



Universidad de Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PARTÍCULAS COLOIDALES
A PARTIR DE PROTEÍNAS VEGETALES HIDROFÓBICAS
RICAS EN PROLINA**

ISABEL CANAL NOVAL

Julio 2016, Oviedo



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Centro Internacional de Postgrado
Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas

Rosana Badia Laiño y Jorge Ruiz Encinar, Profesores del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICAN:

Que el presente Trabajo, titulado **“Obtención y caracterización de partículas coloidales a partir de proteínas vegetales hidrofóbicas ricas en prolina”**

ha sido realizado por el alumno **Isabel Canal Noval** bajo nuestra dirección, constituyendo su Trabajo Fin de Máster del Máster Internacional en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo en el curso académico 2015-16, y cuya presentación autorizamos.

Oviedo, 14 de Julio de 2016

Fdo: Rosana Badia Laiño

Fdo: Jorge Ruiz Encinar

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a Rosana Badía Laiño y Jorge Ruiz Encinar, profesores de la Universidad de Oviedo, por darme la oportunidad de trabajar en sus grupos de investigación, así como por su ayuda durante la realización del proyecto.

A todos los compañeros del laboratorio de investigación por su ayuda durante la estancia.

Por último, a mis padres y hermana, a Amaia, Fran, Raúl y demás compañeros del máster por todo su apoyo, ayuda y amistad durante todo el curso, convirtiendo este año en uno de los más gratos tanto en el ámbito profesional como personal.

A todos vosotros, un profundo y merecido agradecimiento.

Isabel

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. NANOTECNOLOGÍA	1
1.1.1 NANOPARTÍCULAS DE ORO	2
1.1.2 ZEÍNA	4
1.1.3 ENCAPSULACIÓN DE NPs EN BIOMOLÉCULAS PROTÉICAS	9
1.1.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS	11
2. OBJETIVOS GENERALES	19
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. MÉTODOS	20
3.1. REACTIVOS	20
3.2. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE AuNP	20
3.3. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PEG-ZEÍNA	20
3.4. ENCAPSULACIÓN DE LAS AuNPs EN ZEÍNA	21
3.5. TÉCNICAS INSTRUMENTALES DE CARACTERIZACIÓN	21
3.6. SEPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS POR AF4	22
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1. Síntesis y caracterización de AuNPs	23
4.2. Síntesis y caracterización de PEG-zeína	26
4.3. Encapsulación de AuNPs en cápsulas de PEG-zeína	30
4.4. SEPARACIÓN DE AuNPs Y ZEÍNA POR AF4	34
4.4.1 ESTUDIOS PRELIMINARES DE AF4	34
4.4.2 ANÁLISIS ELEMENTAL AF4 – ICPMS	36
5. CONCLUSIONES	41
6. BIBLIOGRAFÍA	42

1. INTRODUCCIÓN

1.1. NANOTECNOLOGÍA

La nanotecnología es, según la RAE la “tecnología de los materiales y de las estructuras en la que el orden de magnitud se mide en nanómetros, con aplicación a la física, la química y la biología”. Sin embargo sería más acorde referirse a ella como ciencia, aunque el término *nanociencia* no está reconocido, ya que abarca no sólo el aspecto tecnológico sino también una serie de conocimientos sistemáticamente estructurados, de los que se deducen principios y leyes generales con capacidad predictiva y comprobables experimentalmente.

Esta ciencia es un emergente campo en desarrollo del que se sirven multitud de disciplinas científicas, especialmente en biomedicina donde tiene aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico de enfermedades. Además, tiene un impacto socio económico en prácticamente todos los campos de la industria.

Las nanopartículas poliméricas son un término colectivo empleado para las nanocápsulas y nanoesferas. Éstas tienen propiedades diferentes a los de los mismos materiales en tamaños convencionales permitiendo así una rápida incorporación al entrar en contacto con el organismo.^{1,2} Las nanocápsulas son sistemas vesiculares en los cuales la sustancia con actividad biológica está confinado en una cavidad o núcleo rodeado por una membrana polimérica (Figura 1), mientras que las nanoesferas son sistemas matriciales en los cuales la sustancia bioactiva se encuentra incrustado en la matriz polimérica de manera uniforme.³⁻⁶

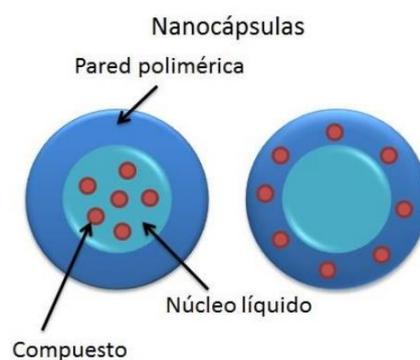


Figura 1: Representación de nanopartículas poliméricas

1.1.1 NANOPARTÍCULAS DE ORO

Las nanopartículas de oro (AuNPs) son una suspensión de oro coloidal, tienen un tamaño entre 2 y 150 nm⁷⁻¹⁰ y están dotadas de una gran variedad de aplicaciones en diversos campos de la nanotecnología, incluyendo:

- Catálisis: las AuNPs funcionan como catalizadores en reacciones químicas gracias a sus propiedades superficiales¹⁰
- Electrónicas: gracias a sus propiedades conductoras y electrónicas se pueden emplear en chips electrónicos¹¹
- Biología: las propiedades físico-químicas de las AuNPs permiten su uso como sondas en distintos tipos de técnicas microscópicas y espectroscópicas, muchas asociadas a la obtención de imágenes en biología¹²
- Farmacéutica: el uso de AuNPs está extendido como vehículos para el transporte de fármacos u otros compuestos bioactivos adheridos a su superficie constituyendo así un reto de la biomedicina y nanotecnología.¹²⁻¹⁵
- Médica: campo donde están más utilizadas las AuNPs gracias a sus aplicaciones en diagnósticos de enfermedades y cáncer. La combinación de la funcionalización superficial de las AuNPs y las técnicas para su detección permiten su uso en técnicas de diagnóstico como, por ejemplo, inmunoensayos.¹² Por otro lado, las AuNPs son capaces de absorber luz cercana al infrarrojo, produciendo calor y tratar así tumores que las contienen, proceso conocido como terapia fototermal o fotodinámica.^{12,17}

SÍNTESIS DE AUNPs

Existen diversas técnicas de síntesis de AuNPs, gracias a las cuales se ha conseguido generar un amplio espectro de distintos tamaños y funcionalidades. La síntesis descrita con más profundidad es conocida como “método de Turkevich” e involucra la reducción de iones oro presentes en una disolución acuosa con citrato de sodio.¹⁴ La preparación por reducción química consta de dos partes fundamentales:

- Reducción de un precursor de oro utilizando agentes reductores adecuados, como citrato sódico o borohidruro, obteniéndose oro elemental.
- Estabilización de las nanopartículas obtenidas mediante agentes atrapadores o estabilizantes, como citrato sódico, previniendo la agregación de las nanopartículas y evitando la formación de un precipitado metálico.¹⁷

En relación al último punto, es importante mantener el estado monodisperso de las AuNPs. Debido a la naturaleza hidrofóbica, las nanopartículas metálicas tienden a agregarse en

complejos mayores mediante fuerzas de Van der Waals. El agente estabilizante aporta cargas negativas que inducen fuerzas de repulsión entre las partículas. ¹⁸

Se pueden distinguir tres fases en la estructura típica de la AuNP sintetizada por reducción química (Figura 2): una agrupación cristalina interior de átomos de oro empaquetados (átomos centrales), capas exteriores de átomos expuestos en la superficie (átomos superficiales) y moléculas o ligandos de tipo orgánico o tensioactivos ligados a la superficie más externa de la nanopartícula. Las distintas propiedades características de los distintos tipos de AuNPs residen, además de en el tamaño, en la variedad molecular superficial. ¹⁷

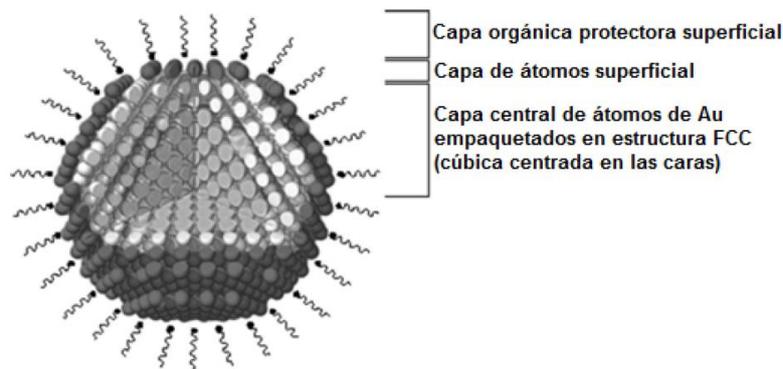


Figura 2: Modelo estructural de la nanopartícula de oro

La preparación de AuNPs de alta calidad requiere de un control adecuado del tamaño y la forma de la nanopartícula, así como de una estabilización efectiva y un control de la funcionalización superficial. ¹⁹

El método de Turkevich consiste en calentar a ebullición una disolución acuosa de HAuCl_4 y añadir una solución de citrato sódico empleando una agitación vigorosa. Tras unos minutos, se obtiene una suspensión coloidal de oro de color rojiza con un tamaño aproximado de 20 nm. En este método, los iones de oro (III) son reducidos por los iones citrato para producir oro elemental y, además, los iones citrato actúan también como un agente estabilizante que permite cubrir la superficie de las nanopartículas de oro producidas y evitar así su posible agregación.

La proporción citrato/ Au^{3+} permite controlar el tamaño de las nanopartículas de oro que se sintetizan de tal forma que al incrementar la concentración relativa del reductor citrato, el tamaño de las nanopartículas de oro sintetizadas decrece como consecuencia del carácter estabilizador del citrato. Por otro lado, una concentración menor de citrato provoca un

recubrimiento incompleto de las AuNPs causando un proceso de agregación que tiene como consecuencia la formación de nanopartículas de mayor tamaño.^{19,20}

A pesar de que el tamaño es importante en la síntesis de AuNPs, éste no es el único factor a tener en cuenta cuando se desea emplearlas en alguna aplicación práctica. Las condiciones del proceso necesitan controlarse de manera que se obtengan nanopartículas que cumplan las siguientes características:

- Tamaño similar de todas las partículas para obtener muestras monodispersas
- Forma o morfología idéntica
- Estructura cristalina
- Ausencia de fenómenos de agregación de forma que, si tiene lugar la aglomeración, las nanopartículas sean capaces de ser dispersadas con facilidad²¹

1.1.2 ZEÍNA

El maíz, *Zea mays* L, originario de México e introducido a Europa en el siglo XVI, es uno de los granos alimenticios más antiguos utilizados por el hombre. El maíz es una planta que tiene múltiples usos y que puede ser utilizada en varias etapas de su desarrollo, desde las mazorcas muy jóvenes hasta las mazorcas verdes tiernas y los granos ya maduros.

En relación con la Tabla 1 se observa como después del almidón, las proteínas representan el segundo componente químico por orden de importancia del grano de maíz. El contenido de proteínas de las variedades comunes de maíz oscila entre el 7,5 y el 12 por ciento del peso seco del grano. Alrededor del 75% de las proteínas presentes en el grano de maíz se encuentran en el endospermo y el resto de las proteínas están distribuidas entre el germen y el salvado.

Tabla 1: Distribución de los componentes mayoritarios del grano de maíz (Shukla y Cheryan, 2001)²²

Componente	Grano entero (%)	Porcentaje en Peso seco (%)			
		Endospermo	Germen	Pericarpio	Pedículo
Almidón	62,0	87,0	8,3	7,3	5,3
Proteína	7,8	8,0	18,4	3,7	9,1
Aceite	3,8	0,8	33,2	1,0	3,8
Cenizas	1,2	0,3	10,5	0,8	1,6
Otros	10,2	3,9	29,6	87,2	80,2
Agua	15,0	0	-	-	-

Las proteínas de los granos del maíz han sido estudiadas ampliamente por Shukla y Cheryan (2001) y están formadas por cuatro fracciones distintas definidas principalmente por su solubilidad en distintos disolventes (Tabla 2)²².

Tabla 2: Distribución de las fracciones proteicas en el maíz (% base seca) (Shukla y Cheryan, 2001)²²

Proteína	Solubilidad	Grano entero	Endospermo	Germen
Albuminas	Agua	8	4	30
Globulinas	Sal	9	4	30
Glutelinas	Álcali	40	39	25
Zeína	Alcohol	39	47	5

La zeína pertenece a la clase de proteínas conocidas como prolaminas, que se encuentran específicamente en cereales.^{23,24} La zeína fue nombrada así por John Gorham (1821) y ha sido de interés científico desde su aislamiento en 1981²². Su característica insolubilidad en agua y su deficiencia en aminoácidos esenciales, como lisina y triptófano, hace que sea pobre en calidad nutricional y limita su uso en productos de alimentación, por lo que su principal objetivo desde mediados del siglo XX ha sido su posible utilización como polímero de uso industrial.²²

La zeína es la proteína de reserva mayoritaria del grano de maíz y comprende del 40-50% de la proteína total. Ésta se encuentra localizada en “cuerpos” de aproximadamente 1 μ m distribuidos uniformemente por el citoplasma de las células del endospermo del grano. Se identificó por primera vez en 1897 en base a su solubilidad en soluciones etanólicas (60-95%).^{22,24,25} El comportamiento de su solubilidad está determinado por su alta proporción de residuos de aminoácidos no polares, como son leucina (20%), prolina (10%) y alanina (10%) y su deficiencia en aminoácidos básico o ácidos (Tabla 3)^{26,27}. La ausencia notable de triptófano y lisina es la responsable de la insolubilidad de la zeína en agua. En el maíz, la zeína está presente como una mezcla heterogénea de agregados unidos a disulfuro con un peso molecular variable de hasta 44 000 Da.²²

La zeína es una mezcla de péptidos de diferentes pesos moleculares, solubilidad y carga. Las dos fracciones mayoritarias presentes en la zeína son la α y β , ambas fueron descritas por primera vez por McKinney (1958). La β -zeína es soluble en etanol 60% e insoluble en etanol 95%, y representa el 20% del total de la zeína presente en el grano de maíz, ésta a diferencia de la α -zeína no se encuentra en preparaciones industriales debido a su baja estabilidad ya que precipita y coagula con facilidad. La α -zeína se definió como la prolamina del maíz, ésta es soluble en etanol al 95% y representa el 80% del total de la prolamina presente en el maíz. La α -zeína contiene menos histidina, arginina, prolina y metionina que la β -zeína.²²

Para la extracción de la proteína se debe tomar en consideración la proporción de aminoácidos no polares en la zeína (Tabla 3). Así, es posible predecir que el tipo de disolventes empleados para la solubilización y la extracción de la proteína deben contener grupos tanto

polares como no polares.²² Las soluciones acuosas de etanol han sido empleadas ampliamente para la producción comercial de zeína, mostrando una buena solubilidad de la proteína en soluciones del 50-90% de etanol.²⁸

Tabla 3: Composición de aminoácidos de la zeína (de Shukla y Cheryan, 2001)

Clasificación	Aminoácido	Zeína nativa Mossé (1961)	Zeína comercial Pomes (1971)
No polar	Glicina	0.0	0.7
	Alanina	10.52	8.3
	Valina	3.98	3.1
	Leucina	21.1	19.3
	Isoleucina	5.0	6.2
	Fenilalanina	7.3	6.8
	Triptófano	0.16	NR*
	Prolina	10.53	9.0
	Serina	7.05	5.7
-OH	Treonina	3.45	2.7
	Tirosina	5.25	5.1
-S	Metionina	2.41	2.0
	Cisteína	0.83	0.8
Básico	Lisina	0.0	NR
	Arginina	4.71	1.8
	Histidina	1.32	1.1
	Asparagina	NR	4.5
	Glutamina	NR	21.4
Ácido	Acido aspártico	4.61	NR
	Acido glutámico	26.9	1.5

El uso de la zeína en muchas de sus aplicaciones se ha visto obstaculizado por su coloración amarilla²⁹ que se debe a pigmentos presentes en el maíz como son las xantofilas, los carotenoides y otros compuestos asociados con las proteínas hidrófobas, como la zeína. Además, el uso de disolventes como tolueno, éter de petróleo, benzol, etanol o propanol no penetran en la matriz de la zeína lo suficiente como para remover todas las impurezas. El gran volumen empleado de estos disolventes, al no ser de grado alimentario, limita el uso de la proteína blanqueada para aplicaciones tanto farmacéuticas como alimentarias.²² Una posible alternativa es el uso de membranas para purificar la zeína, concentrar la disolución y reusar el disolvente de extracción. Cheryan (1998) propone el uso de membranas como un proceso de baja energía y bajo coste de operación para la obtención de zeína comercial.

Debido a su alta hidrofobicidad, la zeína puede formar recubrimientos duros, brillantes, hidrófobos, impermeables, flexibles y compresibles. La zeína ha sido aplicada exitosamente como material para la formación de películas,^{24,25} recubrimientos,³⁰ microsferas y

microcápsulas²⁵⁻²⁹ para el atrapamiento y la liberación controlada de fármacos, aceites esenciales o micronutrientes en el área farmacéutica y alimentaria.

La zeína, a pesar de su deficiencia en aminoácidos esenciales, tiene valor farmacéutico gracias a que la α -zeína produce péptidos inhibidores de la enzima que produce angiotensinas (ECA), reduciendo la presión sanguínea.

En 2005, Parris et al.²⁹ propusieron la encapsulación de aceites esenciales en nanoesferas a base de zeína como vehículo para maximizar las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales a través de la liberación de los mismos en sitios específicos. Estas nanoesferas presentaron un interesante potencial para su aplicación en forma oral o inyectable, debido a que presentan una rápida liberación en el intestino grueso. Zhong et al (2009)²⁸ propuso la encapsulación de aceite de pescado en partículas a base de zeína mediante el método de dispersión líquido-líquido propuesto inicialmente por O'Donnel et al (2007) el cual se basa en la manipulación de la zeína en base a su solubilidad en soluciones etanólicas y el cual consta de tres mecanismos competitivos: i) ruptura de las gotas de la disolución por fuerza de cizallamiento, ii) solidificación de la zeína durante la eliminación del solvente y iii) coalescencia de las gotas análogas en sistemas de emulsión. Concluye que el método de dispersión líquido-líquido es un método rápido y sencillo, escalable y pudiendo ser aplicado para la encapsulación de una gran variedad de compuestos lipofílicos.^{28,29}

SÍNTESIS DE NPs DE ZEÍNA

Las micelas son estructuras nanoscópicas formadas al autoensamblarse moléculas anfifílicas de forma espontánea. En un ambiente acuoso, las micelas son estructuras esféricas donde el segmento hidrofóbico forma el núcleo de la estructura y la parte hidrofílica se orientará hacia la zona exterior (Figura 3).

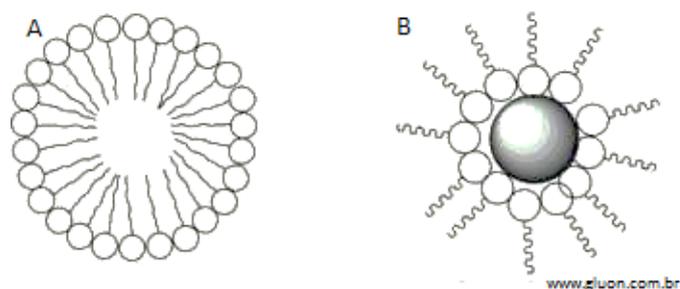


Figura 3: Estructura de las micelas. (A) micela. (B) Micela inversa.

Agentes terapéuticos y de diagnóstico insolubles en agua se encapsulan dentro del núcleo hidrofóbico de la micela con el fin de adquirir ventajas tales como una mejor solubilidad en agua, estabilidad y biodistribución. Gracias al pequeño tamaño de las micelas, éstas atraviesan los tejidos vasculares y se almacenan en el tejido tumoral, adquiriendo una gran ventaja frente a los fármacos anticancerígenos ya que se aumenta la permeabilidad y la retención en el tumor.

Muchos materiales anfifílicos, como es el caso de la zeína, son conocidos por formar micelas, y la formación de éstas incluye surfactantes o polímeros. Estas moléculas a baja concentración y en ambiente acuoso están como monómeros pero, a medida que la concentración aumenta, tienden a agregarse. La concentración a la que tiene lugar esa agregación es conocida como Concentración Micelar Crítica (CMC), donde monómeros de las moléculas anfifílicas pasan a formar las micelas.

Las micelas en cuya síntesis está presente un polímero tienen mejor estabilidad, mayor eficiencia de encapsulación de un material o fármaco y menor toxicidad, que las micelas constituidas por surfactantes.

Los poliésteres y polipéptidos tienen como función la formación del núcleo del polímero, mientras que el polietilén glicol (PEG) o polivinil pirrolidona (PVP) son los constituyentes más comunes en la formación de la estructura hidrofílica de la micela.

La síntesis de la micela de zeína da como producto una micela polimérica que contiene a la zeína en la parte interior de la micela debido a su carácter hidrofóbico. La micela se prepara mediante la conjugación del metoxi polietilén glicol (mPEG) y la zeína, incubando la mezcla durante horas para la formación de las partículas y, como último paso de síntesis se adiciona glicina con el fin de parar la reacción ya que reacciona con restos del poliéster.³¹

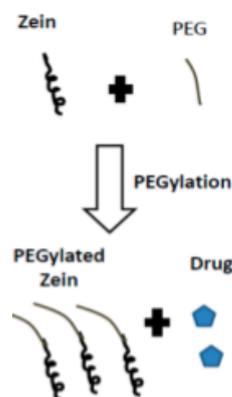


Figura 4: Representación esquemática de la síntesis de PEG-Zeína. Imagen de S. Podaralla et al. (2012)³⁴

Las nanopartículas formuladas a partir de polímeros son utilizadas como sistemas dispensadores gracias a que: ^{6,32}

- Mejoran la biodisponibilidad de compuestos bioactivos que presentan características pobres de absorción.
- Prolongan el tiempo de residencia de los bioactivos en el intestino
- Controlan la liberación de los compuestos con actividad biológica
- Dirigen la liberación del bioactivo a un órgano específico y reducen su toxicidad
- Reducen la irritación de la mucosa intestinal producida por el compuesto bioactivo
- Aseguran la estabilidad del bioactivo en el tracto gastrointestinal (TGI)

1.1.3 ENCAPSULACIÓN DE NPs EN BIOMOLÉCULAS PROTÉICAS

Las nanopartículas son capaces de unirse a biomoléculas, como pueden ser proteínas, obteniéndose uniformidad y buena dispersión³³. Tal y como se muestra en la Figura 5 pueden producirse tres tipos de interacciones entre las biomoléculas y las AuNPs, siendo éstas:

- Interacciones electrostáticas entre las cargas negativas de las NPs y las cargas positivas de residuos polares de los aminoácidos
- Adsorción directa sobre la superficie gracias a regiones hidrofóbicas que presentan las proteínas en su superficie
- Establecimiento de enlaces cuasi-covalentes entre los grupos tiol de los aminoácidos y los átomos del metal (Au)

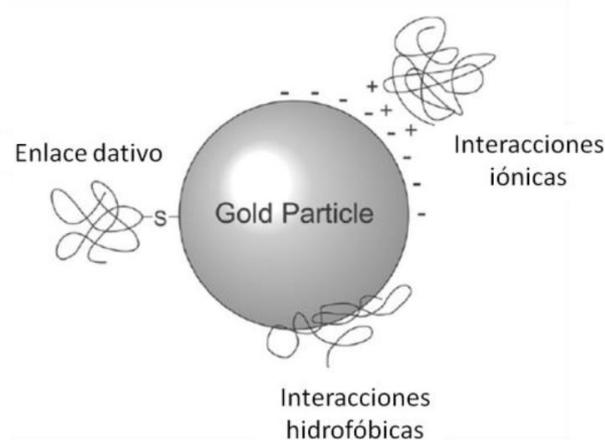


Figura 5: Interacciones que se establecen entre AuNPs y biomoléculas (proteínas). Imagen modificada del libro: *Bioconjugate Techniques, Second Edition, G. T. Hermanson (2008)*³⁴

Cualquier modificación que afecte a las interacciones entre las AuNPs y las biomoléculas puede llevar a la no encapsulación, pudiendo degradarse los reactivos de forma irreversible. Es de suma importancia que las nanopartículas mantengan a lo largo del proceso su carácter individual para generar conjugados reproducibles y con propiedades y tamaño deseado. Para ello, se debe evitar al máximo la agregación de éstas, proceso que se produce al perder la fuerza electrostática que las mantiene individuales. La agregación puede tener lugar de forma inevitable, la introducción de cationes de disoluciones reguladoras o buffer tienen como fin mantener a las micelas estables ya que cambios de pH conllevan a la desnaturalización y pérdida de funcionalidad.

Se ha comprobado que las cargas positivas de las biomoléculas son un punto clave en las interacciones con las AuNPs. De tal forma que el conocimiento del Punto Isoeléctrico (PI) de la proteína (pH al que la carga neta es cero) nos sirve para conocer el pH al cual se debe poner la disolución reguladora, y controlar así la carga de la biomolécula.

Mediante el control tanto de la molaridad máxima (fuerza iónica) que toleran las NPs antes de agregarse irreversiblemente y del PI de la proteína para saber el pH del buffer a emplear, se minimiza la agregación entre nanopartículas y se maximiza la cantidad de proteína unida a AuNPs. Otro aspecto relacionado con la conjugación es la cantidad de proteína necesaria para estabilizar la nanopartícula, evitando agregaciones posteriores que restan funcionalidad y reproducibilidad al conjugado.⁷

Es posible la caracterización de los compuestos formados por biomoléculas absorbidas a AuNPs mediante espectrometría Vis-UV.^{40,43} La unión de ambas provoca un desplazamiento en $\lambda_{\text{máx}}$ de aproximadamente 5 nm, que puede ser empleado para confirmar la formación del conjugado.

En un sistema nanoparticulado es importante el control del tamaño de partícula y la distribución de tamaños ya que determinan la estabilidad de las nanopartículas, la carga, toxicidad y liberación del activo.^{3,32} Un tamaño de partícula menor tiene mayor área superficial, por lo tanto, la mayoría de los activos asociados estarán más cerca de la superficie de la partícula, lo que conlleva a la liberación más rápida del activo. Al contrario, partículas de mayor tamaño poseen núcleos más grandes, permiten la encapsulación de más activo y una difusión de éste más paulatina. Además, menores tamaños de partícula tienen mayor riesgo de agregación de las partículas durante el almacenamiento y el transporte de la dispersión.

El reto del diseño de un sistema nanoparticulado es formular nanopartículas con el tamaño de partícula más pequeño y una mayor estabilidad. La degradación del polímero también puede verse afectada por el tamaño de partícula. Con fines a determinar el tamaño de partícula, el método más rápido y de rutina es por dispersión dinámica de luz (DLS), técnica explicada anteriormente en la caracterización de AuNPs.

Encapsulación

La carga del de las nanopartículas que se desean encapsular en la micela se puede llevar a cabo por dos métodos:

- Incorporación al momento de producción de las nanopartículas
- Absorción del activo después de la formación de las micelas, mediante la incubación del acarreador con una solución concentrada de AuNPs (Figura 6)

Tanto la carga del activo como la eficiencia de encapsulación dependen en gran medida de las características químicas del componente bioactivo y del polímero.^{3,32}

Se han desarrollado varias técnicas de encapsulación y gracias a ello las aplicaciones de estas técnicas son muy amplias. Existen sustancias empleadas para promover la rápida liberación de la sustancia activa contenidos en la micela mediante cambios de pH, estrés mecánico, temperatura, actividad enzimática, tiempo y fuerza osmótica.³⁵

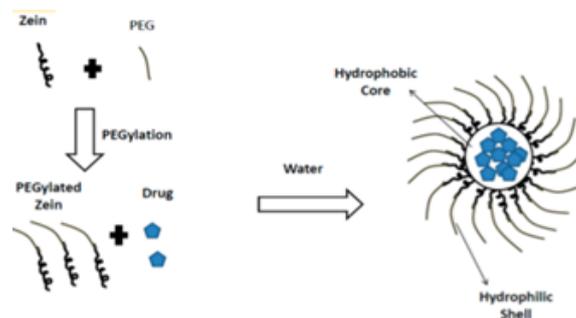


Figura 6: Representación esquemática de la formación de la micela de zeína con AuNP encapsuladas en su interior. Imagen de Podaralla et al. (2012)⁴⁵

1.1.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

La caracterización de materiales en escala nanométrica se centra en comportamientos colectivos de las nanopartículas, como puede ser la coloración de las AuNP. La coloración de las suspensiones de éstas en agua es conocida desde hace siglos y es posible relacionarla con concentración y diámetro de partícula. Sin embargo, si lo que se desea es una caracterización individual se debe emplear una instrumentación extremadamente sensible y exacta, además de una resolución a nivel atómico.

Técnicas microscópicas

Las técnicas microscópicas nos permiten observar la forma, tamaño, rugosidad tanto de biomoléculas como de partículas metálicas, así como la cristalinidad de estas últimas.

Los microscopios electrónicos cuentan con un cañón de electrones, una serie de lentes magnéticas que crean campos que dirigen y enfocan el haz de electrones hacia la muestra, y un sistema que registra las imágenes que producen los electrones al interactuar con la muestra. Una parte importante de un microscopio electrónico la constituye el sistema de vacío que impide que los electrones sean desviados por las moléculas de aire.

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

La microscopía Electrónica de Transmisión permite determinar el tamaño, forma, estructura interna y, a través de la difracción de electrones, la composición química de las nanopartículas.³⁶ El haz de electrones se dirige hacia la superficie de la muestra, una parte de los electrones incidentes penetran a través de la muestra dispersándose a medida que la atraviesan, se enfocan con la lente objetivo y se amplifican mediante la lente magnificadora para finalmente producir la imagen deseada. La imagen aumentada sobre una pantalla se forma gracias a electrones que se han transmitido a través de la nanopartícula. Los patrones de difracción de los electrones permiten determinar las constantes de redes de las partículas ayudando a la identificación de la especie. El límite teórico del poder de resolución de un microscopio electrónico está determinado por la longitud de onda del haz electrónico usado y la apertura numérica del sistema. El poder de resolución, R , se define como:

$$R = \frac{\lambda}{2 \cdot NA} \quad \text{Ecuación 1}$$

dónde λ es la longitud de onda de los electrones usados y NA es la apertura numérica, la cual está grabada sobre cada objetivo y sistema de lentes condensadoras y da una medida de la capacidad del objetivo para recolectar electrones o la capacidad del condensador para suministrar electrones.

La preparación de las muestras para su observación en TEM es sencilla, se realiza una dispersión de las nanopartículas en un disolvente y se deja secar sobre una rejilla.

Técnicas espectroscópicas

Las técnicas espectroscópicas se han usado ampliamente para la caracterización de nanomateriales. Estas técnicas se basan en el acoplamiento de la oscilación colectiva de los electrones de conducción libres y de la frecuencia de la radiación electromagnética incidente.

Este acoplamiento da lugar a las bandas de resonancia, conocidas como plasmones de superficie, lugar donde se produce la absorción.³⁷

Las técnicas espectroscópicas más habituales para la caracterización de estas nanopartículas son las siguientes:

Espectroscopía UV-Vis

Los nanomateriales pueden interactuar con la radiación electromagnética produciendo fenómenos de absorción, fluorescencia o scattering (dispersión). Dependiendo de la naturaleza físico-química del nanomaterial podrán darse uno o varios de estos fenómenos.

La espectrofotometría UV-Vis es una de las técnicas más empleadas para la caracterización de AuNPs y permite conocer la concentración, forma, tamaño y homogeneidad de tamaño de las partículas de forma aproximada.

La espectroscopía describe la interacción entre la radiación, principalmente electromagnética, y la materia. Toda radiación electromagnética viene caracterizada por una longitud de onda (λ), una frecuencia (ν) o una energía (E), relacionadas mediante la ecuación de Planck:

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad \text{Ecuación 2}$$

dónde h es la constante de Planck ($6,6256 \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}\cdot\text{fotón}^{-1}$).

La luz visible o ultravioleta (I_0) incide sobre la muestra, una parte del haz la atraviesa (I) y la otra es absorbida por los electrones de valencia, siendo éstos promovidos a estados excitados. La fracción de radiación que logra traspasar la muestra se denomina transmitancia ($T = I/I_0$) y se puede relacionar con la absorbancia mediante la siguiente expresión:

$$A = -\log T \quad \text{Ecuación 3}$$

La absorción de luz por las moléculas puede relacionarse con la concentración de la especie absorbente de la muestra, en este caso AuNP, mediante la ley de Lambert-Beer³⁸:

$$A = \epsilon \cdot C \cdot l = -\log T = -\log \frac{I}{I_0} \quad \text{Ecuación 4}$$

dónde A es la absorbancia, ϵ es el coeficiente de absorptividad molar, l es el camino óptico, C es la concentración de la especie absorbente, I_0 es la intensidad de la luz monocromática incidente e I es la intensidad de la luz transmitida a través del material.

En base a la ecuación 4, al absorber radiación la muestra, a mayor concentración mayor será la absorbancia, y viceversa.

El espectro de absorción obtenido en el espectrofotómetro UV-Vis representa la absorbancia en función de la longitud de onda.

Las nanopartículas metálicas poseen un fenómeno físico denominado Plasmón Superficial (SPR) en el que los electrones de la banda de conducción son excitados por la radiación electromagnética incidente, produciendo una oscilación coherente de los mismos que conlleva la formación de un dipolo con un aumento del campo eléctrico de la superficie de la nanopartícula. Este campo eléctrico conlleva la fuerte absorción de la luz³⁹. En el caso de AuNP, este fenómeno se produce a longitudes de onda correspondientes a la región visible del espectro, siendo responsables de los colores que presentan las disoluciones de éstas.

Los espectros se centran en la banda de resonancia del SPR, en la que la posición y forma de esta banda está influenciada por diferentes factores tales como la naturaleza del metal, el medio circundante, el tamaño, la forma, la polidispersidad de las partículas y las sustancias adsorbidas en la superficie.^{39,40}

La concentración de las nanopartículas está relacionada con la absorbancia en el pico máximo de absorción, la homogeneidad de tamaño con el ancho del pico y el tamaño con la posición del pico, desplazándose hacia longitudes de onda menores cuando el tamaño de partícula decrece.⁴¹

Espectroscopía FT-IR

La región infrarroja (IR) está en un rango del espectro electromagnético que va desde 10^{12} a 10^{14} Hz. La energía con la que las moléculas y los cristales vibran se encuentra dentro de ese rango, de manera que es posible estudiar la interacción con la materia de la radiación electromagnética infrarroja, observando un intercambio de energía cuando se verifica la resonancia entre una cierta frecuencia vibracional y la frecuencia del haz incidente. Este intercambio de energía representa excitación de la vibración de enlaces químicos, siendo específico según el tipo de enlace y el grupo de átomos involucrados en la vibración.

La modalidad de transmisión en IR es una de las más comunes. En ella, la radiación atraviesa una muestra, la cual puede estar en estado sólido, líquido o gaseoso, y se compara la intensidad de la luz transmitida, I , con la incidente, I_0 . Se debe tener en cuenta que no toda la luz que incide sobre la muestra se transmite, ya que está presente una componente de reflexión, R , y otra de dispersión, D . Así, la energía medida por el detector no depende sólo de la reflexión y dispersión producida, escribiéndose la ley de Lambert-Beer en la forma:

$$I = (I_0 - R - D) \cdot 10^{\epsilon c} \quad \text{Ecuación 5}$$

Dónde ϵ es la absorptividad molar, l es el camino óptico recorrido por el rayo en la muestra y c es la concentración.

La introducción de la Transformada de Fourier (FT-IR) posibilita la optimización de la relación señal-ruido, permitiendo obtener buenos registros para el caso de especies moleculares absorbidas. Esta técnica aporta información relativa de enlaces de las moléculas orgánicas que protegen la superficie de las partículas, información de especial relevancia a la hora de determinar detalles estructurales de las monocapas formadas por dichas moléculas orgánicas.

Otras técnicas

Dispersión de luz dinámica (DLS)

Las AuNPs tienen como propiedad óptica la capacidad para dispersar la luz en todas las direcciones.

Las partículas en suspensión en un líquido se encuentran en continuo movimiento debido a choques con las moléculas del líquido que las rodean, fenómeno denominado *movimiento Browniano* o más conocido por su término en inglés "*Brownian motion*". La intensidad de la luz dispersa fluctúa en el tiempo debido a la suma de las diferentes fases constructivas y destructivas de las ondas de dicha luz a lo largo del movimiento de las partículas.

Los equipos de DLS miden la fluctuación de la intensidad de la luz a lo largo del tiempo gracias a un componente del equipo, denominado correlador, que mide la similitud entre la intensidad de la luz dispersada a dos períodos de tiempo diferente. Cuanto más rápido se mueva una partícula, gracias a su menor tamaño, las diferencias serán mayores ya que las interacciones constructivas y destructivas serán muy diferentes en cada punto, y, por tanto, la correlación disminuirá muy rápido con el tiempo. Al contrario, las partículas de mayor tamaño se mueven más despacio, y la correlación disminuye muy lenta con el tiempo.

Esta correlación sirve para calcular el coeficiente de difusión traslacional (D) que se relaciona con el tamaño (radio hidrodinámico, tamaño de la partícula incluida la capa de solvente cercana a su superficie) a través de la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{k \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot Dh} \quad \text{Ecuación 6}$$

dónde, k es la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta y η la viscosidad del líquido de la solución. De esta forma es capaz de ofrecer medidas del tamaño y distribución de tamaño

de las partículas, en nuestro caso de AuNPs y, posteriormente, del tamaño de las nanovesículas de zeína.⁴²⁻⁴⁴

Citometría de Flujo

La citometría de flujo es una técnica con aplicaciones en clínica capaz de medir tanto parámetros celulares intrínsecos (tamaño, superficie, granularidad, autofluorescencia) como extrínsecos (contenido y composición de ADN, proteínas, ARN, antígenos, entre otros).

Esta técnica se basa en conducir células en el seno de un fluido de forma que se alineen y pasen por una zona donde interactúan con una fuente luminosa. Múltiples propiedades físicas de cada célula o conjunto de células puede ser medido a velocidad del orden de 1000 células por segundo.

Un citómetro de flujo puede ser considerado como un microscopio de fluorescencia modificado y consiste en una cámara de flujo, una o varias fuentes de luz, sistemas de recolección de luz y un sistema electrónico.

Fraccionamiento en flujo de campo de flujo asimétrico (AF4)

La técnica de AF4 permite la separación y fraccionamiento de partículas que se encuentran en una escala de tamaño desde nano hasta micrómetros.

Inicialmente se desarrolló para el análisis de polímeros⁴⁵⁻⁴⁷ y en la última década se ha extendido su aplicación a nanopartículas y partículas coloidales. La principal ventaja que tiene esta técnica frente a otras es su capacidad para proporcionar información de tamaño, separar y fraccionar muestras complejas con la mínima interacción entre los analitos y el canal de separación⁴⁸, basándose en fuerzas hidrodinámicas que proporcionan una separación basada en la difusión de los analitos en el canal basado por su tamaño y forma.

La separación consiste en la inyección de analitos en el canal que son transportados por un flujo y, a continuación, aplicar un campo externo (conocido por su término en inglés “*cross flow*”) perpendicular al flujo del canal cuya función es la de retener parcialmente, y por tanto fraccionar, partículas de acuerdo a sus distintas propiedades físico-químicas. El “*cross flow*” es el principal factor que controla el tiempo de retención de las partículas en sistemas de fraccionamiento en flujo.^{49,50}

A la inyección de la muestra y focalización le sigue, finalmente, la separación de la muestra. La focalización consiste en centrar la muestra inyectada en una banda lo más estrecha

posible intentando evitar efectos de sobrecarga ya que provocan interacciones entre las especies y el propio canal, modificando los tiempos de retención.

Para la separación existen diferentes modos de elución para partículas que se encuentran en un rango de escala de nanómetros. En el modo normal de elución, la separación por AF4 se basa en los coeficientes de difusión relativos de las partículas que son, a su vez, función del tamaño de partícula (volumen hidrodinámico), siendo las más pequeñas las que primero eluyen.

Rameshwar et al.⁵¹ demostraron la posibilidad de separar AuNP en fracciones de distintos tamaños mediante el empleo de la técnica AF4. Artículos recientes como el publicado por Cho y Hackley⁵² demuestran las condiciones experimentales necesarias para realizar la separación optimizando parámetros tales como el volumen de inyección, la composición de la fase móvil, el tipo de membrana y el tamaño de poro.⁵³

Las características de pH, fuerza iónica y composición química de la fase móvil influyen en las propiedades electrostáticas de la membrana y de las nanopartículas, influyendo en su comportamiento fisicoquímico. La disolución portadora proporciona una carga con la misma polaridad eléctrica de la partícula y la membrana, con una suficiente repulsión electrostática para prevenir la interacción y pérdida de partículas en la membrana.

La estabilidad de las suspensiones acuosas de AuNPs se puede conseguir a través del uso de polímeros y surfactantes no iónicos como fase móvil ya que forman una capa absorbida que tiene un efecto estabilizante equilibrando las fuerzas atractivas y repulsivas. El empleo de surfactantes iónicos aumenta la carga superficial de la fase dispersa protegiendo a las AuNPs de adherirse unas a otras.

Una de las variables más importantes que influyen sobre la retención y fraccionamiento de nanopartículas es el “cross flow”. Las partículas más pequeñas requieren un mayor caudal para ser separadas adecuadamente. Flujos elevados conlleva tiempos de retención mayores y pérdidas de las partículas mayores de la muestra ya que se adhieren permanentemente a la membrana. En muestras con un amplio rango de tamaños lo adecuado es aplicar gradientes, reduciendo el caudal del flujo a lo largo del tiempo.

La señal que se obtiene tras el análisis se denomina fractograma. Al principio aparece un pico denominado “void peak” debido a especies no focalizadas que eluyen sin ser retenidas por la acción del “cross flow”.

Gracias a su versatilidad en términos de separación, selectividad y resolución, la técnica de fraccionamiento de flujo asimétrico puede acoplarse a un gran número de detectores. Generalmente se encuentra acoplado a un detector on-line de UV-Vis que cuenta con las ventajas de sencillez de operación y bajo coste, mientras que entre sus inconvenientes destaca una baja sensibilidad y selectividad para el análisis de nanomateriales. Como alternativa, se emplea la combinación de AF4 y espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) que proporciona una buena detección y posterior cuantificación de las nanopartículas gracias a alta sensibilidad y selectividad, además de la capacidad de análisis multielemental.⁵⁴⁻⁵⁶

A pesar de las ventajas que presenta la técnica AF4 en la caracterización de nanopartículas, ésta también presenta inconvenientes tales como largos tiempos de análisis (20 – 40 min por réplica) y trabajo laborioso ya que es necesario de optimizar parámetros que incluye a la fase móvil, membrana, espesor del canal y campo externo aplicado.

2. OBJETIVOS GENERALES

El Trabajo de Fin de Máster fija su objetivo científico en desarrollar sistemas dispensadores de fármacos con un mejor control de la liberación del fármaco, conjugando dos sistemas biocompatibles: micelas de zeína y nanopartículas de oro. Las micelas de zeína serán las encargadas de liberar a nivel del tracto digestivo las nanopartículas de oro. Desde un punto de vista básico se pretende estudiar la síntesis y caracterización de los sistemas duales micela – nanopartícula de oro.

Por otro lado, desde el punto de vista académico, se pretende:

- Conocer los fundamentos y manejo de numerosas técnicas instrumentales como por ejemplo: UV-Vis, Fluorescencia, AF4 y espectrometría de masas elemental, entre otras.
- Familiarizarse con la síntesis y modificación de nanopartículas.
- Desarrollar la capacidad crítica para la correcta interpretación de los resultados obtenidos, pudiendo sacar conclusiones de los mismos.
- Desarrollo de la capacidad de trabajo tanto individual como en equipo y la capacidad de solucionar problemas.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Preparación de AuNPs mediante el método de Turkevich para la obtención de nanopartículas de pequeño tamaño.
2. Caracterización de AuNPs mediante distintas técnicas que incluyen tanto métodos espectroscópicos como microscópicos, entre otros.
3. Formación de microestructuras basadas en zeína y estabilizadas con el polímero PEG.
4. Caracterización de las partículas de zeína mediante diversas técnicas.
5. Obtención de micelas de zeína con AuNP encapsuladas en su interior para poder ser utilizadas como sistemas de liberación de fármacos
6. Separación de AuNPs y zeína mediante la técnica de AF4 para la determinación y cuantificación de las nanopartículas encapsuladas en la proteína.

3. MÉTODOS

3.1. REACTIVOS

HAuCl₄·3H₂O (sólido con 99,9% de pureza; Sigma Aldrich, USA), citrato sódico (sólido con 99% de pureza; PRO-BYS, España), AgNO₃ (sólido con 99% de pureza; Sigma Aldrich, USA), zeína purificada (sólido; Across Organics, Bélgica), PEG (sólido con 90% de pureza; Sigma Aldrich, USA), glicina (sólido con 99% de pureza; Sigma Aldrich, USA), Tween20 (líquido viscoso; Sigma Aldrich, USA), etanol (líquido; Lichrosolv, Alemania) y agua Milli-Q. Para la diálisis se usaron membranas de celulosa de 25 mm (Sigma Aldrich, USA).

3.2. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE AuNP

Método de Turkevich

Las AuNPs fueron sintetizadas siguiendo el método clásico de Turkevich¹⁹ y el método desarrollado por Xia H. et al⁵⁷, basados ambos en la reducción y estabilización con citrato de una disolución de tetracloroaurato (III) de hidrógeno en medio acuoso.

Método clásico de Turkevich

Un volumen de 50mL de una disolución de tetracloroaurato (III) (HAuCl₄) (10⁻²% w/w) se calienta con agitación hasta el punto de ebullición. Una vez alcanzada, se añaden 1,5mL de citrato sódico (1% w/w) obteniéndose una disolución de color rojo.

Método de Turkevich modificado con AgNO₃

Se prepara una disolución de HAuCl₄ (0,5% w/v) y se toman 2mL de ésta mezclados con 85µL de AgNO₃ (0,1% w/v). A continuación, se añaden 3mL de citrato sódico (1% w/v) y la mezcla se incuba a reflujo (100°C) durante 1h en un volumen final de 100mL completado con agua desionizada. Se obtiene una disolución de color morado.

Tras la síntesis, la purificación de ambas nanopartículas obtenidas se lleva a cabo mediante diálisis en membranas de celulosa en agua con agitación (100rpm) a temperatura ambiente durante tres días para eliminar restos de reactivos de síntesis.

3.3. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PEG-ZEÍNA

PEGilación DE ZEÍNA

La síntesis de partículas de zeína se llevó a cabo a través del método descrito por Podaralla et al.⁴⁵ Se disuelven 0,1g de zeína pura (2g/mL-4,5·10⁻² M) en 50mL de una mezcla al 90% de alcohol – agua. A continuación, se añade 0,05g metoxi – PEG y se deja incubando la mezcla durante 3h con agitación suave (50rpm) a temperatura ambiente. Transcurrido el

tiempo, la reacción se para adicionando 0,5mL de glicina (1M) ya que se unirá al exceso del éster PEG. Se añaden 2,5mL de buffer citrato (pH=7,4), obteniéndose una mezcla turbia que es dializada empleando una membrana de celulosa en agua durante 24h con agitación (100rpm) a temperatura ambiente para eliminar restos de reactivos como PEG libre y etanol. Por último, se liofiliza la mezcla durante 24h para obtener como producto un sólido de PEG-zeína que se almacena a temperatura ambiente.

3.4. ENCAPSULACIÓN DE LAS AuNPs EN ZEÍNA

AuNP y PEG-zeína (100 mg) se disuelven en 20 mL de una mezcla al 90% de etanol – agua. Con agitación lenta (50 rpm) y a temperatura de 37°C se deja toda la noche para facilitar la formación de las micelas. De forma paralela y con el empleo de las mismas cantidades, se prepara un encapsulado de PEG-zeína con agua Milli-Q. Las mezclas se dializan con agua durante 24h para eliminar restos de etanol y AuNP libres que no han interactuado. El producto resultante se liofiliza hasta obtener un sólido.

3.5. TÉCNICAS INSTRUMENTALES DE CARACTERIZACIÓN

DLS

La evaluación del tamaño de las AuNPs, las micelas de zeína y el encapsulado se lleva a cabo mediante la técnica de dispersión de luz con el equipo de DLS Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). Para las AuNPs no se realiza tratamiento de muestra pero para las micelas de zeína y el encapsulado se dispersan 2mg del sólido en 10 mL de agua Milli-Q. Se emplea una cubeta ZEN0118 con la disolución acuosa y se registran las medidas de tamaño de partícula.

ATR-FTIR

Los espectros de AuNPs, micelas de zeína y encapsulado se obtienen mediante el empleo de un espectrómetro ATR – FTIR (Varian 670 – IR. FT – IR). Para las AuNPs se coloca una gota de disolución sobre el cristal de diamante. Se quiere confirmar la formación tanto de las micelas de zeína como del encapsulado, para ello se registrarán los espectros de los reactivos también. En este caso, se coloca el sólido de zeína pura, éster de m – PEG, PEG – zeína y del encapsulado de zeína sobre el cristal de diamante. Para todas las muestras se realiza una medida de 16 barridos.

MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA (TEM)

La morfología y tamaño de las nanopartículas de oro se analiza por TEM (JEOL – 2000 EX-II) a un voltaje de 200kV, por análisis de la suspensión acuosa sin tratamiento previo. Para observar la morfología de las micelas de zeína y del encapsulado es necesario dispersar 2mg del sólido obtenido como producto de las síntesis en 20mL de agua desionizada. Las muestras se

dejan secar sobre la rejilla y se toman las imágenes con 300 000 aumentos para el caso de la micela y nanopartículas de oro y a 100 000 aumentos para el caso del encapsulado.

UV-VIS

Los espectros de radiación UV-Vis de AuNPs, micelas de zeína y encapsulado se adquieren con un espectrómetro UV-Vis (Perkin Elmer Lambda 900 UV/VIS/NIR) donde se registrarán la medida de absorbancia en un rango de longitud de onda comprendido entre 250 y 800 nm. En una cubeta de cuarzo se coloca agua desionizada para realizar el blanco y registrar así la línea base con una transmitancia de 100% y absorbancia de 0%. A continuación, se introducen 3mL de la disolución acuosa en la cubeta de cuarzo y se obtiene el espectro de absorción.

FLUORESCENCIA

Se evalúa la fluorescencia de la zeína, de la micela y del encapsulado con un espectrómetro fluorescente (Varian, Cary Eclipse). Se registran medidas para obtener los picos de excitación y de emisión y, así, determinar si es fluorescente el compuesto.

CITOMETRÍA DE FLUJO

En un citómetro de flujo (Separador-Analizador Celular MoFlo XDP, Beckman Coulter) se registrará la señal recogida por un detector de fluorescencia para muestras suspendidas en agua de peg-zeína y micelas de zeína con AuNP encapsuladas. A través de la muestra inciden tres láseres: láser diodo violeta (405 nm), láser de estado sólido azul (488 nm) y láser diodo rojo (635 nm).

3.6. SEPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS POR AF4

Las muestras de AuNPs, PEG – zeína y micelas de zeína encapsuladas se van a separar con un sistema de AF4 (AF2000 Focus Postnova Analytics Inc). Para las paredes de acumulación se emplean membranas de celulosa regenerada de tamaño de corte de 10 kDa. Se optimiza el método de trabajo variando el “cross flow”, el gradiente de este flujo, el flujo saliente al detector y la fase transportadora. Como fase transportadora se emplea agua Milli-Q que contiene 0,02% de Tween 20.

Tras fraccionar y separar, el equipo se acopla a un detector ICP-MS (Agilent 8800). La naturaleza del triple cuadrupolo (ICP-QQQ) permite una detección libre de interferencias. Se introduce oxígeno en la celda de reacción con un flujo de 0,35 mL/min y se registra las masas de S y Au de forma ($^{32}\text{S}^+ \rightarrow ^{48}\text{SO}^+$ y $^{197}\text{Au}^+ \rightarrow ^{197}\text{Au}^+$). Los picos del fractograma se integran usando el software MassHunter (Agilent). El tiempo de integración para cada isótopo es de 0,1 s.

Pueden existir interacciones no deseadas entre las nanopartículas y la membrana o superficies del canal. Para conocer la pérdida de muestra (“recovery”) se va a medir las muestras inyectándolas y aplicando “cross-flow” y sin aplicarlo, a continuación se comparan las áreas de los picos. Los áreas deben añadir el “void peak” y el pico del analito.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Síntesis y caracterización de AuNPs

La preparación de AuNPs se llevó a cabo mediante el empleo de dos síntesis que se realizaron de forma paralela. Las síntesis en cuestión fueron el método clásico de Turkevich donde se obtuvo una disolución de color rojo brillante y una variación del método de Turkevich en presencia de AgNO_3 donde, en este caso, el color de la disolución fue morado. El color de la disolución va asociado al tamaño de partícula, siendo teóricamente las disoluciones de color rojo las que presenten AuNPs de menor tamaño¹⁹ en comparación con las disoluciones de color morado.

La caracterización de AuNPs se lleva a cabo mediante el empleo de varias técnicas, donde lo más importante va a ser la evaluación del tamaño de partícula ya que se busca que sean pequeñas.

En primer lugar, se emplea la técnica de DLS donde para que el programa estime el diámetro hidrodinámico es necesario fijar el índice de refracción de la nanopartícula, la constante dieléctrica del medio y la absorción del agua a 570 nm.

Los resultados obtenidos para ambas AuNP se ven reflejados en la Tabla 4 donde figura la temperatura (T), el diámetro hidrodinámico (D) y el índice de poli-dispersibilidad (PDI). El PDI está asociado con la heterogeneidad de la distribución de tamaños de las partículas y toma valores entre 0,1 y 0,3 para los sistemas monodispersos siendo 0,1 para sistemas ideales con una distribución gaussiana aumentando su valor a medida que aumenta el ancho de la distribución. Las medidas se realizaron por triplicado, mostrándose únicamente la media de los resultados y la desviación estándar.

Tabla 4: Resultados de tamaño y dispersión de las nanopartículas de oro por DLS

		T (°C)	PDI	D (NM)
MÉTODO CLÁSICO TURKEVICH	AuNPs	20	$0,26 \pm 0,03$	$18,9 \pm 0,7$
MÉTODO MODIFICADO	AuNPs	20	$0,662 \pm 0,004$	$1,2 \pm 0,5$

A partir de la Tabla 4 se observa cómo se obtiene el valor de PDI en un rango entre 0,1 y 0,3 para las AuNPs resultantes como producto del método clásico de Turkevich, indicando la monodispersidad de la muestra y fuera de ese rango para aquellas obtenidas a través del método de Turkevich modificado.

Los datos para las AuNPs obtenidas por el método donde se emplea AgNO_3 no son determinantes debido a que el valor de PDI es muy elevado y, además, el tamaño de la nanopartícula obtenida no concuerda con los valores reflejados en la bibliografía para disoluciones de color morado. El valor de PDI elevado determina que las partículas poseen tamaños muy variables y polidispersos dado que la síntesis fue modificada con AgNO_3 , es posible que restos de Ag^+ estén presentes en la disolución y, por tanto, el valor de índice de refracción variaría con respecto al que se fijó inicialmente para realizar la medida, provocando un error en ésta. El propio equipo durante la medida alertó de errores en la polidispersibilidad de la muestra.

Otra manera de poder evaluar los diámetros de las partículas es a través de los espectros de radiación VIS – UV.

El diámetro es posible determinarlo a partir del máximo de absorbancia (Figura 7) de acuerdo a lo descrito según *Haiss, W. et al*⁵⁹ y los cálculos de concentración se realizan según lo descrito por *Lui X. et al.*⁵⁸

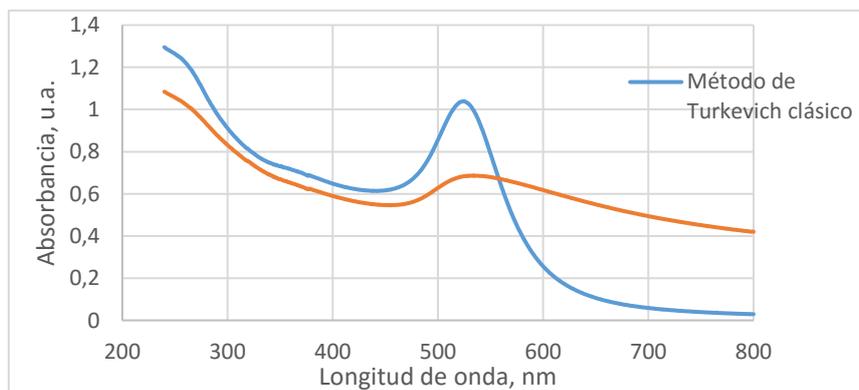


Figura 7: Espectros de absorción para las nanopartículas de oro

A partir del espectro reflejado en la Figura 7 se obtienen los valores aproximados de diámetro y concentración presentes en la Tabla 5. Para las AuNPs obtenidas por el método de Turkevich clásico se observa cómo se registra un pico con un máximo de absorbancia a 524,5 nm. Sin embargo, para las AuNPs modificadas con Ag se observa cómo se ha producido un ligero desplazamiento del máximo a la zona ultravioleta, fijándose en este caso el máximo de

absorbancia a una longitud de onda de 525,5 nm. Además, se obtiene un pico ancho que significa una distribución de tamaños de partículas más dispersadas.

Tabla 5: Resultados de diámetro y concentración obtenidos a partir del espectro de absorbancia de las nanopartículas de oro

AUNP	MÁXIMO DE ABSORBANCIA (NM)	D (NM)	CONCENTRACIÓN (M)
TURKEVICH CLÁSICO	524,5	18	$1,1 \cdot 10^{-9}$
TURKEVICH MODIFICADO	525,5	6	$9,1 \cdot 10^{-8}$

Por último, las AuNPs fueron caracterizadas morfológicamente por HRTEM. Se observa como las AuNPs cuya síntesis contenía Ag presentan agregados (Figura 9A) mientras que las que se obtuvieron con el método de Turkevich clásico (Figura 9B) son nanopartículas esféricas, presentan un tamaño uniforme y, además, presentan una estructura cristalina. La estructura cristalina de las AuNPs es cúbica centrada en las caras (FCC) para los átomos de oro y ésta se ha determinado gracias al patrón SAED (difracción en un área seleccionada) (Figura 9C). Con las imágenes obtenidas en HRTEM se calcula el tamaño de las nanopartículas que no contienen Ag ya que al no estar agregadas serán las que se empleen para encapsular en la proteína de zeína. El tamaño de las AuNP es 20 ± 3 nm, dato que concuerda con el valor obtenido por DLS.

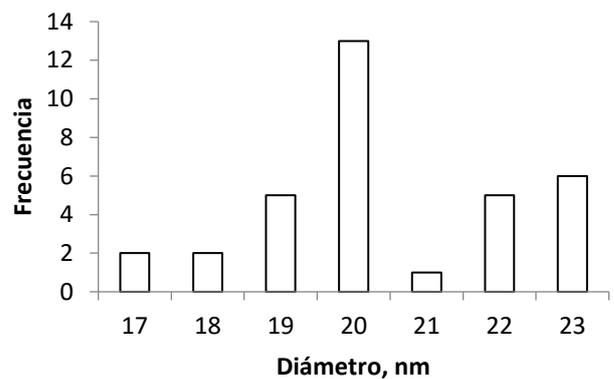
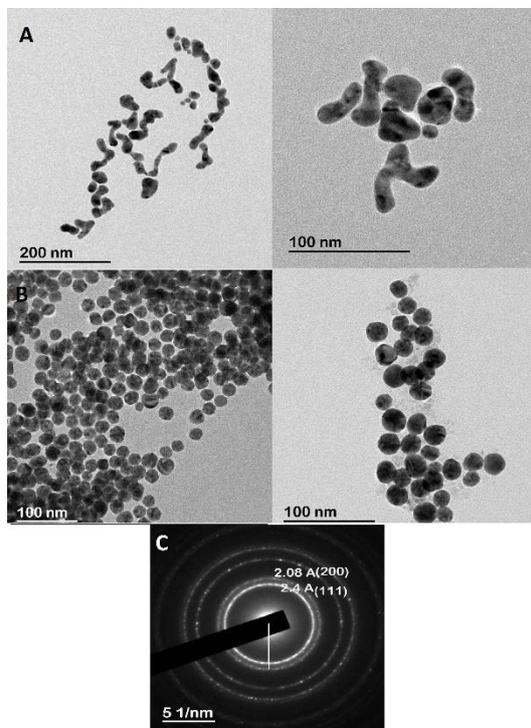


Figura 8: Histograma del diámetro de las nanopartículas de oro

Figura 9: Imágenes de AuNPs por HRTEM. (A) AuNPs sintetizadas por el método de Turkevich modificado con Ag. (B) AuNPs sintetizadas por el método de Turkevich clásico. (C) Imagen del patrón SAED para conocer el tipo de estructura (estructura cúbica centrada en las caras)

Gracias a las diferentes técnicas empleadas se ha corroborado que se han obtenido AuNPs esféricas de un tamaño próximo a 20 nm a partir de la síntesis con el método de Turkevich clásico.

4.2. Síntesis y caracterización de PEG-zeína

La síntesis de PEG-zeína da como resultado un producto sólido de color amarillo claro. Al igual que como ocurrió para las AuNPs, el producto que se ha obtenido se va a caracterizar mediante diversas técnicas con el fin de conocer el tamaño y la morfología del compuesto.

La formación de la micela de zeína se confirma con la técnica ATR – FTIR a través de los espectros obtenidos para cada reactivo por separado y el registrado para la micela de zeína.

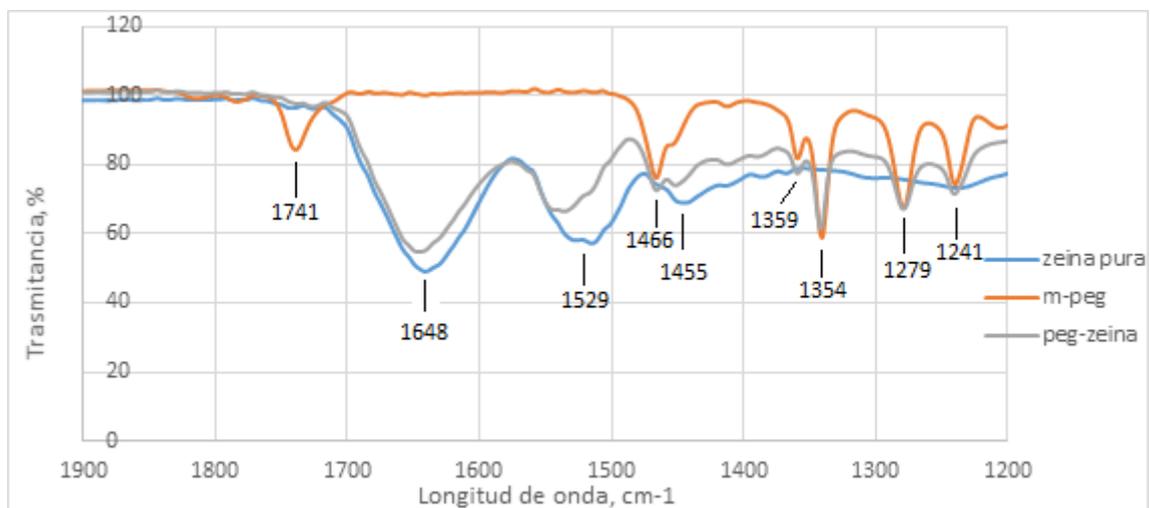


Figura 10: Caracterización de la micela de zeína por ATR - FTIR

En el espectro de ATR – FTIR (Figura 10) se observa como en la micela de zeína se mantienen los picos correspondientes a la amida I y amida II de la proteína de zeína, éstos aparecen a una longitud de onda de 1650 y 1529 – 1540 cm^{-1} , respectivamente. En la formación de la micela se aprecia un desplazamiento del pico que pertenece a la amida II, 1529 cm^{-1} . El pico NHS del m-PEG a 1741 cm^{-1} desaparece cuando éste se conjuga con la zeína para formar la micela.

Mediante la técnica DLS se obtiene una primera aproximación del tamaño que presentan las partículas de zeína que se han sintetizado.

Tabla 6: Resultados de tamaño y dispersión de partículas de zeína mediante DLS

	T (°C)	PDI	D (NM)
PEG - ZEÍNA	20	0,10	172
DESV. ESTÁNDAR		0,07	33

En base a los resultados reflejados en la Tabla 6 se puede determinar cómo se obtienen partículas de un tamaño medio de 172 nm. La medida presenta un valor de PDI inferior a 0,3, límite para poder determinar que la medida corresponde a una única población monodispersa de tipo gaussiano.

La micela de zeína se caracteriza con la técnica HRTEM. Las imágenes obtenidas Figura 11) demuestran que se han obtenido micelas esféricas de diversos tamaños. Tal y como se muestra en la Figura 12 no existe una uniformidad en el tamaño de las micelas, siendo la media del diámetro 529 ± 137 nm. La media del tamaño no es determinante ya que existe mucha variedad de partículas con distintos tamaños. Es posible que durante el pretratamiento de las muestras se haya producido la agregación de las partículas como consecuencia de la eliminación del disolvente y que sea este el origen de las discrepancias observadas con los datos obtenidos por DLS.

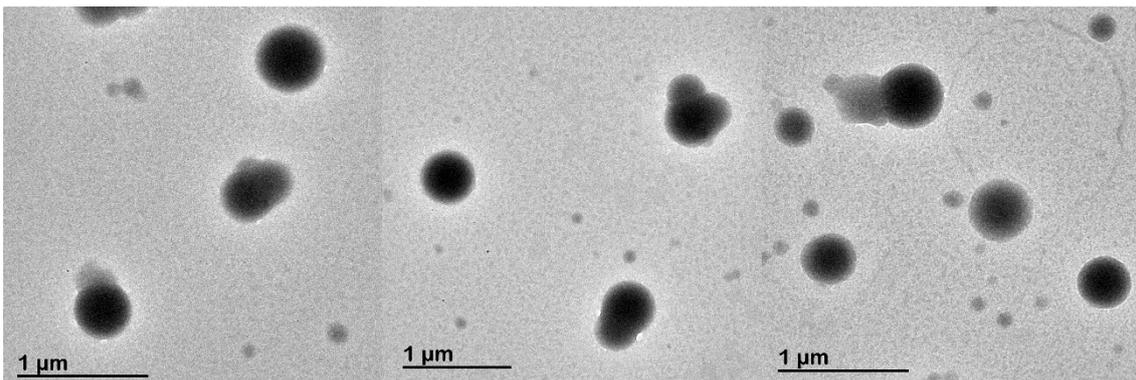


Figura 11: Imágenes de la micela de zeína por HR-TEM

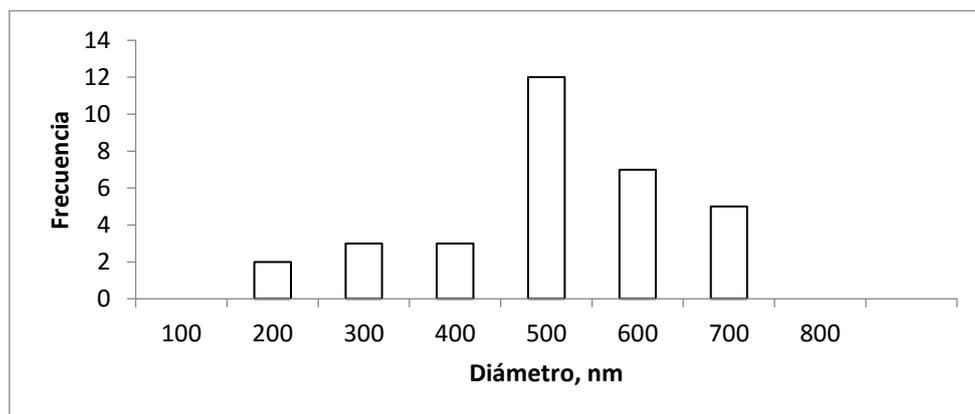


Figura 12: Histograma del diámetro de las micelas

Las micelas de zeína presentan fluorescencia debido a las características estructurales de la proteína ya que presenta aminoácidos tales como triptófano, fenilalanina y tirosina, responsables de la banda de fluorescencia. El espectro de fluorescencia (Figura 13) presenta una

banda de excitación centrada a una longitud de onda de 277 nm y una banda de emisión con un máximo de intensidad a una longitud de onda de 303 nm.

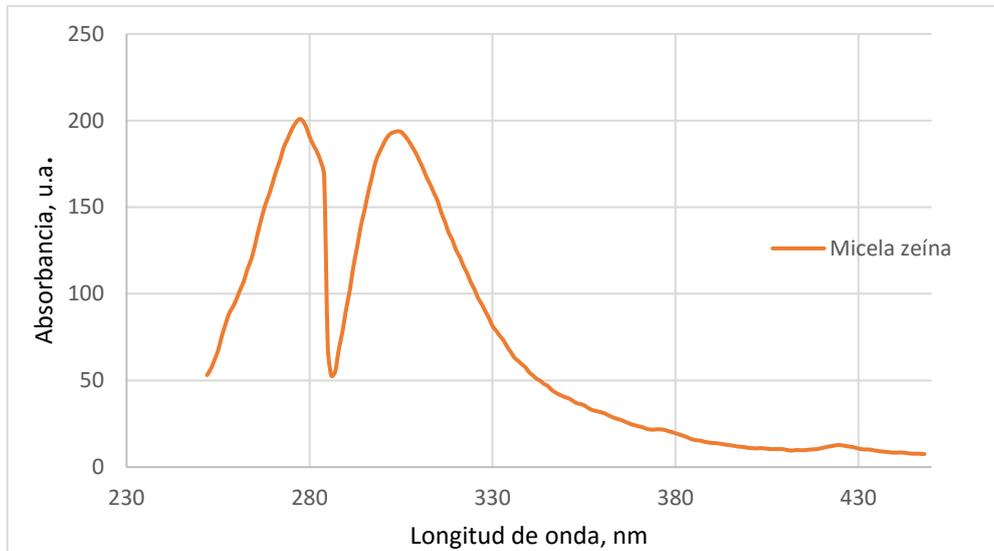


Figura 13: Espectro de fluorescencia de la micela de zeína

La luminiscencia intrínseca de las micelas de zeína permite que éstas puedan ser débilmente observadas por un microscopio de fluorescencia (Figura 14). Sin embargo, debido a que los diámetros de las partículas están por debajo del límite de resolución del equipo y a que los rendimientos de luminiscencia no son lo suficientemente altos, esta técnica no ha podido ser empleada con fines de caracterización.

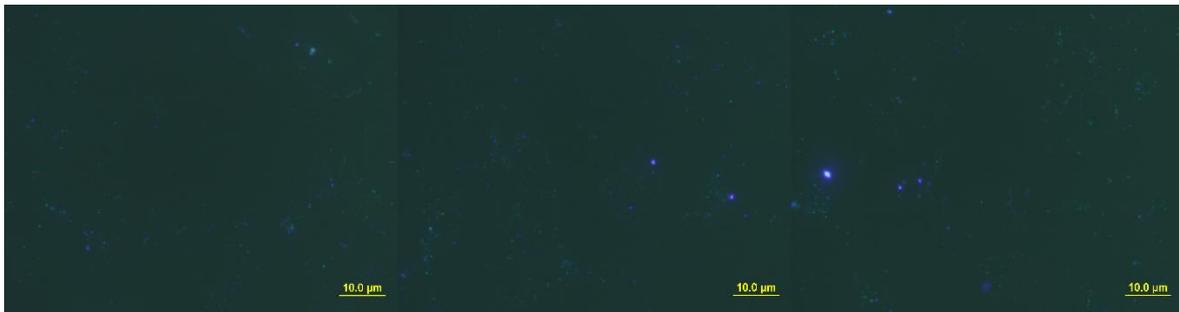


Figura 14: Imágenes de las micelas de zeína por microscopía de fluorescencia

La citometría de flujo se empleó como prueba complementaria a las utilizadas anteriormente para determinar el tamaño de las micelas y la fluorescencia que presentan estas partículas. En esta técnica se calibró primero el equipo mediante el empleo de esferas fluorescentes de un tamaño de 4, 6 y 10 μm .

Tras la calibración del equipo, se analiza la matriz de la muestra. Las micelas de zeína están suspendidas en agua Milli-Q por lo que en este caso, ésta será nuestra matriz. Como se puede observar en la Figura 15 A la muestra presenta una imagen prácticamente exenta de partículas.

El análisis de las micelas de zeína (Figura 15C) determinó que presentan un tamaño variable de hasta $6\mu\text{m}$, información que se corresponde a la obtenida anteriormente mediante la técnica TEM. La imagen que muestra las esferas de calibración (Figura 15B) están presentes las de tamaño de 4 y $6\mu\text{m}$. Por comparación de esa imagen con la obtenida para las micelas de zeína se puede concluir que la mayor población de nuestras partículas presenta un tamaño inferior a $4\mu\text{m}$. El tamaño se corroboró mediante un análisis por tamaño donde se observa cómo la micela de zeína da señal próxima a la que dan las esferas de control de $4\mu\text{m}$ (Figura 16C y Figura 16D)

Las micelas de zeína en las condiciones operacionales del equipo no presentan fluorescencia, tal y como se observa en la Figura 16. Anteriormente se había demostrado que las micelas de zeína sí son fluorescentes, la falta en esta ocasión de fluorescencia puede ser debida a una baja concentración de micelas en la muestra o que, al estar trabajando en el límite de tamaño que se ha calibrado, no se esté obteniendo un buen rendimiento.

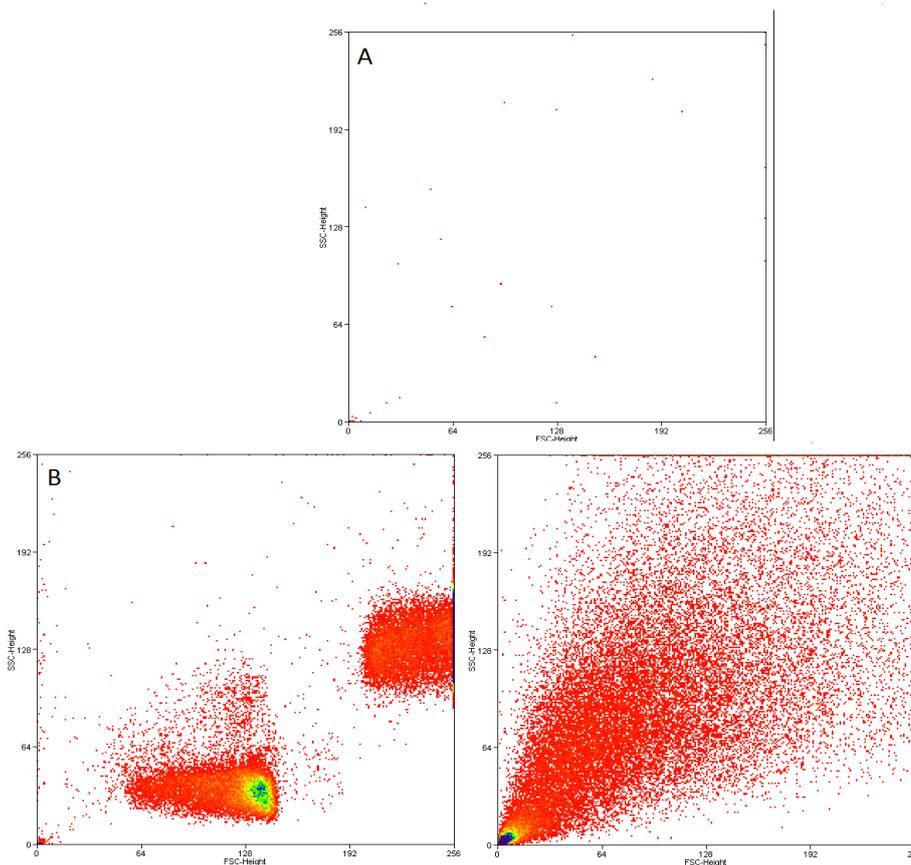


Figura 15: Citometría de Flujo. (A) Agua miliQ. (B) Esferas fluorescentes de calibración. (C) Micela de zeína

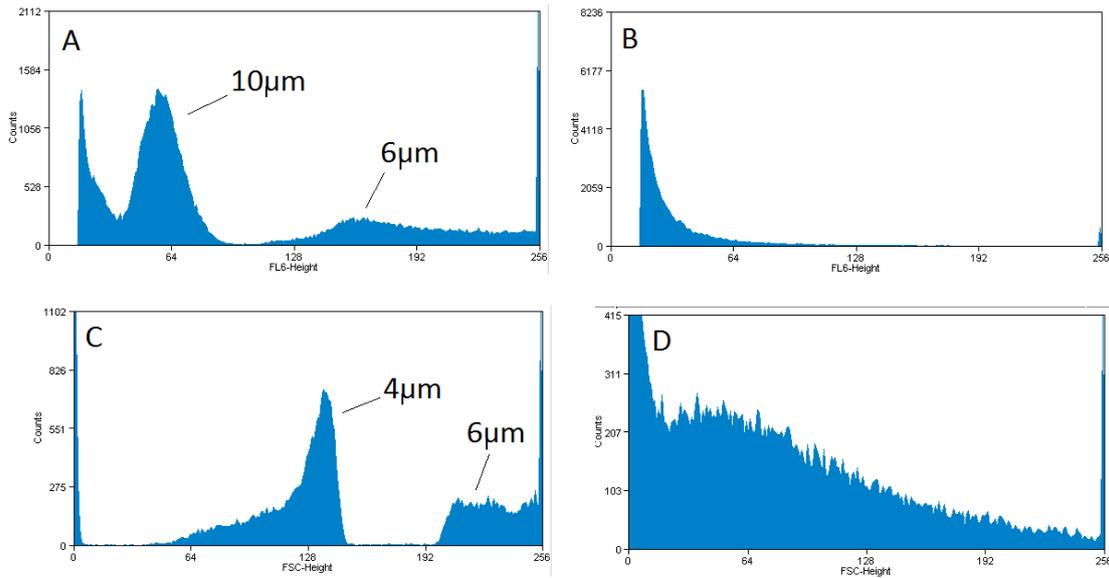


Figura 16: Fluorescencia y tamaño por citometría de flujo. (A) Fluorescencia esferas de control. (B) Fluorescencia micelas de zeína. (C) Tamaño de las esferas de control. (D) Tamaño de las micelas de zeína

4.3. Encapsulación de AuNPs en cápsulas de PEG-zeína

La caracterización del encapsulado de zeína con AuNPs tiene como fin determinar la existencia de AuNPs en el interior de la micela de zeína.

En el espectro ATR – FTIR (Figura 17) se observa cómo las AuNPs no presentan picos debido a ser partículas metálicas. Además, una vez formado el encapsulado de zeína con AuNPs se mantienen todos los picos presentes en la micela de zeína lo que demuestra que sigue manteniendo la misma estructura orgánica.

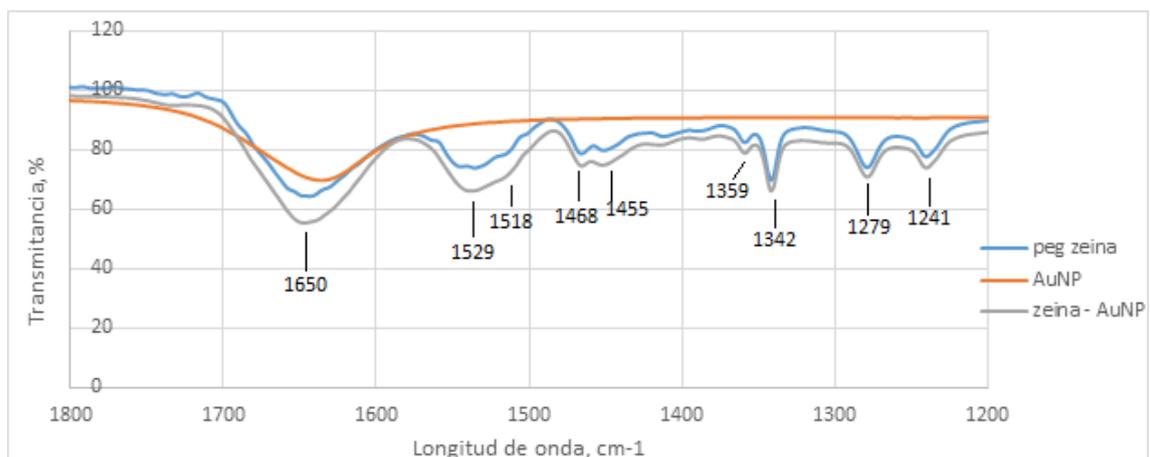


Figura 17: Caracterización del encapsulado por ATR - FTIR

Se caracteriza el encapsulado por TEM. Las imágenes (Figura 18) muestran la cápsula proteica correspondiente zeína y pequeñas AuNPs esféricas distribuidas tanto en el interior de la micela

como en la interfase. Gracias a las imágenes se puede concluir que se han conseguido encapsular dentro de la micela de zeína las AuNPs.

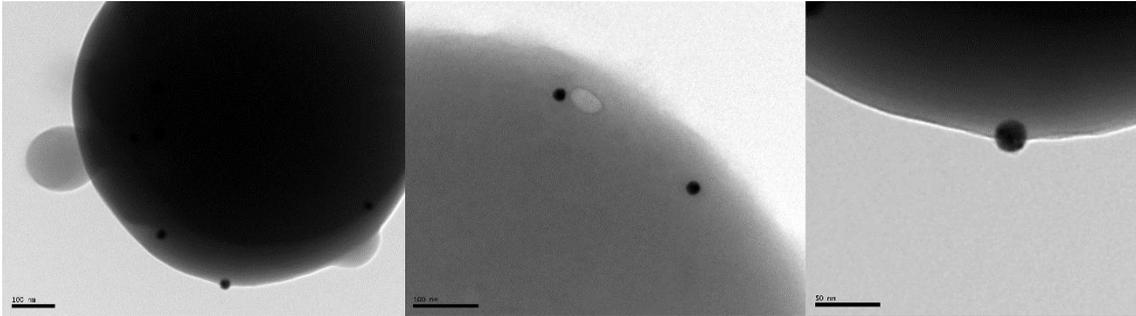


Figura 18: Imágenes del encapsulado por TEM

En el espectro UV-Vis (Figura 19) de la micela de zeína se observa la presencia discreta de un pico con un máximo de absorción a una longitud de onda de 274 nm. Tras la formación del compuesto encapsulado este pico se desplaza hacia la derecha del espectro, siendo el máximo de absorción 278,5 nm. El desplazamiento del pico supone la formación del conjugado.

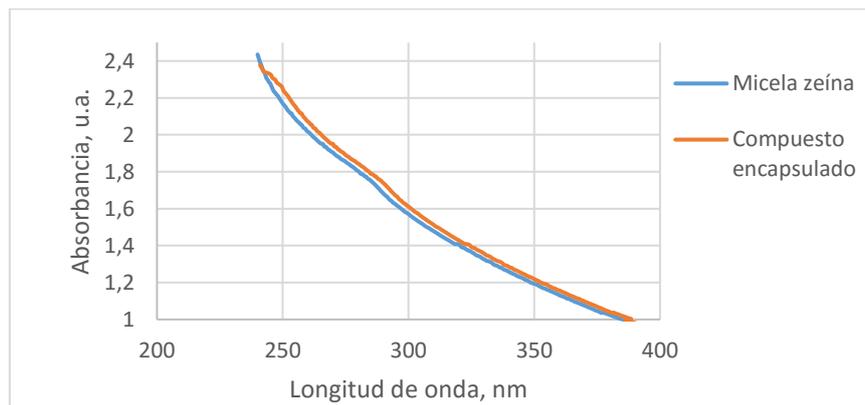


Figura 19: Espectros UV-Vis de la micela de zeína y del encapsulado

Se registra el espectro de fluorescencia a las longitudes de onda de excitación y emisión de la micela de zeína, 277 y 303 nm respectivamente. El espectro obtenido (Figura 20) se observa cómo la fluorescencia del compuesto ha disminuido considerablemente al producirse la encapsulación. La disminución de la fluorescencia se ha corroborado con el microscopio de fluorescencia, donde se han obtenido imágenes del encapsulado (Figura 21) y no se observan partículas fluorescentes.

La pérdida de fluorescencia puede ser debida a que al encapsularse las AuNPs en la zeína, favorezca la desactivación no radiacional de las micelas de zeína.

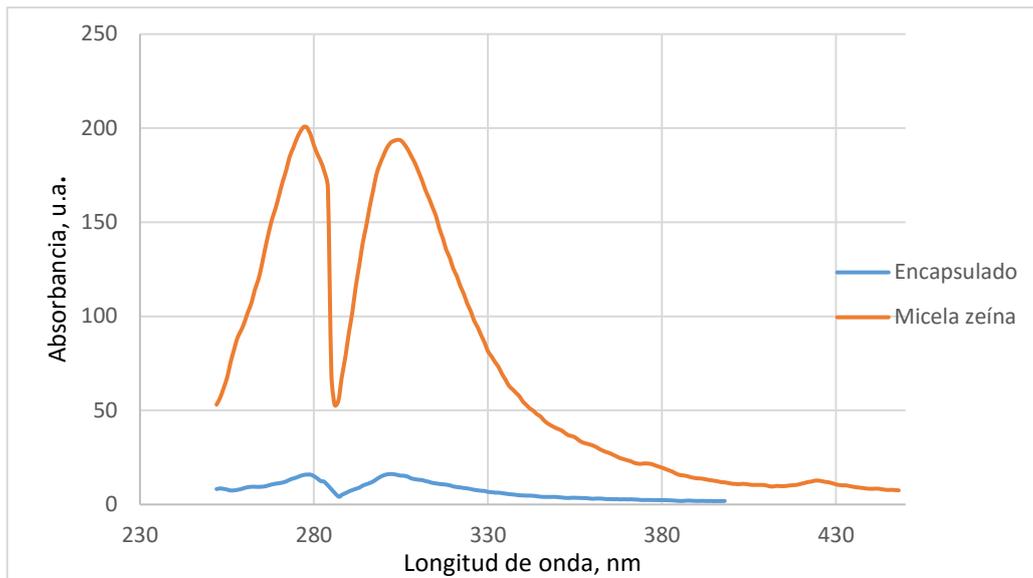


Figura 20: Espectro de fluorescencia del encapsulado

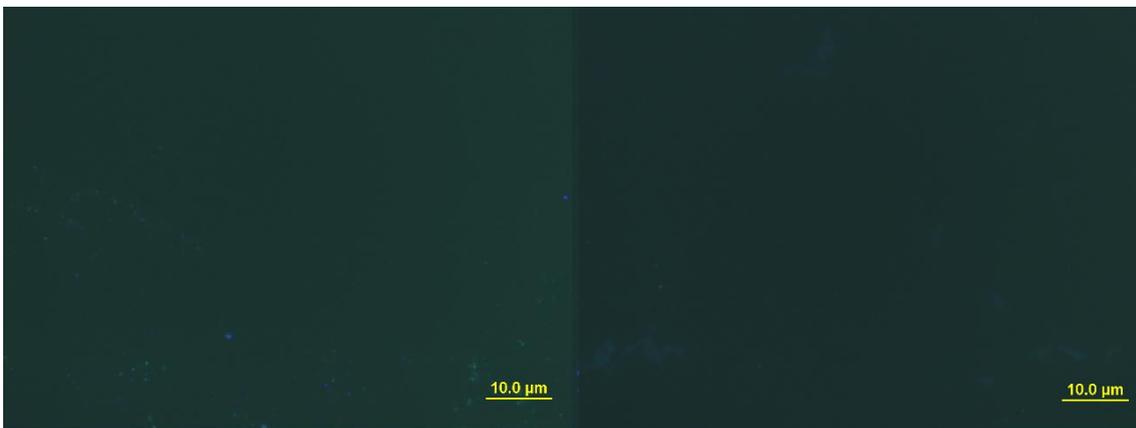


Figura 21: Imágenes del encapsulado por microscopía de fluorescencia

La citometría de flujo obtenida para las micelas con AuNPs encapsuladas muestra tamaños muy dispersos, siendo la mayor parte de la población de muestra de un tamaño de partícula más cercano a $4 \mu\text{m}$ (Figura 22).

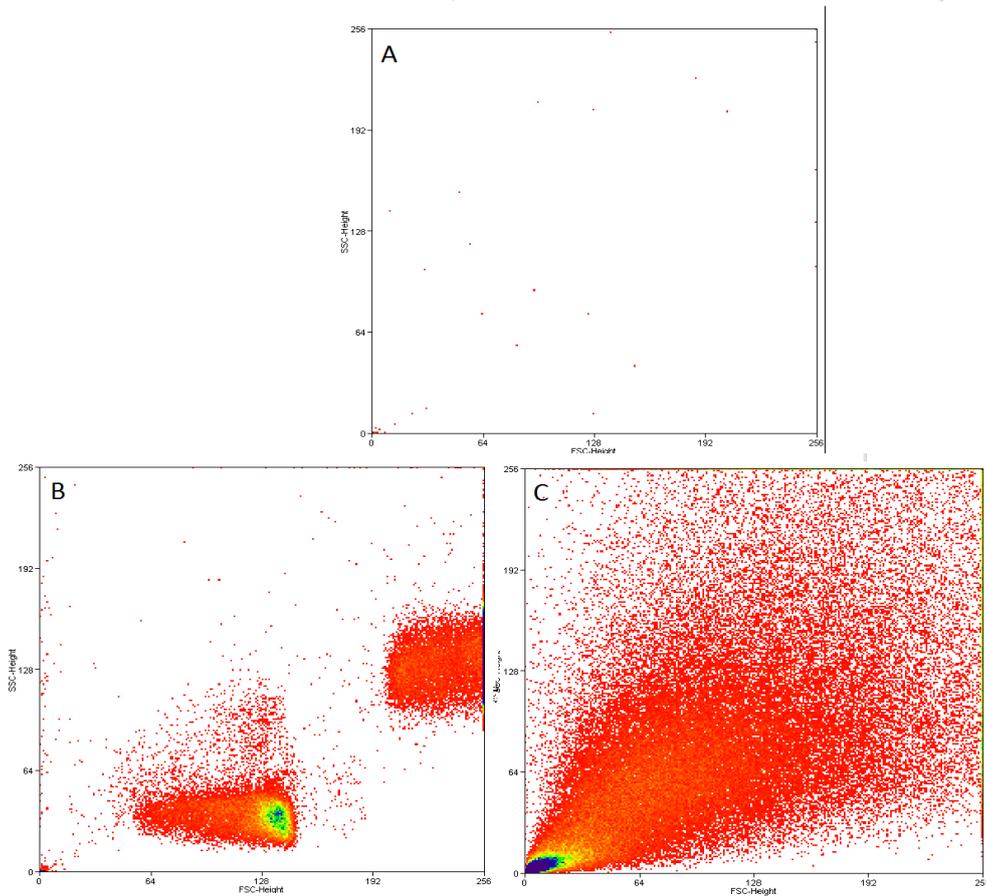


Figura 22: Citometría de Flujo. (A) Agua Milli-Q. (B) Esferas fluorescentes de calibración. (C) Encapsulado

La falta de fluorescencia de las micelas encapsuladas se corrobora con la medida de fluorescencia en citometría de flujo, donde tal y como se puede apreciar en la Figura 23B no se detecta señal de fluorescencia para la muestra.

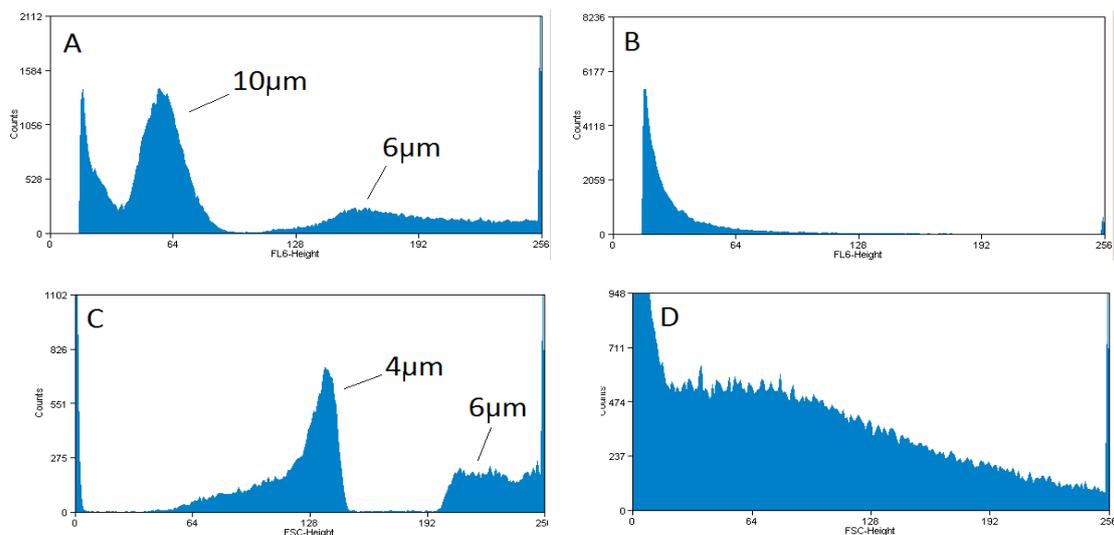


Figura 23: Fluorescencia y tamaño por citometría de flujo. (A) Fluorescencia esferas de control. (B) Fluorescencia micelas de zeína. (C) Tamaño de las esferas de control. (D) Tamaño del encapsulado

La comparación de la medida de tamaño por citometría de flujo para las muestra de micelas de zeína y la muestra del encapsulado (Figura 16D y Figura 22D, respectivamente) determina que una vez que se forma la micela con las AuNPs encapsuladas en su interior el diámetro de la micela aumenta.

4.4. SEPARACIÓN DE AuNPs Y ZEÍNA POR AF4

4.4.1 ESTUDIOS PRELIMINARES DE AF4

La optimización del método se hará en base a probar distintos parámetros como el flujo saliente al detector y el “cross flow” para optimizar la separación.

Se toma como referencia la separación de AuNPs descrita por Gigault et al.⁶⁰ donde se varió la composición de la fase móvil. La fase portadora empleada se corresponde con una disolución de Tween20 0,02% (m/V) preparada en agua Milli-Q.

En primer lugar se estudiaron distintos programas de flujo saliente al detector (0,5 mL/min y 1 mL/min) y de “cross flow” (entre 0,5 mL/min y 1,5 mL/min). Al terminar el programa de elución se mantiene el “cross flow” a una velocidad de 0.0 mL/min durante 2 minutos para asegurar la completa elución de partículas más grandes o agregados. Al no aplicar “cross flow”, se deja de retener este tipo de partículas y eluyen.

En la Tabla 7 se resume el programa óptimo encontrado para conseguir la correcta separación de las AuNPs.

Tabla 7: Programa de AF4 empleado para separar AuNPs

Volumen de inyección, µL	20			
Velocidad de flujo al detector, mL/min	1			
Flujo de inyección, mL/min	0,2			
		Tiempo, min	Cross Flow, mL/min	
Etapas del programa	Focalización	3		1,5
	Separación	2,5	Constante	1,5
		10	Caída lineal	1,5 a 0
	2	Constante	0	

El eluyente se dirige desde el canal hasta un detector UV-Vis que recoge la señal a 270 y 303 nm.

El fractograma obtenido (Figura 25) en la optimización del método muestra como se ha conseguido una buena separación del pico de las AuNPs con respecto al “void peak” a pesar de que al aumentar el “cross flow” es posible que las partículas se retengan más en la membrana y se produzcan pérdidas durante el análisis. Para conocer si existen pérdidas se calcula la recuperación global del sistema (“recovery”) de la forma:

$$R (\%) = \frac{m}{m_0} \times 100$$

Para calcular la recuperación de las AuNPs o “recovery” se debe hacer un programa FIA donde no se aplica “cross flow” por lo que todo lo que se inyecta se detecta. Se registran dos medidas con FIA (Figura 24) y el área que se toma será la media de ambas (m_0). A continuación, se compara el área que se obtiene con el programa donde se aplica el “cross flow” (m).

Tabla 8: Resultados de (recovery) para las AuNP por AF4. La incertidumbre corresponde a 1 desviación estándar ($n=3$)

	Área	Recovery, %
FIA AuNP (m_0)	410	54 ± 2
Programa AuNP (m)	223	

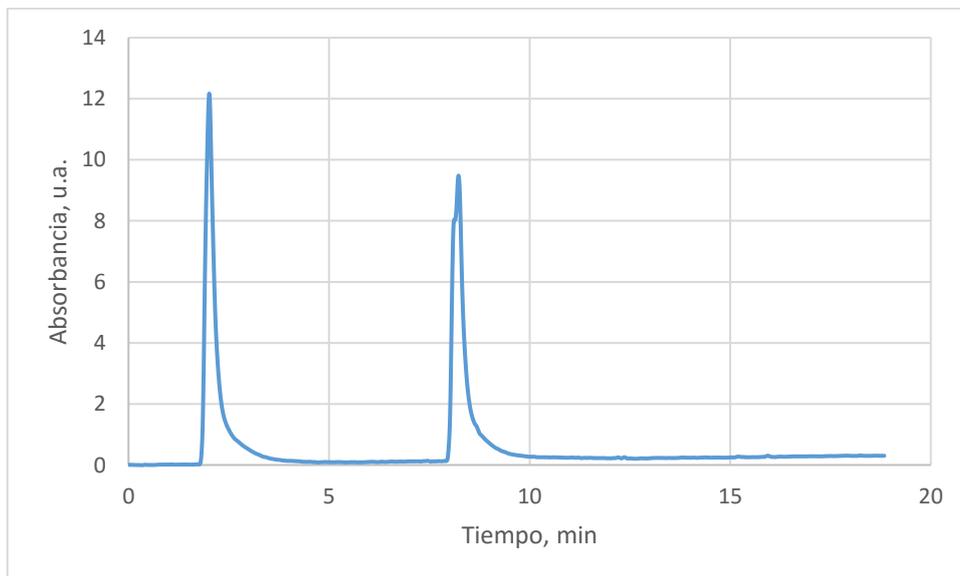


Figura 24: FIA para las AUNPs ($\lambda=270$ nm).

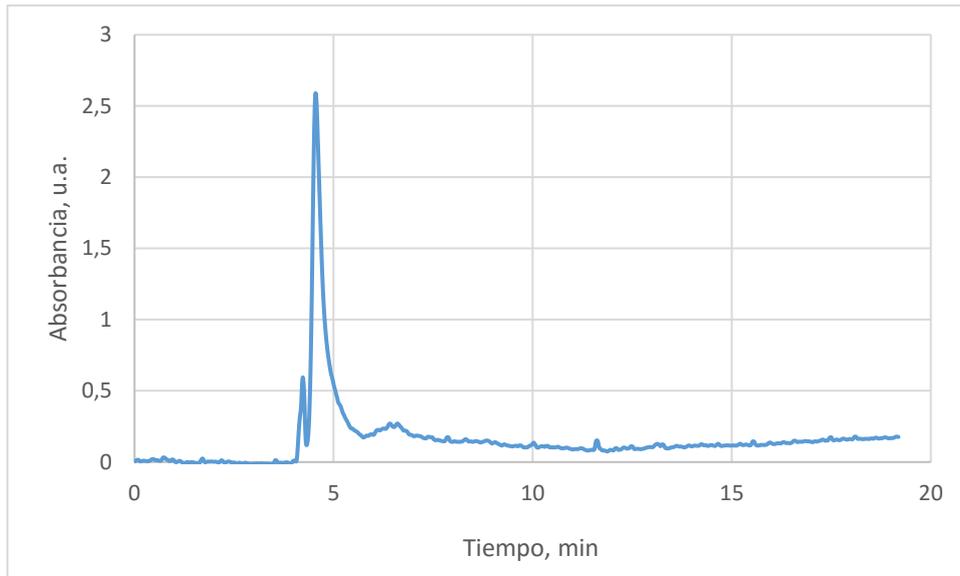


Figura 25: Fractograma para las AuNP con un flujo de salida al detector de 1,0 mL/min y cross flow de 1,5 mL/min ($\lambda=270$ nm)

4.4.2 ANÁLISIS ELEMENTAL AF4 – ICPMS

Para la detección elemental, se acopló el sistema de fraccionamiento en flujo de campo de flujo asimétrico a un espectrómetro de masas ICP. El flujo de salida del sistema se dirige directamente al nebulizador del ICP-MS. El programa que se utilizó para la separación por AF4 es el optimizado anteriormente para las AuNPs (Tabla 7). Las micelas de zeína y el encapsulado tiene un tamaño superior al diámetro de las AuNPs por lo que se espera que se retengan más en la membrana y el tiempo de elución sea mayor.

Se registran los fractogramas para las muestras de AuNPs, micelas de zeína y encapsulado midiendo en ICP-MS los iones $^{197}\text{Au}^+$ y $^{48}\text{S}^+$. La medida del S en las muestras tiene como fin determinar si está presente o no proteína en la muestra, ya que todas las proteínas tienen azufre en su composición química.

Tabla 9: Iones que se miden por ICP-MS

	Q1	Celda (Q)	Q2
Iones	$^{197}\text{Au}^+$ $^{32}\text{S}^+$	Se añade O_2 a 0,35 mL/min	$^{197}\text{Au}^+$ $^{48}\text{S}^+$

En primer lugar se analiza la muestra de AuNPs, donde se registrará el pico de la partícula metálica.

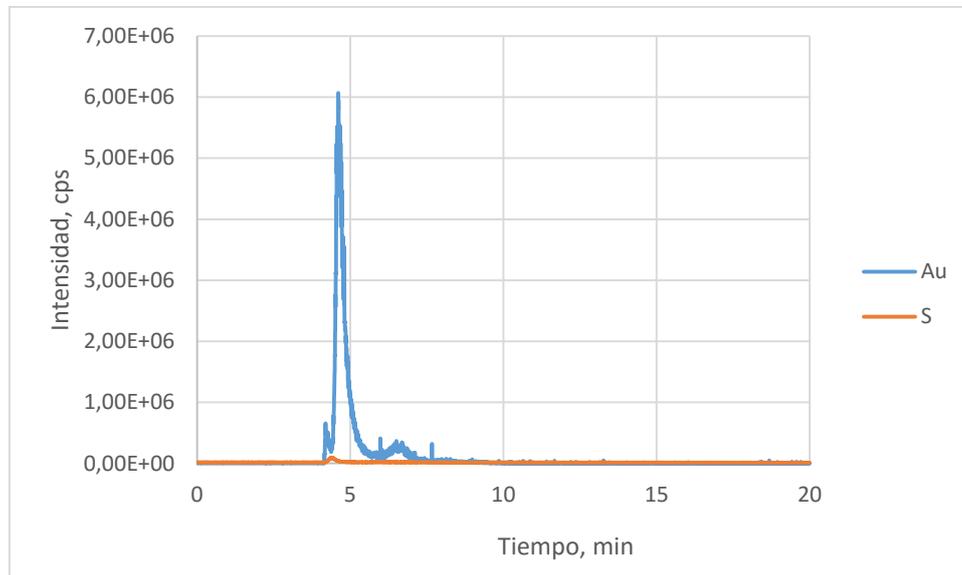


Figura 26: Señal $^{197}\text{Au}^+$ y $^{48}\text{SO}^+$ para la muestra de AuNPs

El fractograma obtenido (Figura 26) al analizar la muestra de AuNPs determina como a aproximadamente 4,9 min aparece un pico que corresponde a las partículas metálicas, lo que concuerda perfectamente con el fractograma obtenido inicialmente con la detección UV-Vis (Figura 25). Además, no presenta señal significativa de S por lo que la muestra no contiene azufre.

Tabla 10: Recovery para la muestra de AuNP obtenido con detección de Au por ICP-QQQ

197Au	AuNPs	FIA	% Recovery
	14997683	33656697	45 ± 3

Tras calcular el recovery que se obtiene en el análisis (Tabla 10) muestra que es similar al que se obtuvo anteriormente en la optimización del método (Tabla 8) empleando UV-Vis. Las partículas de oro tienen un tamaño pequeño y es posible la recuperación de aproximadamente la mitad de ellas es debida a que al ser pequeñas queden retenidas en la membrana al aplicar el “cross flow”.

En el fractograma obtenido al analizar la muestra que contiene las micelas de zeína (Figura 27) no hay señal de oro como cabe esperar, pero apenas se registra señal de azufre. Únicamente parece intuirse un pico ancho entre 5 y 8 min que podría corresponder a dichas micelas (son de mayor tamaño que las AuNPs y por tanto, deberían eluir más tarde). Las micelas de zeína se

caracterizaron como se mencionó anteriormente por diversas técnicas por lo que se puede concluir que la proteína sí está presente en la muestra. La ausencia de azufre en la señal registrada puede ser debida a que se tenga una muestra muy diluida. Como el número de S que tiene la zeína en su estructura química es bajo (Tabla 3) y la concentración de zeína que se tiene en suspensión es baja también, el equipo no registra apenas la señal de azufre de la proteína.

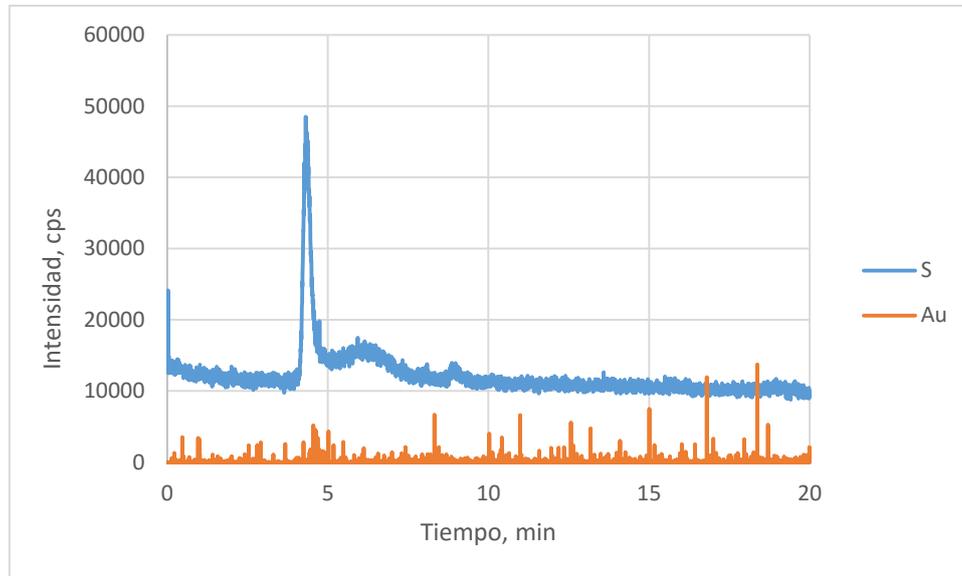


Figura 27: Señal $^{197}\text{Au}^+$ y $^{48}\text{SO}^+$ para la muestra de micelas de zeína

El análisis de las micelas de zeína que contienen AuNPs encapsuladas en su interior da como resultado el fractograma mostrado en la Figura 28. En él se puede observar como apenas se registra señal de oro. Con la información que se obtuvo con las técnicas de caracterización se pudo ver cómo sí había AuNPs encapsuladas, la baja señal de oro que se registra es debida a tener una muestra de AuNPs muy diluida o que haya pocas nanopartículas encapsuladas en el interior de la micela. Además, se puede observar como en esta ocasión, al contrario que para las micelas de zeína, sí se registra un pico significativo de S al tiempo de retención observado anteriormente (5-8 min) en la Figura 27. La mejor detección de las micelas de zeína en este caso puede ser debida a que se tiene una muestra más concentrada de micelas encapsuladas o que el proceso de formación de micelas ha sido más efectivo, se tiene más proteínas en disolución y por tanto, el número de azufres presentes en la estructura aumenta.

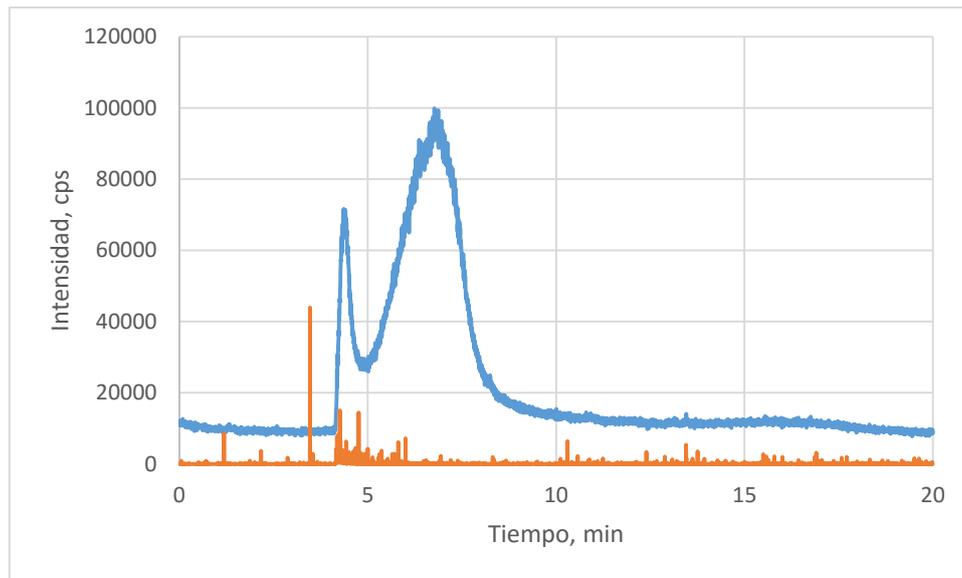


Figura 28: Señal $^{197}\text{Au}^+$ y $^{48}\text{SO}^+$ para la muestra del encapsulado

Para calcular la recuperación se realiza un FIA con la muestra de las micelas encapsuladas para ver cuanta masa llega al detector.

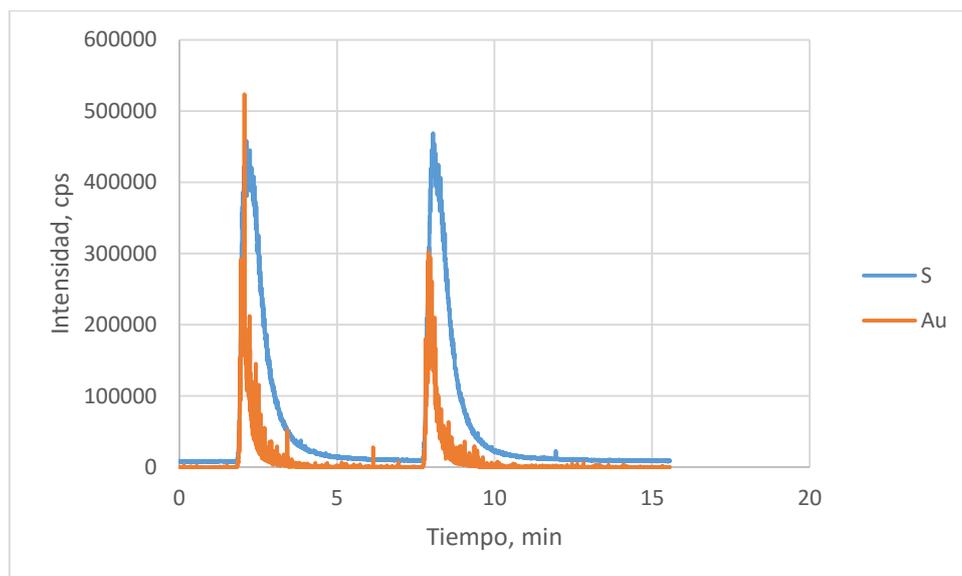


Figura 29: FIA para la muestra de micelas de zeína encapsuladas con AuNP

En el fractograma de FIA (Figura 29) se observa cómo se registra en esta ocasión señal de $^{197}\text{Au}^+$ lo que significa que nuestra muestra sí contiene nanopartículas de oro.

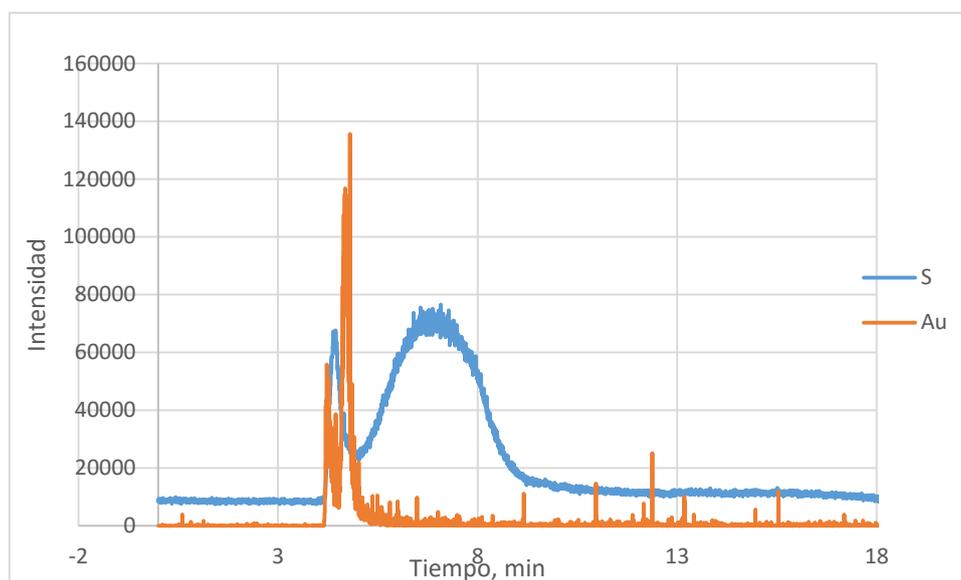
Comparando las áreas de los picos obtenidos aplicando y sin aplicar “cross flow” calculamos la recuperación (Tabla 11).

Tabla 11: Recuperación para la muestra de micelas encapsuladas con AuNP

	Micela encapsulada	FIA	% Recovery
¹⁹⁷ Au	10077	522088	2,0 ± 0,1
³² S	1339825	2125416	60 ± 5

El hecho de que la recuperación de S (zeína) sea mucho mayor que la de Au (AuNPs) puede indicar que la mayoría de las AuNPs estén adsorbidas sobre la superficie de la micela y se “limpien” durante la etapa de enfoque y fraccionamiento. También puede indicar que las micelas puedan estar abriéndose durante el proceso y liberando las nanopartículas. Es evidente que habría que llevar a cabo más experimentos para tener una idea más clara de lo que está pasando.

A fin de demostrar al menos que es posible la separación e identificación de los picos de AuNPs y micelas de zeína en un mismo fractograma se va a realizar en un eppendorf una mezcla 1:10 de las muestras de micela de zeína y AuNPs. El fractograma (Figura 30) muestra claramente el pico de AuNPs separado del “void peak” y a su vez separado del pico de la micela de zeína. El pico de la proteína es un pico ancho debido a que tiene interacciones inespecíficas con la membrana pero al ser gaussiano se puede sospechar que pertenecen a una población pero con una dispersión de tamaños elevada.

Figura 30: Señal ¹⁹⁷Au⁺ y ⁴⁸SO⁺ para la mezcla de micelas de zeína con AuNPs

5. CONCLUSIONES

La preparación de AuNPs es posible mediante el método de Turkevich clásico donde se obtiene como producto nanopartículas esféricas y con un diámetro próximo a 20nm.

El empleo del polímero PEG durante la preparación de partículas de zeína da como resultado la síntesis de micelas de zeína estables en ambiente acuoso, y además, éstas son esféricas y fluorescentes. Como inconveniente, no se ha conseguido uniformidad en el tamaño de partícula, obteniéndose micelas de diámetros muy variables.

Se ha conseguido la conjugación de AuNPs con las micelas de zeína a pesar de que la concentración encapsulada de AuNPs dentro de las micelas de zeína no es muy elevada tal y como se observa por TEM y se corrobora con la técnica AF4 donde no se ha conseguido registrar una señal alta de oro en el análisis de la micela encapsulada.

La técnica de fraccionamiento en flujo de campo en flujo asimétrico permite la separación de AuNPs y micelas de zeína permitiendo averiguar si las nanopartículas metálicas se encuentran encapsuladas en el interior de la micela ya que se puede separar las AuNPs libres del pico de la zeína.

El Trabajo de Fin de Máster me ha permitido adquirir competencias a nivel académico debido al manejo de distintos equipos y oportunidad de trabajo en técnicas específicas para la caracterización de nanopartículas como son el DLS, TEM o AF4. Además, el aprendizaje de la interpretación de la información que proporciona dichos equipos permitiéndome sacar resultados y conclusiones.

A nivel personal me ha ayudado a desarrollar la capacidad de trabajo tanto individual como colectivo en el laboratorio, así como la capacidad de solucionar los problemas que se plantearon durante el trabajo.

6. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Lanone, S., Boczkowski, J., Biomedical applications and potential health risks of nanomaterials molecular mechanisms, *Curr Mol Med* **6** 2006; 651-663
- 2 Baars, R.J., Van Leeuwen, Y.M., Hendrix, Y., Velikov, K.P., Kegel, W.K., Philipse, A.P., *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **483** (2015) 209-215
- 3 Mohanraj, V.J., Chen, Y., Nanoparticles – A Review, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* **5**(1) (2006) 561-573
- 4 Patel, A.R., Hu, Y., Tiwari, J.K., Velikov, K.P., Synthesis and characterisation of zein-curcumin colloidal particles, *The Royal Society of Chemistry* **6** (2010) 6192-6199
- 5 Patel, A.R., Velikov, K.P, Colloidal delivery systems in foods: A general comparison with oral drug delivery, *LWT – Food Science and Technology* **44** (2011) 1958-1964
- 6 Reis, C.P., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J., Veiga, F., Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **2** (2006) 53-65
- 7 Seydack, M., Nanoparticle labels in immunosensing using optical detection methods, *Biosensor and Bioelectronics* **20**(12) (2005) 2454-2469
- 8 de la Escosura-Muñiz, A., Parolo, C., Immunosensing using nanoparticles, *Materials Today* **13**(7-8) (2010) 24-34
- 9 Goryacheva, I. Y., Lenain, P., et al., Nanosized labels for rapid immunotests, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **46** (2013) 30-43
- 10 Mikami Y, Dhakshinamoorthy, Alvaro M, García H. Catalytic activity of unsupported gold nanoparticles. *Catalysis Science & Technology* **3** (2013) 58-69
- 11 Klauk H (Ed.). *Organic Electronics II, Volume II: More Materials and Applications*. Weinheim (Alemania): Wiley- VCH (2012)
- 12 Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chemical Society Review* **38** (2009) 1759–1782.
- 13 Li, J.J., Hartono D., Ong C.N., Bay B.H., Yung L.YL. Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles. *Biomaterials* **31** (2010) 5996-6003.

- 14 Sivaraman, S.K., Kumar, S., Santhanam, V., Monodisperse sub 10nm gold nanoparticles by reversing the order of addition in Turkevich method – The role of chloroauric acid, *Journal of Colloid and Interface Science* **361** (2011) 543-547
- 15 Brown, S. D.; Nativo, P.; Smith, J.-A.; Stirling, D.; Edwards, P. R.; Venugopal, B.; Flint, D. J.; Plumb, J. A.; Graham, D.; Wheate, N. J. Gold nanoparticle platforms as drug and biomacromolecule delivery systems. *Journal of American Chemistry Society* **132** (2010) 4678-4684
- 16 Stuchinskaya T, Moreno M, Cook M.J., Edwards D.R., Russell, D., Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using antibody-phthalocyanine-gold nanoparticle conjugates. *Photochemical and Photobiological Science* **10** (2011) 822-831
- 17 Louis C, Pluchery O. *Gold Nanoparticles for Physics, Chemistry and Biology*. London: Imperial College Press (2012)
- 18 Hermanson, G. T., *Microparticle and nanoparticle, Bioconjugate Techniques*. USA: Academic Press (2008)
- 19 Turkevich J., Stevenson, P. C., Hillier J., A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discuss Faraday Society* **11** (1951) 55-75
- 20 Pérez Juste, J., Pastoriza Santos, I., Liz Marzán, L. M., Mulvaney, P., Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications, *Coordination Chemistry Reviews* **249** (2005) 1870-1901
- 21 Guozhon, C., *Nanostructures and Nanomaterials*. London: Imperial College Press (2004)
- 22 Shukla, R., Cheryan, M., Zein: The industrial protein from corn, *Industrial Crops and Products* **13** (2001) 171-192
- 23 Drzewiecki, J., Delgado-Licon, E., Haruenkit, R., Pawelzik, E., Martin-Belloso, O., Park, Y. S., Jung, S. T., Trakhtenberg, S., Gorinstein, S., Identification and differences of total proteins and their soluble fractions in some pseudocereals based on electrophoretic patterns, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51** (2003) 7798-7804
- 24 Wang, H. J., Lin, Z. X., Liu, X. M., Sheng, S. Y., Wang, J. Y., Heparin-loaded zein microsphere film and hemocompatibility, *Journal of Controlled Release* **105** (2005) 120-131
- 25 Fu, J. X., Wang, Hu. J., Zhou Y. Q., Wang, J. Y., Antibacterial activity of ciprofloxacin-loaded zein microsphere films, *Materials Science and Engineering* **29** (2009) 1161-1166
- 26 Liu, X., Sun, Q., Wang, H., Zhang, L., Wang, J. Y., Microspheres of corn protein, zein, for an ivermectin drug delivery system, *Biomaterials* **26** (2005) 109-115

- 27 Folter, J. W. J., Van Ruijven, M. W. M, Velikov, K. P., Oil-in-water Pickering emulsions stabilized by colloidal particles from the water-insoluble protein zein, *Soft Matter* **8** (2012) 6807
- 28 Zhong, Q., Jin, M., Zein nanoparticles produced by liquid-liquid dispersions, *Food Hydrocolloids* **23** (2009) 2380-2387
- 29 Parris, N., Cooke, P. H., Hicks, K. B., Encapsulation of Essential oils in zein nanospherical particles, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53** (2005) 4788-4792
- 30 Muthuselvi, L., Dhathathreyan, A., Simple coacervates of zein to encapsulate Gitoxin, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **51** (2006) 39-43
- 31 Podaralla, S., Averineni, R., Alqahtani, M., Perumal, O., Synthesis of novel biodegradable Methoxy Poly(ethylene glycol)-zein micelles for effective delivery of curcumin, *Mol. Pharmaceutics* **9** (2012) 2778-2786
- 32 Shingh, R., Lillard Jr., J. W., Nanoparticle-based targeted drug delivery, *Experimental and molecular pathology* **86** (2009) 215-223
- 33 Ting, X., Yalong, Q., Xin, Z., Qinghua, Z., Controlled fabrication of nanostructures by assembling Au nanoparticles on functionalized polymeric spheres, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **498** (2016)
- 34 Hermanson G. T., Preparation of colloidal gold-labeled proteins, *Bioconjugate Techniques*, USA: Academic Press (2008)
- 35 Gouin, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends, *Trends in Food Science and Technology* **15** (2004) 330-347
- 36 Baker, Colin, C., Pradhan, Anshu y Shah, Ismat, S., Metal Nanoparticles, *American Scientific Publishers* **5** (2004) 449-474
- 37 Monge, M., Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas, *Anales de la Real Sociedad Española de Química* **1** (2009) 33-41
- 38 Sapsford, K. E., Tyner, K. M., et al., Analyzing Nanomaterial Bioconjugates: A review of Current and Emerging Purification and Characterization Techniques, *Analytical Chemistry* **83** (2011) 4453-4488
- 39 Cruz, D. A., Rodríguez, M. C., et al., Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: una relación profunda, *Av. Cien. Ing* **3** (2012) 67-78

- 40 Ljungblad, J., Antibody-conjugated Gold Nanoparticles integrated in a Fluorescence based Biochip, Department of Physics, Chemistry and Biology (2009)
- 41 Rodríguez S., Influencia de los compuestos de naturaleza proteica presentes en *Jatropha curcas* sobre la síntesis de nanopartículas de oro, *Txacala* (2014)
- 42 Fischer, K., Schmidt, M., Pitfalls and novel applications of particle sizing by dynamic light scattering, *Biomaterials* **98** (2016) 79-91
- 43 Jans, H., Liu, et al, Dynamic Light Scattering as a Powerful Tool for Gold Nanoparticle Bioconjugation and Biomolecular Binding Studies, *Analytical Chemistry* **81** (2009) 9425-9432
- 44 Bell, N. C., Minnelli, et al., Quantitation of IgG protein adsorption to gold nanoparticles using particle size measurement, *Analytical Methods* **5** (2013) 4591-4601
- 45 Giddings, J. C., Myers, M. N., Lin, G. C., Martin, M., Polymer analysis and characterization by field-flow fractionation (one phase chromatography), *Journal of Chromatography A* **142** (1977) 23-38
- 46 Giddings, J. C., Lin, G. C., Myers, M. N., Fractionation and size distribution of water soluble polymers by field flow fractionation, *Journal of liquid chromatography* **1** (1978) 1-20
- 47 Brimhall, S. L., Myers, M. N., Caldwell, K. D., Giddings, J. C., Polymer Characterization by Flow Field-flow fractionation, USA: ACS (1984) 48-52
- 48 Runyon, J. R., Williams, S. K. R., Composition and molecular weight analysis of styrene-acrylic copolymers using thermal field flow fractionation, *Journal of Chromatography A* **1218** (2011) 6774-6779
- 49 Schimpf, M., Caldwell, K., Giddings, J., Wiley, Field- Flow Fractionation Handbook (2000)
- 50 Meisterjahn, B., Wagner, S., von der Kammer, F., Hennecke, D., Hofmann, T. *Journal of Chromatography A*, **1440** (2016) 150-159
- 51 Rameshwar, T., Samal, S., Lee, S., Kim, S., Cho, J., Kim, I.S., *Journal of Nanoscience, nanotechnology* **6** (2006) 2461
- 52 Cho, T. J., Hackley, V. A., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **389** (2003)
- 53 Calzolari, L., Gilliland, D., García, C. P., Rossi, F., *Journal of Chromatography A* **1218** (2011) 4234-4239

- 54 Von der Kammer, F., Legros, S., Larsen, E., Loeschner, K., Hofmann, T., Separation and characterization of nanoparticles in complex food and environmental samples by field-flow fractionation, *Trends Anal. Chem.* **30** (2011) 425–436
- 55 Mitrano, D.M., Barber, A., Bednar, A., Westerhoff, P., Higgins, C.P., Ranville, J.F., Silver nanoparticle characterization using single particle ICP-MS (SP-ICP-MS) and asymmetrical flow field flow fractionation ICP-MS (AF4-ICP-MS), *J. Anal. At. Spectrom.* **27** (2012) 1131–1142
- 56 Meisterjahn, B., Neubauer, E., Von der Kammer, F., Hennecke, D., Hofmann, T., *Journal of Chromatography A* **1372** (2014)204-211
- 57 Xia, H., Bai, S., Hartmann, J., Wang, D., Synthesis of monodisperse quasi-spherical gold nanoparticles in water via silver(I)-assisted citrate reduction, *Langmuir* **26** (2010) 3585-3589
- 58 Liu X, Atwater M, Wang J, Huo Q. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **58** (2007) 3-7
- 59 Haiss, W., Thanh, N.T.K, Aveyard, J., Fernig, D.G., Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra, *Analytical Chemistry* **79** (2007) 4215-4221
- 60 Gigault, J., Pettibone, J. M., Schmitt, C., Hackley, V. A., Rational strategy for characterization of nanoscale particles by asymmetric – flow field fractionation: A tutorial, *Analytica Chimica Acta* **809** (2014) 9-24