medida a triptófano, tirosina, histidina, fenilalanina y lisina. Los complejos formados entre las proteínas y el Coomassie G-250 posee un máximo de absorción a 595nm y a esa longitud de onda se realizan las medidas.

El ensayo se realiza con un kit comercializado que contiene el reactivo de Bradford y disoluciones patrón de albúmina de suero bovino que se usarán para realizar la recta de calibrado.

Se toman 100 µL de los patrones, muestras, blanco y proteínas puras y se les añade 5 ml del reactivo de Bradford.

Se incuban durante al menos cinco minutos y se mide la absorbancia a 595 nm por EAM-UV-Vis.

Los valores de absorbancia obtenidos se interpolan en la recta de calibrado obtenida con los patrones y así se determina la concentración de proteínas que hay en cada muestra de sobrenadante.

3.3.3. MÉTODOS ELECTROFORÉTICOS

La electroforesis en gel es una de las técnicas más ampliamente utilizadas para caracterizar proteínas . De entre ellas la electroforesis en poliacrilamida (PAGE) y la electroforesis en gel de agarosa (AGE) es una de las más comunes.

3.3.3.1. SDS-Tris-Glicina-PAGE

Los precipitados obtenidos tras la incubación de las NPs con las proteínas se sometieron a electroforesis SDS-Tris-Glicina-PAGE.

Es una electroforesis de tipo desnaturizante en las que las proteínas se someten a un tratamiento térmico en baño de agua a 100 °C en presencia de agentes desnaturizantes como beta-mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro, y dodecil sulfato de sodio (SDS) que desnaturiza las proteínas. Las proteínas se separan como cadenas polipeptídicas aisladas.

El SDS es un detergente que se une en proporción de una molécula de SDS por cada dos aminoácidos de la cadena. La unión de SDS hace que se bloquee la propia carga negativa de la proteína dotándola de una carga negativa que es proporcional a su

masa y haciendo que las proteínas migren hacia el ánodo. De esta manera se consigue separar proporcionalmente a la masa de la proteína e independiente de su carga y haciendo posible que se pueda determinar el peso molecular de las cadenas polipeptídicas por comparación con un patrón de proteínas [21].

En el Anexo A, Procedimiento A.1. se muestra una descripción del método. La composición de los distintos tampones empleados en este electroforesis se recogen en el Anexo A, Tabla A.1.

El tratamiento final de los geles consiste en realizar una tinción y secarlo en el secador de geles a 80 °C durante dos horas a vacío. Se pueden realizar dos tipos de tinciones una con Coomassie y otra con plata. En las tablas A.4. y A.5. del anexo A se recogen las disoluciones empleadas para realizar estas tinciones.

3.3.3.2 Electroforesis en gel de agarosa

Se trata de un tipo de electroforesis no desnaturizante que separa moléculas de elevados pesos moleculares en función de su masa y carga. Sus principales aplicaciones son las de separar proteínas de altos pesos moleculares, ácidos nucleicos (DNA y RNA) y en este trabajo para la caracterización de AgNPs y PC.

En el Anexo A, Procedimiento A.2. se muestra una descripción del método de preparación de los geles de agarosa.

En el Anexo A, Tablas A.6. y A.7. se muestra la composición de los tampones de electroforesis empleados en la electroforesis en gel de agarosa.

3.3.4. Determinación de Ag (I) liberada tras la incubación de AgNPs con distintos recubrimientos con proteínas por ICP-MS.

Se ha llevado a cabo la cuantificación de la cantidad de Ag (I) liberada en los sobrenadantes tras la incubación de AgNPs de distintos recubrimientos con albúmina y transferrina.

En primer lugar se preparan disoluciones para realizar la recta de calibrado para ICP-MS, se realiza a partir de una disolución patrón de Ag (I) de 1000 mg.L⁻¹ efectuando las correspondientes diluciones.

Se preparan 5 disoluciones de concentraciones entre 1 µg.L⁻¹ y 500 µg.L⁻¹.

Las concentraciones exactas son: 0,82 µg.L⁻¹, 8,41 µg.L⁻¹, 46,36 µg.L⁻¹, 91,22 µg.L⁻¹ y 436,03 µg.L⁻¹.

A partir de una disolución patrón de 10 mg.L⁻¹ de In se prepara una disolución de 25 µg.L⁻¹, que servirá como patrón interno para medir en ICP-MS.

Se preparan disoluciones 1:20 (v/v) de volumen final de 4 mL de: proteína pura (2000 mg.L⁻¹) - agua mili-Q, AgNPs (de distintos recubrimiento: citratos, PVP y PEG) - agua mili-Q y sobrenadantes- agua mili-Q.

El ICP-MS debe optimizarse según 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⁻¹) cada uno).

Experimental

Las condiciones de medida óptimas del sistema se muestra en la Tabla A.8. del Anexo A.

Para detectar Ag (I) en los sobrenadantes se realizan rectas de calibrado ponderadas desde $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ a $500 \mu\text{g.L}^{-1}$

.Las rectas de calibrado se realizan mediante una calibración ponderada, es decir, que al construir la recta de calibrado no todos los puntos tienen el mismo peso. Se realiza este tipo de calibración cuando el error relativo en la curva de calibrado no es igual para todos los puntos, si no que es proporcional a la concentración de analito.

La recta de regresión se debe de calcular proporcionando una ponderación adicional a aquellos puntos en los que el error relativo sea menor, es decir, es más importante que la recta pase cerca de tales puntos que pase cerca de los puntos que representan concentraciones más altas con los errores más grandes. Para ello se le da a cada punto una ponderación inversamente proporcional a la varianza correspondiente [22]. Se realizan dos rectas de calibrado una sin patrón interno y otra con patrón interno de In.

La recta de calibrado con patrón interno se realiza midiendo la intensidad de un elemento que se añade tanto a patrones como a muestras en concentración conocida y constante y se representa el cociente de intensidades de analito entre patrón interno frente a la concentración de patrón de analito. Los patrones internos son especialmente útiles cuando la respuesta del instrumento varía algo cada vez que se usa, por razones que no se pueden controlar bien como en este caso los caudales de gas [23].

3.3.5 Método LA-ICP-MS

Para detectar plata en los geles de agarosa en los que se ha procedido a la separación de AgNPs y PC, se ablacionan con un sistema LA-ICP-MS. Cada uno de los carriles corresponde a una de las muestras que hemos inyectado. Una vez que el gel ha sido secado se recorta cada carril, cada carril se parte en dos trozos iguales y se pegan sobre un porta con cinta adhesiva de doble cara.

El ICP-MS se optimiza de la misma manera que se hizo al medir plata en los sobrenadantes pero en este caso, se sustituyen el nebulizador y la cámara de nebulización por el tubo de conexión con el sistema de ablación láser.

En la Tabla A.9. del Anexo A se muestran las condiciones instrumentales del sistema LA-ICP-MS.

Dentro del carril, se supone que en la posición donde hayan quedado las AgNPs y las PC nos debería de dar la señal correspondiente a los isótopos de Ag medidos.

Se realizan barridos completos de los carriles de los geles que miden 7,6 cm. Se miden los dos isótopos de plata: ^{107}Ag y ^{109}Ag , también se mide el isótopo ^{13}C . El isótopo de carbono presente en todo el gel se usa como patrón interno para corregir la deriva de la señal.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a los objetivos del presente trabajo a continuación se muestran los resultados más relevantes.

4.1. Caracterización de PC tras la incubación de AgNPs con distintos recubrimientos con proteínas por EAM-UV-Vis

Las AgNPs absorben en el rango de 390-410 nm debido a la resonancia del plasmón superficial. Si se forman PC el máximo de absorbancia se desplaza hacia mayores longitudes de onda [20].

Se realizan los espectros por EAM-UV-VIS.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.1. y las tablas 4.1. y 4.2. donde se muestra la longitud de onda del máximo así como los valores de absorbancia.

Figura 4.1. Espectros de absorción AgNPcitratos (20 mg.L⁻¹) (a) / AgNP PVP (20 mg.L⁻¹) (b)/ AgNP PEG (20 mg.L⁻¹) (c) + Albúmina (2000 mg.L⁻¹) / Transferrina (2000 mg.L⁻¹).

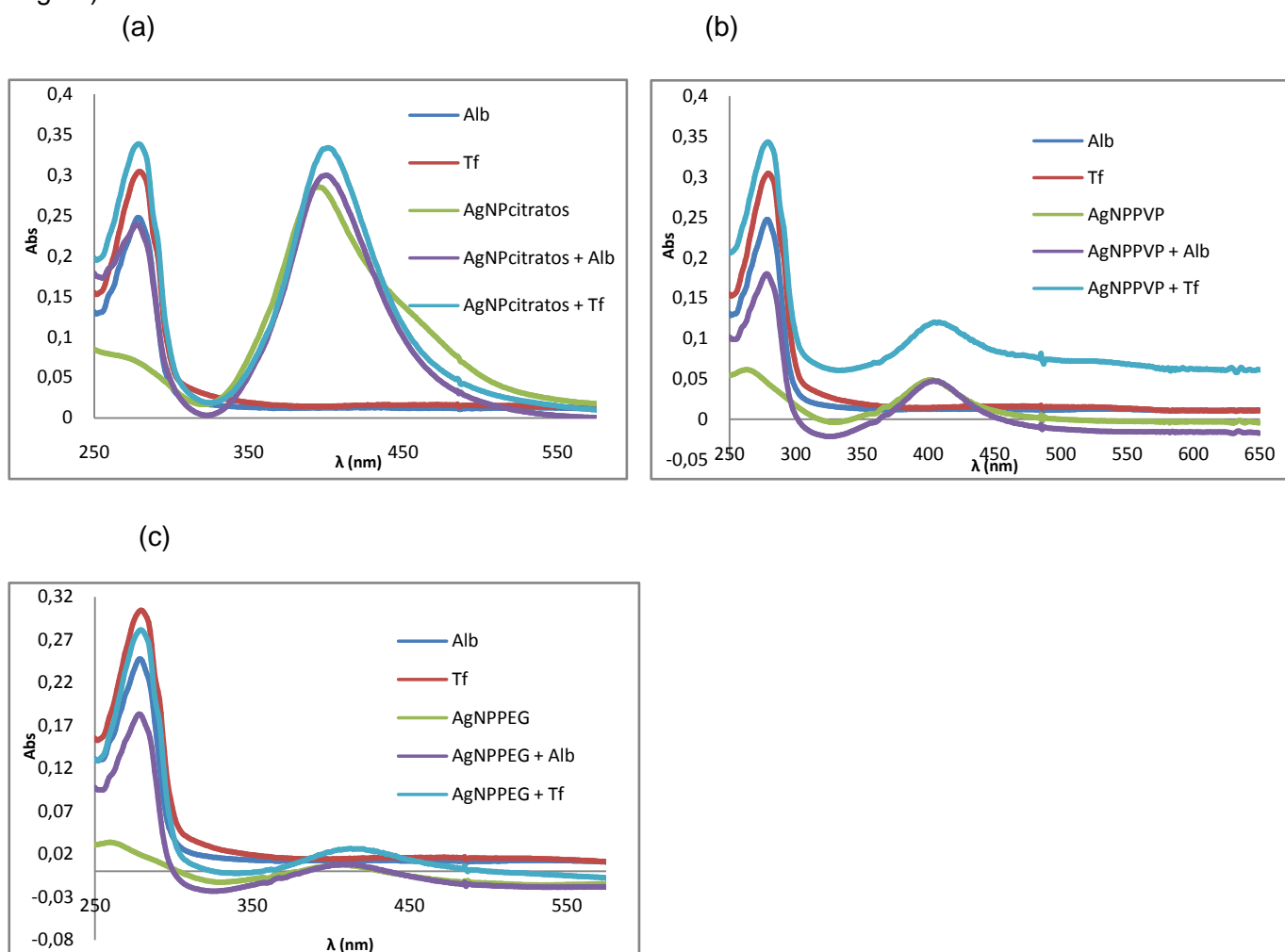


Tabla 4.1. λ del máximo y valores de absorción en los espectros obtenidos por EAM tras la incubación de AgNPs con distinto recubrimiento con albúmina y transferrina

(a) AgNPcitratos

	λ (nm)	Máx. Abs
Alb	278	0,248
Tf	279	0,304
AgNPcitratos	395	0,286
AgNPcitratos + Alb	278	0,251
	400	0,300
AgNPcitratos + Tf	279	0,339
	401	0,334

(b) AgNPPVP

	λ (nm)	Máx. Abs
Alb	278	0,248
Tf	279	0,304
AgNPPVP	403	0,049
AgNPPVP + Alb	278	0,180
	407	0,047
AgNPPVP + Tf	279	0,343
	408	0,120

(c) AgNPPEG

	λ (nm)	Máx. Abs
Alb	278	0,248
Tf	279	0,304
AgNPPEG	407	0,008
AgNPPEG + Alb	278	0,183
	411	0,008
AgNPPEG + Tf	279	0,282
	412	0,027

Tabla 4.2. Desplazamientos de los máximos de absorción obtenidos para AgNPs tras la incubación con albúmina y transferrina

	Desplazamiento $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	
	Albúmina	Transferrina
AgNPcitratos	5	6
AgNPPEG	4	5
AgNPPVP	4	5

Para las disoluciones de AgNPs con proteínas aparecen dos máximos uno correspondiente a la proteína y el otro a la supuesta PC formada.

En todos los casos se observa un desplazamiento del máximo por lo que se confirma que se forman proteínas corona entre las proteínas y las nanopartículas.

Además se produce un mayor desplazamiento con la transferrina que con la albúmina.

Comparando las distintas nanopartículas con distinto recubrimiento se producen ligero desplazamiento mayor con las que poseen un recubrimiento de citratos. Para las que están recubiertas por PEG o PVP el desplazamiento es el mismo.

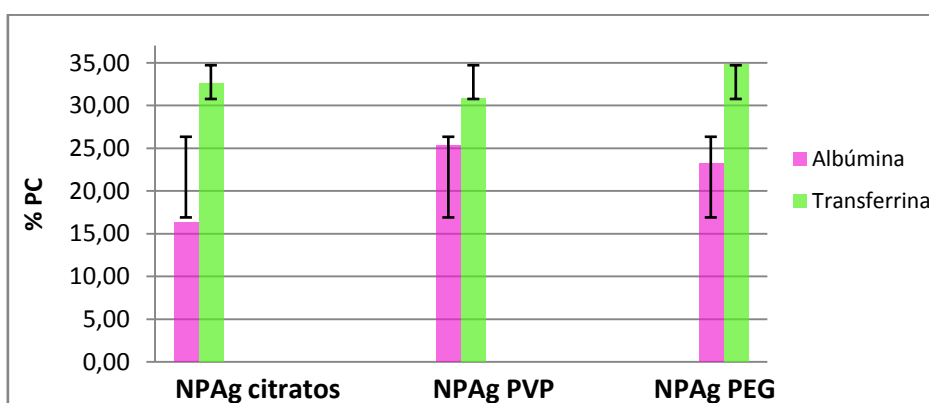
Para la determinación cuantitativa de las proteínas que presumiblemente se habrían unido a las NPs se aplica el método de Bradford a las disoluciones obtenidas en el

primer sobrenadante tras la incubación y posterior centrifugación [18]. Se obtiene un precipitado que corresponde a la PC formada y un sobrenadante en que están las proteínas que no han formado PC (Apartado 3.3.1). De esta manera por diferencia con la cantidad de proteínas totales se puede calcular el % de proteínas que formarían la PC.

Se obtiene la recta de calibrado de los patrones de la albúmina de suero bovina, cuya ecuación es: $y = 0,737x + 0,312$, con un valor de R^2 de 0,990 y un rango lineal de 0,125-1,5 mg/mL. La recta de calibrado se muestra en la Figura B.1. del Anexo B. Interpolando en la recta de calibrado las absorbancias obtenidas, se calculan las concentraciones de proteínas que hay en cada uno de los sobrenadantes. Los resultados se muestran en la Tabla B.1. del Anexo B.

En la Figura 4.2. se muestra el porcentaje de proteína corona que se forma con los distintos tipos de AgNPs. El porcentaje se calcula por diferencia entra la concentración de proteína inicial y la que queda en el sobrenadante. Se realizaron tres réplicas para cada uno de los distintos tipos de recubrimientos.

Figura 4.2. Porcentaje de proteínas corona formadas



Se observa que se forma mayor porcentaje de proteína corona con la transferrina que con la albúmina. Esto confirma el mayor desplazamiento de la λ máxima en los espectros obtenidos con la transferrina.

Con la albúmina el mayor porcentaje de PC se obtiene con las nanopartículas de plata recubiertas con PVP (25,36 %), parecidas a las de PEG (23,21 %) y por último con las que están recubiertas por citratos. En este caso sí que hay mayores diferencias para los distintos recubrimientos (16,33%). En otros estudios realizados con AgNPs recubiertas con citratos y PVP se llegan a resultados similares, se forman mayor porcentaje de proteínas corona con las AgNPs funcionalizadas con PVP que con las funcionalizadas con citratos [24].

Con la transferrina no hay mucha diferencia entre los porcentajes obtenidos para los distintos tipos de recubrimientos (≈ 30 %), siendo mayor el porcentaje de proteína que forma PC que con la albúmina como también se vio de forma cualitativa al realizar los espectros.

4.2 Caracterización de PC tras la incubación de AgNPs con distintos recubrimientos con proteínas por SDS-PAGE

Los precipitados obtenidos tras la incubación de las NPs con las proteínas se sometieron a electroforesis SDS-PAGE.

Con este método se quiere confirmar que las proteínas efectivamente forman parte de la PC.

Para ello los precipitados obtenidos se sometieron al método SDS-PAGE y a la posterior tinción y secado de los geles descrito en el apartado 3.3.3.1.

Los resultados obtenidos mediante la tinción con Azul de Commassie se muestran en el Anexo B, la Figura B.2.(a) y los obtenidos con la tinción de plata se muestran en la Figura B.2. (b).

En ambos geles en el carril en el que se ha inyectado el patrón de proteínas se ha indicado cual es el peso molecular en KDa al lado de cada banda. Se ha inyectado también las proteínas puras para comparar.

En todos los casos se observan las mismas bandas en las proteínas puras como en las incubaciones con las nanopartículas de distintos recubrimientos. Se puede confirmar que efectivamente sí se han formado proteínas corona entre las proteínas estudiadas y las nanopartículas

La intensidad de la bandas es mayor cuando la incubación se ha realizado con la transferrina (carriles 8, 9, 10) que con la albúmina (carriles 5, 6, 7) lo cual coincide con los resultados obtenidos en método de Bradford, indicando que el % de proteína que forma PC es mayor con transferrina que con albúmina. No se observan diferencias significativas en las intensidades de las bandas atendiendo a los distintos recubrimientos utilizados ya que el método no es lo suficiente sensible.

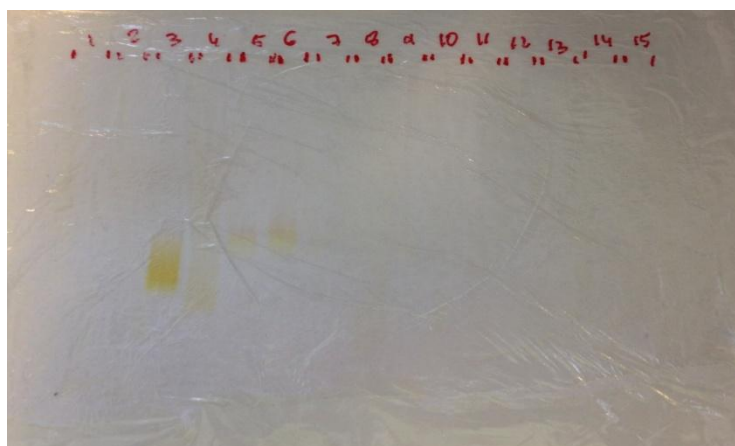
4.3. Caracterización de PC tras la incubación de AgNPs con distintos recubrimientos con proteínas por AGE y detección por LA-ICP-MS

Un inconveniente del método electroforético PAGE descrito en el apartado anterior es que para caracterizar las proteínas que forman parte de la PC es necesario romper el complejo formado por la NP y la proteína al ser un método desnaturizante. Sin embargo si se utiliza AGE que permite usar tamaños de poro mayores y es no desnaturizante se puede mantener el complejo NP-proteína intacto.

Por ello los precipitados obtenidos tras la incubación de las AgNPs con distintos recubrimientos se someten a electroforesis en gel de agarosa, de acuerdo al método descrito en el apartado 3.3.3.2.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.3.

Figura 4.3. Gel de agarosa



1. Blanco
2. Collargol 25 mg.L-1
3. Collargol 1000 mg.L-1
4. AgNP citratos 10 nm
5. AgNP citratos + Alb. Un lavado.
6. AgNP citratos + Tf. Un lavado.
7. AgNP citratos + Alb. Tres lavados.
8. AgNP PVP 10 nm
9. AgNP PVP + Alb. Un lavado.
10. AgNP PVP + Tf. Un lavado.
11. AgNP citratos + Alb. Tres lavados.
12. AgNP PEG 10 nm
13. AgNP PEG + Alb. Un lavado.
14. AgNP PEG + Tf. Un lavado.
15. AgNP citratos + Alb. Tres lavados.

De acuerdo a otros estudios del grupo, la caracterización de AgNPs y PC mediante AGE sólo es posible en unas ciertas condiciones y siempre y cuando las AgNPs esten en una matriz estable y no interfieran con el gel. Este es el caso de la muestra de Collargol que es una muestra que contiene AgNPs con una matriz proteica que le confiere gran estabilidad. Por eso se ha introducido también como referencia.

Visualmente no se observan bandas en el gel para la muestra de Collargol de 25 mg.L⁻¹ (carril 2) pero si para la muestra de Collargol de 1000 mg.L⁻¹ que presenta una banda ancha (carril 3). Esto es debido a la menor concentración del Collargol de 25 mg.L⁻¹

Visualmente tampoco se observan bandas para las incubaciones realizadas con AgNPs recubiertas con PVP y con PEG (carriles 8 y 12) debido a su baja concentración (20 mg.L⁻¹).

Se aprecian con claridad bandas cuando la incubación se ha realizado con AgNPs recubiertas con citratos ya que su concentración en el patrón es de 100 mg.L⁻¹. La banda de las AgNP recubiertas con citratos que se incubaron con agua (carril 4) aparece más abajo que las que se incubaron con albúmina (carril 5) y con transferrina (carril 6), esto es debido a que cuando las NP se unen a proteínas y forman PC aumenta su tamaño y esto hace que cada vez tengan más dificultades para atravesar los poros del gel de agarosa. La banda de las NPs incubadas con transferrina aparece algo más arriba que las incubadas con albúmina, esto es debido a que la transferrina (76,5 kDa) tiene un peso molecular más elevado que el de la albúmina (67 kDa) y por tanto la PC formada tendrá mayor tamaño. Por tanto se puede confirmar mediante la electroforesis en gel de agarosa que sí se han formado las correspondientes PC.

El objetivo de llevar a cabo una detección mediante LA-ICP-MS es poder detectar AgNPs y las correspondientes PC a niveles de concentración no detectables visualmente. Para ello se aplicó el método LA-ICP-MS descrito en el apartado 3.3.5.

Se represento la intensidad relativa de los dos isótopos de plata con respecto a la del C 13, que se usa como patrón interno para corregir la deriva de la señal frente a la distancia recorrida por el láser en el gel.

En el Anexo B (Figura B.3. - Figura B.6.) se muestran los resultados obtenidos.

En la Figura B.3. donde se muestra la señal de Ag obtenida por LA-ICP-MS para la muestra de Colargol tras la electroforesis, se observa que la mayor intensidad detectada con el sistema LA-ICP-MS corresponde con la zona de la banda del gel de agarosa que se encuentra más coloreada. Como ya se aprecia visualmente la banda obtenida es bastante ancha, debido también a la alta concentración. Esta muestra ha sido previamente caracterizada y tiene un tamaño de 15,4 nm. Su Rf es calculado como la distancia recorrida / distancia del frente es 0,77.

Los resultados obtenidos para los distintos patrones con distintos recubrimientos no fueron satisfactorios y esto coincide con otros estudios del grupo. Se observaron señales de Ag tanto en los pocillos, como a lo largo del gel y eso es debido a que las distintas NPs interactúan con el gel o bien pierden su carga, por lo que no avanzan adecuadamente de acuerdo a su relación tamaño/carga.

En la Figura B.4. donde se muestra la señal de Ag obtenida por LA-ICP-MS para la muestra de AgNPs con citratos tras la electroforesis, se observa que al principio del gel, en el pocillo, se quedan retenidas las AgNPs y no avanzan bien en el gel de agarosa. La mayor intensidad de color en la banda del gel de agarosa no se corresponde con la intensidad máxima de señal detectada con el sistema LA-ICP-MS. Ello es debido a que como hemos dicho las AgNPs recubiertas con citratos interactúan con el gel y no avanzan de acuerdo a su relación tamaño/carga. El Rf es 0,85.

En el caso de la Figura B.5 donde se muestra la señal de Ag obtenida por LA-ICP-MS para la muestra de AgNPs con citratos incubada con albúmina tras la electroforesis se observan dos bandas en las que se ve que en este caso el complejo NP-proteína si avanza en el gel. Pero aparece otra banda probablemente debida a AgNPs solas que han perdido parte de las proteínas. Su Rf es 0,66.

Según la figura B.4. las AgNPs con citratos sin incubar no entran bien en el gel debido a la pérdida de carga y a la interacción con el gel. Pero al unirse a la proteína (Figura B.5.) esta les confiere mayor estabilidad y si avanzan en el gel. La doble banda puede corresponder a que hay AgNPs que pierden parte de las proteínas adsorbidas al someterlas al proceso electroforético.

En el caso de las AgNPs recubiertas con citratos incubadas con transferrina, Figura B.6. aunque también se observa una señal continua a lo largo del gel probablemente debida a que hay AgNPs que interactúan con el gel, la mayor intensidad se observa para la banda correspondiente a la PC formada. El Rf calculado es de 0,53, menor que para la albúmina debido al mayor tamaño del complejo AgNPcit-Tf que el complejo AgNPcit-Alb que hace que avance menos en el gel. Se confirma que las AgNP recubiertas de citratos se unen mejor a la transferrina que a la albúmina resultados que ya habíamos obtenido mediante otros métodos de caracterización vistos anteriormente.

Para el caso de las AgNPs recubiertas con PVP y PEG los resultados no fueron satisfactorios ya que se observó también que las AgNPs no avanzaban se acuerdo a su relación tamaño/carga y aunque en presencia de proteína se observó alguna banda no se pudo concluir ningún resultado positivo. Se puede ver los resultados obtenidos en el Anexo B (Figura B.7.- Figura B.11.).

4.4. Determinación de Ag (I) liberada tras la incubación de AgNPs con distintos recubrimientos con proteínas por ICP-MS

Las suspensiones de nanopartículas de plata contienen al menos dos formas distintas de plata: Ag^0 y Ag (I) (libre o acomplejada). La liberación de Ag (I) como plata iónica o como complejos de plata por parte de nanopartículas en suspensiones acuosas se produce debido a procesos de oxidación, dependiendo de la composición del medio [25]. El tipo de recubrimiento de la AgNPs y la proteína con la que formen la PC afecta a la liberación de Ag (I).

Para medir la liberación de Ag (I) en presencia de proteínas se procedió a la determinación de Ag por ICP-MS aplicando el método descrito en el Apartado 3.3.4. en los sobrenadantes obtenidos tras la incubación de las AgNPs con distintos recubrimientos con las proteínas.

En la Tabla 4.3. se muestra la recta de calibrado ponderada sin patrón interno:

Tabla 4.3. Recta de calibrado ponderada para ICP-MS sin patrón interno

Analito	Recta de calibrado	Coefficiente correlación	s pendiente	DSR pendiente	s ordenada en el origen	DSR ordenada
Ag 107	$y = -621,7 + 8975x$	0,999	226,8	2,5	414,2	66,6
Ag 109	$y = -693,5 + 8679x$	0,999	219	2,5	399,9	57,7

En la Tabla 4.4. se muestran los parámetros analíticos de límite de detección (LD) y de límite de cuantificación (LC). El LD es la concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente de la señal de blanco y se calcula como tres veces la desviación estándar del blanco. El LC se define como la concentración más baja que se puede medir con precisión y se calcula como diez veces la desviación estándar del blanco. Tras calcular así el LD y el LC se aplica el factor de dilución 1:20 con el que se prepararon las muestras.

Tabla 4.4. Parámetros analíticos para ICP-MS. Límite de detección y límite de cuantificación.

Ag 107	LD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LC ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
	0,12	0,38
Ag 109	LD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LC ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
	0,04	0,15

En la Tabla 4.5. se muestra la recta de calibrado ponderada con patrón interno:

Tabla 4.5. Recta de calibrado ponderada para ICP-MS con patrón interno.

Analito	Recta de calibrado	Coefficiente correlación	s pendiente	DSR pendiente	s ordenada en el origen	DSR ordenada
Ag 107	$y = -3,11E-05 + 3,84E-02x$	0,999	8,92E-04	2,32	1,63E-03	5,24E+03
Ag 109	$y = -4,98E-04 + 3,72E-02x$	0,999	8,57E-04	2,31	1,56E-03	3,14E+02

La desviación estándar relativa de la pendiente es aceptable tanto para la calibración con patrón interno como para la calibración sin patrón interno, pero la DSR de la ordenada en el origen es muy elevada en ambos casos, especialmente para la recta de calibrado sin patrón interno.

Tanto con la calibración con patrón interno como con la de sin patrón interno se obtienen límites de correlación idénticos de 0,999, que poseen un valor adecuado para poder ser usados.

En las tablas B.2. y B.3. del Anexo B se muestran las concentraciones de Ag en los sobrenadantes medidas con el sistema ICP-MS, tras multiplicar por el correspondiente factor de dilución (1:20) utilizando rectas de calibración ponderada sin y con patrón interno.

En la Tabla 4.6. se muestra el porcentaje de Ag (I) liberada en los sobrenadantes usando la recta ponderada con patrón interno.

En la Tabla B.4. del Anexo B se muestra el porcentaje de Ag (I) liberada en los sobrenadantes usando la recta ponderada sin patrón interno.

Podemos concluir que en general la presencia de proteínas hace que se libere más Ag (I) a partir de las AgNPs (4-27%) que sin la presencia de proteínas (1%).

Se libera mayor cantidad de Ag (I) con la albúmina que con la transferrina para todos los tipos de recubrimiento. Debido a que se forma mayor cantidad de PC con la transferrina que con la albúmina, así la AgNP está más protegida al estar rodeada por proteínas y se oxida con mayor dificultad.

Realizando una comparación entre las nanopartículas con distintos recubrimientos se observa que tanto con la albúmina como con la transferrina se observa una mayor liberación de Ag (I) con las nanopartículas recubiertas de citratos (27,61% y 23,58%). Los recubrimiento de PEG (19,62% y 4,44%) y PVP (18,13% y 8,02%) debido a su composición le aportan mayor estabilidad a las AgNPs.

Tabla 4.6. Porcentaje de Ag (I) liberada en los sobrenadantes. Calibrando con patrón interno.

Muestra	% Ag 107	Intervalo de confianza 95%	% Ag 109	Intervalo de confianza 95%
Albúmina	0,1300	-	0,1337	-
Transferrina	0,0400	-	0,05033	-
AgNPs citratos	1,310	-	1,418	-
AgNPs PVP	1,760	-	1,997	-
AgNPs PEG	1,290	-	1,889	-
Alb + AgNPs citratos	28,44	± 4,821	28,34	± 4,666
Alb + AgNPs PVP	18,59	± 1,391	18,42	± 1,366
Alb + AgNPs PEG	19,90	± 0,9357	19,73	± 0,9308
Tf + AgNPs citratos	24,13	± 1,482	24,06	± 1,371
Tf + AgNPs PVP	8,328	± 2,584	8,264	± 2,598
Tf + AgNPs PEG	4,524	± 0,989	4,510	± 1,011

A continuación se va a realizar un test T para comprobar si hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos al usar patrón interno o al no usarlo. Pero antes se debe de realizar un test F para ver si las varianzas con y sin patrón interno presentan diferencias significativas.

En el test F la hipótesis nula supone que las varianzas de ambos métodos son iguales y la hipótesis alternativa que las varianzas presentan diferencias significativas. En todos los casos, salvo en la incubación de transferrina con AgNPS recubiertas con PEG, hay tres réplicas. Se calcula el estadístico F, al 95 % de confianza con dos grados de libertad tanto para el numerador como para el denominador, y se compara con el estadístico F crítico que aparece tabulado en tablas. Para el caso de las muestras con transferrina y AgNPs recubiertas con PEG se calcula el estadístico F al 95 % de confianza con un grado de libertad tanto para el numerador como para el denominador. En la tabla 4.7. se muestran los valores para el test F.

Tabla 4.7. Valor del estadístico F calculado y crítico.

	F calculado	F crítico
Alb + AgNPs citratos	0,81	19,00
Alb + AgNPs PVP	0,98	19,00
Alb + AgNPs PEG	1,49	19,00
Tf + AgNPs citratos	1,41	19,00
Tf + AgNPs PVP	0,78	19,00
Tf + AgNPs PEG	0,14	161,45

En todos los casos el F estadístico calculado es menor que el F estadístico crítico por lo que se cumple la hipótesis nula de que las varianzas no poseen diferencias significativas al usar patrón interno o al no usarlo.

Se realiza el test t para varianzas iguales. La hipótesis nula es que no hay diferencias significativas en los valores de concentración calculada de Ag (I) liberada en los sobrenadantes al usar patrón interno o al no usarlo. En todos los casos, salvo en la incubación de transferrina con AgNPs recubiertas con PEG, hay tres réplicas. Se calcula el estadístico t, al 95 % de confianza con dos grados de libertad, y se compara con el estadístico F crítico que aparece tabulado en tablas. Para el caso de las muestras con transferrina y AgNPs recubiertas con PEG se calcula el estadístico F al 95 % de confianza con un grado de libertad. En la tabla 4.8. se muestran los valores para el estadístico t.

Tabla 4.8. Valor del t estadístico calculado y crítico.

	t calculado	t crítico
Alb + AgNPs citratos	0,30	2,78
Alb + AgNPs PVP	0,54	2,78
Alb + AgNPs PEG	0,43	2,78
Tf + AgNPs citratos	0,57	2,78
Tf + AgNPs PVP	0,21	2,78
Tf + AgNPs PEG	0,15	4,30

En todos los casos el t estadístico calculado es menor que el t estadístico crítico por lo que se cumple la hipótesis nula de que los resultados no presentan diferencias significativas al usar patrón interno o al no usarlo. Se puede concluir que la deriva de la señal es muy pequeña, pero pese a no haber diferencias significativas siempre serán más precisos los datos obtenidos al usar patrón interno.

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones de la presente memoria, en la que se estudia la formación de PC entre nanopartículas de plata con distintos (citratos, PVP y PEG) con dos proteínas mayoritarias del plasma sanguíneo, albúmina y transferrina son:

- Del estudio mediante EAM-UV-Vis se puede confirmar que se forman PC con todas las AgNPs usadas en este trabajo tanto con albúmina como con transferrina, ya que para todas hay un desplazamiento del máximo de absorbancia siendo mayor con transferrina que con albúmina. Los mayores desplazamientos se producen con las AgNPs recubiertas con citratos y para las AgNPs recubiertas con PVP y PEG. Mediante el método Bradford se confirma cuantitativamente lo observado mediante EAM-UV-Vis cualitativamente, se forma un mayor porcentaje de PC con la transferrina (32,54%, 30,89%, 34,82%) que con la albúmina (16,33%, 25,36%, 23,21%) confirmándose así el mayor desplazamiento del máximo de absorbancia.
- Aplicando técnicas electroforéticas mediante SDS-PAGE se confirma la formación de PC en todos los casos obteniéndose bandas para las PC estudiadas similares a las obtenidas para la albúmina y la transferrina puras. Las bandas son más intensas para las incubaciones realizadas con transferrina y de esta manera se confirman los resultados por EAM-UV-Vis. No se aprecian diferencias de intensidad en las bandas atendiendo a los distintos recubrimientos de las AgNPs debido a que la sensibilidad del método no es muy elevada.
- Aplicando la técnica electroforética basada en el uso de geles de agarosa y posterior detección mediante LA-ICP-MS se confirma la formación de PC ya que se obtienen bandas tanto para los complejos AgNPs-Alb como AgNPs-Tf, observándose además un menor movimiento para AgNPs-Tf que para AgNPs-Alb debido a su mayor tamaño. Sin embargo para las AgNPs con los distintos recubrimientos solas sin proteínas adsorbidas no se obtuvieron señales adecuadas debido a que las AgNPs solas o bien interaccionan con el gel o bien no son estables y pierden su carga en el proceso electroforético.
- Del estudio de la cantidad de Ag (I) liberada por las AgNPs en presencia de proteínas mediante ICP-MS se observa que se libera mayor cantidad de Ag(I) con la albúmina (28,5%-19%) que con la transferrina (5%-24%) probablemente consecuencia de que se unen un menor número de AgNPs a la albúmina y las AgNPs al encontrarse menos protegidas se oxidan con mayor facilidad. Se observa una mayor liberación de Ag(I) con las AgNPs recubiertas con citratos (28,5%-24%).

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Segunda revisión de la normativa sobre los nanomateriales. Comunicación de la comisión al parlamento europeo, al consejo y al comité económico y social europeo. COM (2012) 572 final. Bruselas. 2012.
- [2] Nanotechnology. (n.d.). Retrieved August 8, 2015, from <http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/>
- [3] Lin, JJ; Lin, WC; Dong, RX; Hsu, SH; (2012). The cellular responses and antibacterial activities of silver nanoparticles stabilized by different polymers. *Nanotechnologies*, 065102.
- [4] Foldbjerg, R; Irving, ES; Hayashi, Y; Sutherland, DS; Thorsen, K; et al. (2012). Global gene expression profiling of human lung epithelial cells after exposure of nanosilver. *Toxicol Sci*, 145-157.
- [5] Kittler, S; Greulich, C; Diendorf, J; et ál. (2012). Nanoparticles Increases During Storage Because of Slow Dissolution Under Release of Silver Ions. *Chemistry of Materials*. 4547-4554.
- [6] Lee, D; Cohen, R. E; Rubner, M. F. (2005). Antibacterial Properties of Ag Nanoparticle Loaded Multilayers and Formation of Magnetically Directed Antibacterial Microparticles. 9651-9659.
- [7] Navarro, E; Piccapietra, F; Wagner, B; Marconi, F; Kaegi, R; Odzak, N; Sigg, L; Behra, R. (2008) Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Environ. Sci. Technol.* 8959-8964.
- [8] Rahman, R; Laurent, S; Nancy, T; L'Hocine Y; Morteza, M. (2013). Nanoparticle and Protein Corona. In *Protein-Nanoparticle Interaction* (Vol. 15, pp. 21-42). Berlin: Springer Series in Biophysics.
- [9] Cruz, D; Rodríguez, M; López, J; Herrera, V; Orive, A; Creus, A. (2011). Metallic Nanoparticles and Surface Plasmons: A deep relationship. *Av. cien. ing.* 67-78.
- [10] Liwen, Li; Qingxin, Mu; Bing, Zhang; Bing, Yan. (2010). Analytical strategies for detecting nanoparticle–protein interactions. *Analyst*. 1519-1530.
- [11] Capriotti, Anna Laura; Caracciolo, Giulo; Cavaliere, Chiara; et ál. (2014). Analytical Methods for Characterizing the Nanoparticle- Protein Corona. *Chromatographia*. 755-769.
- [12] Mahmoudi, Morteza; Lynch, Iseult; Ejtehadi, Mohammad Reza; et ál. (2011). Protein-Nanoparticle Interactions: Opportunities and Challenges. *Chemical Reviews*. 5610-5637.
- [13] Saptarshi, Shruti; Duschl, Albert; Lopata, Andreas L. (2013). Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *Journal of nanobiotechnology*. 26.

Bibliografía

[14] Gref, R; et ál. (2013). Adsorption of plasma proteins on uncoated PLGA nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 53-60.

[15] Jedlovszky-Hajdu, Angela; Bombelli, Francesca Baldelli; Monopoli, Marco P; et ál. (2012). Surface Coatings Shape the Proteins Corona of SPIONs with Relevance to their Application in Vivo. *Langmuir*. 14983-14991.

[16] Pozebon, D; Scheffler, G. L; Dressler, V. L; et ál. (2014). Review of the applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) to the analysis of biological samples. *JAAS*. 2204-2228.

[17] Jiménez, M.S; Rodríguez, L; Gómez, M.T; Castillo, J.R. et ál. (2013). Assessment of metals bound to marine plankton proteins and to dissolved proteins in seawater. *Analytica Chimica Acta*. 59-65.

[18] Jiménez, M.S; Rodríguez, L; Bertolín, J.R; Gómez, M.T; Castillo, J.R. et ál. (2013). 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*. 359-368.

[19] Konz, I; Fernández, B; Fernández, M.L. (2012). Laser ablation ICP-MS for quantitative biomedical applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2113-2125.

[20] Ran, C; Poonam, C; Ryan, N; Priyaca, B; Jared, M; Brown, Pu; Chun, Ke. (2012). Interaction of lipid vesicle with silver nanoparticle- serum albumin protein corona. *Applied Physics Letters*. 013703.

[21] Hames, B. (2002). Preparative gel electrophoresis. In *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach* (3rd ed; p. 372). Oxford University Press.

[22] Miller, J; Miller, J. (2002). Métodos de calibración en análisis instrumental: Regresión y Correlación. In *Estadística y Quimiometría para Química Analítica* (4th ed; pp. 135-140). Prentice Hall.

[23] Harris, D. (2007). Métodos de calibrado. In *Análisis químico cuantitativo* (3 rd ed; pp. 80-99). Reverté.

[24] Shannahan, Jonathan H; Xianyin, Lai; Ke, Pu Chun; Podila, Ramakrishna; Brown, Jared M; Witzmann, Frank A. (2013). Silver Nanoparticle Protein Corona Composition in Cell Culture Media. *Plos one*. e74001.

[25] Jiménez Lamana, Javier. (2013). Nanometrología analítica: métodos analíticos para la detección, caracterización y cuantificación de nanopartículas sintéticas (tesis doctoral). Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España.