



**Universidad
Europea**

UNIVERSIDAD EUROPEA DE MADRID

ESCUELA DE ARQUITECTURA, INGENIERÍA Y DISEÑO

ÁREA INGENIERÍA BIOMÉDICA

INGENIERÍA BIOMÉDICA

TRABAJO FIN DE GRADO

**Inmovilización de la albúmina en
nanopartículas basadas en carbono**

Alumno: D^a. CELIA GARCÍA-TOLA GONZÁLEZ

Director: D^a. JANAINA CEJUDO SANCHES

D^a ARISBEL CERPA NARANJO

JUNIO 2025

TÍTULO: Inmovilización de la albúmina en nanopartículas basadas en carbono

AUTOR: Celia García-Tola González

DIRECTOR DEL PROYECTO: Janaina Cejudo Sanches, Arisbel Cerpa Naranjo

FECHA: 6 de junio de 2025

RESUMEN

En este trabajo nos hemos enfocado en el estudio de la interacción entre la proteína albúmina y nanopartículas basadas en carbono, prestando particular atención al porcentaje de proteína libre tras la inmovilización, con el objetivo de estudiar la seguridad de las nanopartículas en sangre y su viabilidad a la hora de realizar estudios de transporte de fármacos in vivo.

Se han realizado estudios en cinco tipos de nanopartículas, y se ha conseguido un máximo de 100% de inmovilización utilizando nanotubos de carbono tanto en suero fetal bovino como en seroalbúmina bovina a pH 9 y 11.

Palabras clave: nanotecnología, óxido de grafeno, albúmina, inmovilización, nanotubos de carbono.

ABSTRACT

In this study we have investigated the interaction between albumin and nanoparticles based on carbon, paying particular attention to the percentage of free protein after immobilization with the objective of studying the safety of the nanoparticles in blood and their viability when it comes to studying drug delivery systems in vivo.

Five separate nanoparticles were studied, achieving a maximum of 100% immobilization using carbon nanotubes with both fetal bovine serum and bovine serum albumin at pH 9 and 10.

Key words: nanotechnology, graphene oxide, albumin, immobilization, carbon nanotubes.

Índice

RESUMEN	3
ABSTRACT	3
Capítulo 1. Introducción.....	8
Capítulo 2. Marco Teórico.....	9
2.1 Proteínas Utilizadas	9
2.1.1 Seroalbúmina Bovina (BSA)	9
2.1.2 Suero Fetal Bovino.....	10
2.2 Nanopartículas Utilizadas	11
2.2.1 Óxido de Grafeno	11
2.2.2 Óxido de Grafeno Expandido.....	12
2.2.3 Nanotubos de Carbono Multiwall	12
2.2.4 Nanofibras de Carbono	13
2.2.5 Nanoplaquetas de Grafeno	14
2.3 Inmovilización de proteínas.....	14
2.4 Técnicas.....	16
2.4.1 Espectrofotometría de onda	16
Capítulo 3. Procedimiento Experimental	17
3.1 Espectro de Absorción de la Proteína.....	18
3.1.1 BSA.....	19
3.1.2 FBS	19
3.2 Procedimiento Experimental	21
3.3 Resultados.....	22
Capítulo 4. Discusión y Análisis de Resultados	23
4.1 Nanotubos de Carbono.....	23
4.2 Óxido de Grafeno.....	26
4.3 Otras nanopartículas.....	28
4.4 Resultados Generales	29
Capítulo 5. Conclusiones y Líneas Futuras.....	32

5.1	Líneas Futuras	32
5.2	Conclusión.....	33
BIBLIOGRAFÍA		34

Índice de Figuras

Figura 1. Representación de la estructura tridimensional de la albúmina de suero bovino.....	10
Figura 2. Estructura del Óxido de grafeno.....	11
Figura 3. Estructura de los nanotubos de carbono.....	12
Figura 4. Imagen de microscopía electrónica de barrido de la estructura de las nanofibras de carbono.....	13
Figura 5. Imagen de microscopía electrónica de barrido de la estructura de las nano plaquetas.....	14
Figura 6. Inmovilización: Uniones químicas y sus tipos.....	15
Figura 7. Inmovilización: Uniones físicas y sus tipos.....	16
Figura 8. Diluciones Pierce BCA kit.....	19
Figura 9. Proporción absorbancia-concentración de BSA, con ecuación: $y=0.8449x+0.092$	20
Figura 10. Proporción absorbancia-concentración de FBS, con ecuación: $y=1.1673x-0.0959$	21
Figura 11. Proporción absorbancia-concentración de FBS, con ecuación: $y=0.9471x+0.022$	21
Figura 12. Comparación de valores de inmovilización de FBS con CNT a pH 9 y 11 a concentración 1mg/ml.....	24
Figura 13. Comparación de valores de inmovilización de FBS con CNT a pH 9 y 11 a concentración 0.2 mg/ml.....	25
Figura 14. Comparación de valores de inmovilización de BSA con CNT a pH 9 y 11 a concentración 0.2 mg/ml.....	25
Figura 15. Comparación de valores de inmovilización de BSA con GO a pH 7 y 9 a concentración 0.2 mg/ml.....	26
Figura 16. Comparación de valores de inmovilización de FBS con GO a pH 7 y 9 a concentración 0.2 mg/ml.....	27

Figura 17. Comparación de valores de inmovilización de FBS con GO a pH 7 y 9 a concentración 1 mg/ml.....	27
Figura 18. Comparación de valores de inmovilización de FBS con GO a pH 9 y 11 a concentración 1 mg/ml.....	28
Figura 19. Gráfica comparativa de inmovilización de albúminas (BSA y FBS) sobre partículas con base de carbono (CNT y GO).....	29

Índice de Tablas

Tabla 1. Tabla de abreviaciones.....	8
Tabla 2. Parámetros del experimento.....	16
Tabla 3. Materiales utilizados en el experimento.....	17
Tabla 4. Resumen de resultados del experimento.....	22

Capítulo 1. Introducción

El objetivo de esta investigación es analizar la interacción de distintas nanopartículas con la proteína más abundante en la sangre, la albúmina.

Cada vez se investigan más métodos de distribución de fármacos utilizando distintas nanopartículas para transportar sustancias a través del cuerpo humano, sin embargo, es muy importante investigar si estas partículas se agregan a la albumina ya que puede causar bloqueos en el torrente sanguíneo. Al investigar el proceso de inmovilización con la albúmina podemos tener una idea de cómo interactuarán con la sangre. Estas terapias son importantes para poder tener tratamientos cada vez más efectivos y que además sean capaces de minimizar los riesgos de los fármacos in vivo.

Es importante resaltar que en este experimento se han utilizado proteínas de fácil acceso que además no son tóxicas. La BSA y la FBS son de las proteínas más accesibles comercialmente, no son tóxicas y son completamente biocompatibles. La BSA tiene una analogía del 76% con la albumina humana, permitiendo hacer estudios que puedan tener cierta compatibilidad con lo que pasa en el cuerpo humano.

Las nanopartículas están todas basadas en el carbono, el elemento en el que se basa la vida, siendo muy abundante en la química orgánica y bioquímica, por lo que la accesibilidad es alta y el impacto ambiental es mínimo. Los procesos realizados en el experimento en cuanto a técnicas de laboratorio son seguros, con temperaturas suaves y pHs no extremos o agresivos. En ningún momento se realiza una técnica que tenga un gran aporte energético o que desprenda gases o materiales tóxicos. El único material que es tóxico son los nanotubos, sin embargo, al ser suspendidos en solución líquida pierden su toxicidad. En ninguna parte del proceso se generan productos secundarios, no hay desechos de ningún tipo.

El alcance del experimento comprenderá cinco tipos distintos de nanopartículas basadas en carbono: óxido de grafeno, nanotubos de carbono de varias paredes, nanofibras de carbono, óxido de grafeno expandido y nanoplaquetas de grafeno. Todas las partículas se analizarán alternando distintos parámetros como el pH, la concentración de la proteína, el tiempo de agregación y el origen de la proteína.

Capítulo 2. Marco Teórico

Abreviatura	Significado	Traducción
BSA	Bovine serum albumin	Seroalbúmina bovina
FBS	Fetal bovine serum	Suero fetal bovino
GO	Graphene Oxide	Óxido de grafeno
CNT	Carbon nanotubes	Nanotubos de carbono
EGO	Expanded graphene oxide	Óxido de grafeno expandido
GNP	Graphene nanoplatelets	Nanoplaquetas de grafeno
BCA	Bicinchoninic Acid	Ácido Bicinconínico

Tabla 1: Tabla de abreviaciones

2.1 Proteínas Utilizadas

2.1.1 Seroalbúmina Bovina (BSA)

Proteína más abundante que se encuentra en el plasma. El cuerpo produce albúmina sérica en el hígado, produciendo de 10 a 15 gramos al día, pudiendo ser duplicado o incluso cuadruplicado si es necesario. Forma aproximadamente 60% del plasma sanguíneo y el 50% de la actividad sintética del hígado. [1]

La principal función de la albúmina es evitar la filtración de los líquidos del torrente sanguíneo a otros tejidos, regula la distribución de los fluidos, modulando la presión osmótica. Aproximadamente el 80% de la actividad osmótica en el plasma es desarrollada por la albúmina, además regulando el pH.

Es altamente soluble y tiene una carga muy negativa, sin embargo, puede ligarse con cationes o aniones, dotando su función como transportador en el plasma sanguíneo, transportando sustancias tanto endógenas como exógenas, por ejemplo, hormonas tiroideas, hormonas liposolubles, bilirrubina, fármacos, aminoácidos, ácidos grasos, esteroides y metales. [2,3]

Se compone por 585 aminoácidos (9160 átomos), teniendo 17 puentes de disulfuro. Su masa molecular varía de 66000 a 69000 daltons, dependiendo de su origen, y es gracias a su alto peso molecular que puede regular la presión oncótica. Su tamaño es de aproximadamente 7.5nm. Tiene una vida media (half-life) de 19 días y es estable en un rango de pH de 4 a 9. Es coagulable con el calor, y otros factores que afectan su coagulación son el pH y los niveles de sal. Entre sus otras funciones, es antioxidante, previniendo la creación de radicales libres.



Figura 1: Representación de la estructura tridimensional de la albúmina de suero bovino [4]

2.1.2 Suero Fetal Bovino

El suero fetal bovino (FBS) es una proteína análoga de la BSA obtenida del feto bovino. Su componente mayoritario es la albúmina, sin embargo, en su versión fetal, tiene ligeras diferencias estructurales y funcionales, como por ejemplo, una mayor avidez por unirse a ciertas moléculas.

2.2 Nanopartículas Utilizadas

2.2.1 Óxido de Grafeno

Derivado del grafeno que tiene adición de grupos funcionales como los carbonilos, epoxis o hidroxilos. Su estructura consiste en una capa única de óxido de grafito que tiene características diferentes dependiendo del grado de oxidación.

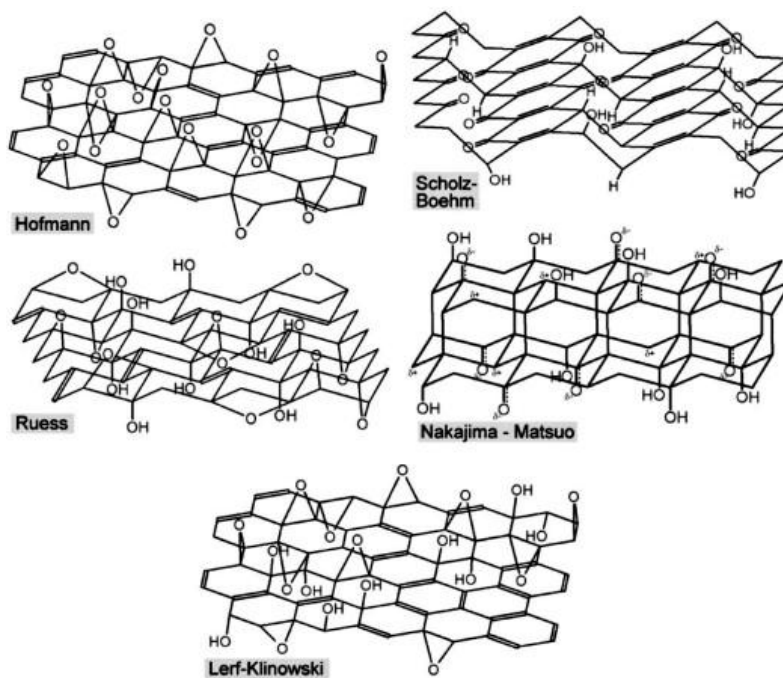


Figura 2: Estructura del Óxido de grafeno [5]

Sus propiedades ópticas y electrónicas son modificables mediante la adición de grupos de oxígeno, que pueden ajustar la proporción de carbono sp^2 y sp^3 , esto es realizable a gran escala haciéndolo un material muy versátil. A pesar de tener una estructura similar al grafeno, sus capas están separadas por 0.7nm, el doble que el grafeno, provocado por la polaridad de los grupos funcionales.

Es altamente hidrofílico y tiene carácter anfipático, donde un extremo de la partícula es soluble al agua y el otro no, esto provoca que forme coloides estables al aplicarle ultrasonidos. Otra propiedad interesante es que es antibacteriano. [6]

Como usos, se está investigando su uso en el transporte de medicamentos, como sensores biomédicos y como filtros para la eliminación de contaminantes en el agua, ya que permite el paso de las moléculas de agua. [7]

2.2.2 Óxido de Grafeno Expandido

El óxido de grafeno expandido o EGO es cualquier versión del óxido de grafeno que ha sido modificado para tener más grupos funcionales, normalmente sufre procesos de oxidación o reducción para modificar su estructura.

2.2.3 Nanotubos de Carbono Multiwall

Estructuras de grafeno enrollado sobre si mismas. Sus propiedades están dadas por la quiralidad, diámetro del tubo y el número de paredes que tienen. Hay tres tipos de estructuras dependiendo de su quiralidad. Ya que cada capa de grafito es semi-metálica, se forman interacciones entre capa y capa y dependiendo de la estructura en la que estén tienen propiedades metálicas o de semiconductores.

zig-zag $(n, 0) \equiv \theta=0^\circ$

“armchair” $(n, n) \equiv \theta=30^\circ$

quirales $(n, m) \equiv 0^\circ < \theta < 30^\circ$

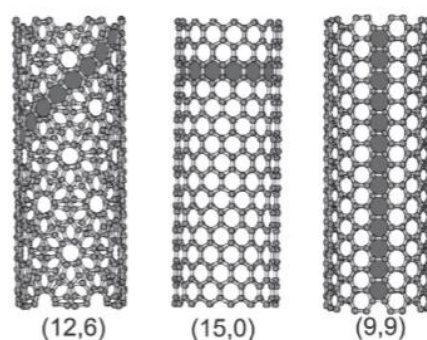


Figura 3: Estructura de los nanotubos de carbono [8]

Los nanotubos zig-zag y quirales tienen propiedades metálicas o semiconductoras y los nanotubos armchair tienen propiedades metálicas.

Estos materiales presentan buenas propiedades tanto físicas como químicas, por ejemplo, la conductividad térmica, la alta densidad, la resistencia y flexibilidad y su versatilidad en propiedades electrónicas. Además de ello permiten un transporte de electrones inmediato. Otra propiedad muy interesante es que son deformables, pero tienen la capacidad de mantenerse en régimen elástico y volver a su estado anterior.

A pesar de que son químicamente inertes en la mayoría de su estructura, tienen debilidades cerca de los extremos o en las partes donde puede haber defectos estructurales, las cuales permiten realizar modificaciones a la estructura y funcionalizarlos.

Entre sus usos, cabe resaltar que el área con mayor interés es la electrónica ya que son capaces de transportar corriente eléctrica sin calentar la estructura. También permiten desarrollar nanointerruptores, utilizables tanto en circuitos eléctricos como en técnicas biológicas. Además de ello se está investigando su uso como sensores químicos y de gas. [8]

2.2.4 Nanofibras de Carbono

Estructuras poliméricas compuestas por carbono con diámetros inferiores a 100nm. Se componen de placas de grafito apiladas en la dirección longitudinal de la fibra. Tienen propiedades inferiores a los nanotubos de carbono en cuanto a sus propiedades térmicas y eléctricas, pero su síntesis y producción es mucho menos cara. La principal diferencia estructural entre las fibras y los tubos es que los tubos tienen sus capas de grafeno estructuradas en un cilindro perfecto.

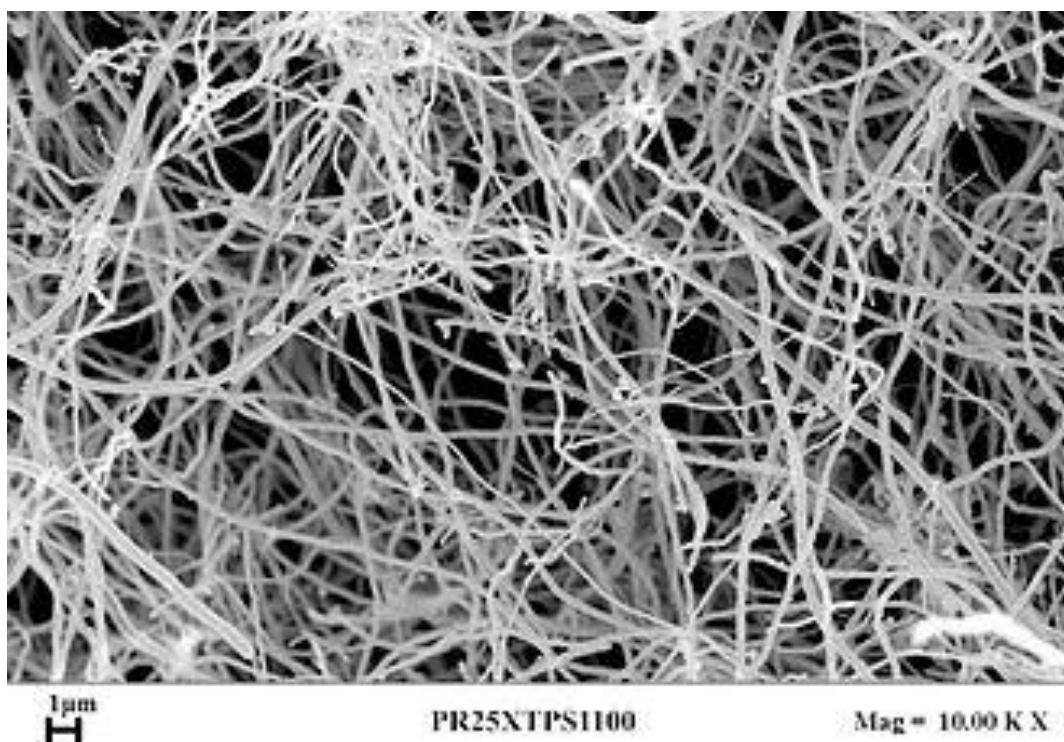


Figura 4: Imagen de microscopía electrónica de barrido de la estructura de las nanofibras de carbono [9]

Entre sus usos se está investigando su utilización en sistemas de transporte de fármacos así como componente de ánodos en baterías de litio y como parte de las puntas de microscopios de barrido. [9]

2.2.5 Nanoplaquetas de Grafeno

Nanomateriales compuestos de grafeno con estructura formada por múltiples capas de grafeno apiladas. Tienen una gran conductividad, resistencia a la corrosión y a las altas temperaturas, teniendo aplicaciones sobre todo en la conductividad térmica y como agente antiestático. [10]

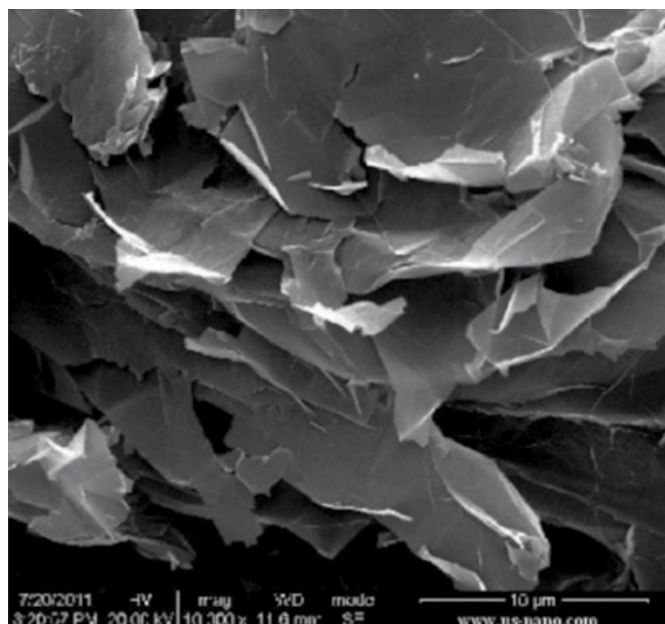


Figura 5: Imagen de microscopía electrónica de barrido de la estructura de las nano plaquetas [11]

2.3 Inmovilización de proteínas

La inmovilización de proteínas es una técnica que tiene como objetivo restringir el movimiento de una proteína a un soporte o matriz. Hay varios tipos de interacciones que pueden resultar en una inmovilización, podemos clasificarlas en dos grandes categorías, las que tienen una interacción física y las que tienen una unión química.

En el caso de la inmovilización por unión química, depende de las propias fuerzas de las dos partículas. En el caso de los enlaces covalentes y de la adsorción iónica, suelen ser enlaces fuertes y estables, mientras que las fuerzas intermoleculares dependen de interacciones puntuales entre las moléculas.

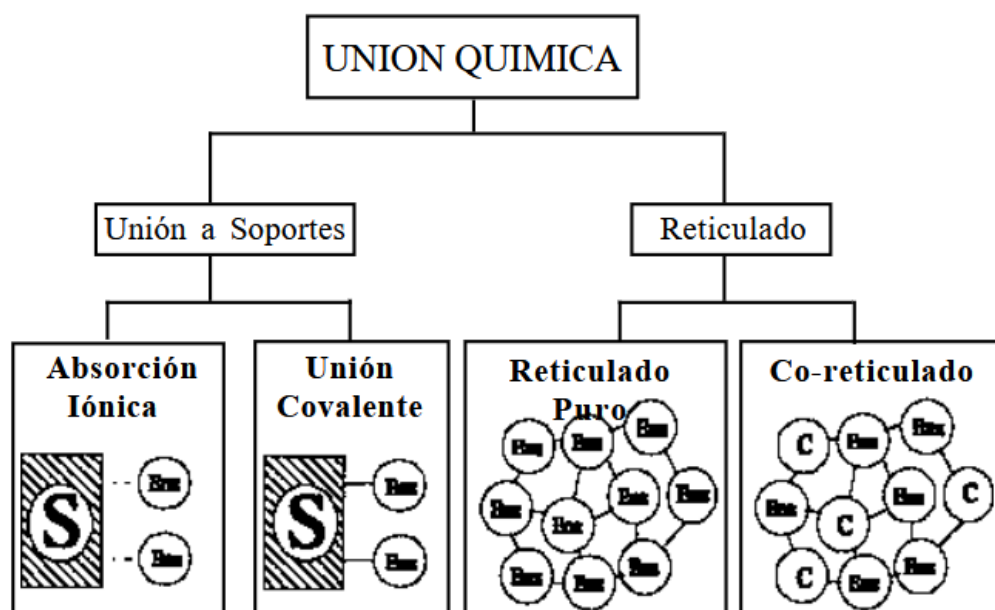


Figura 6: Inmovilización: Uniones químicas y sus tipos [12]

Las uniones físicas, por lo general ocurren por las características estructurales de los dos objetos. El atrapamiento consiste en que la propia proteína quede atrapada en la matriz o soporte, independientemente de las atracciones físicas que lleguen a surgir, mientras que el encapsulado consiste en que la partícula englobe completamente a la proteína, por ejemplo, en una membrana. [12]

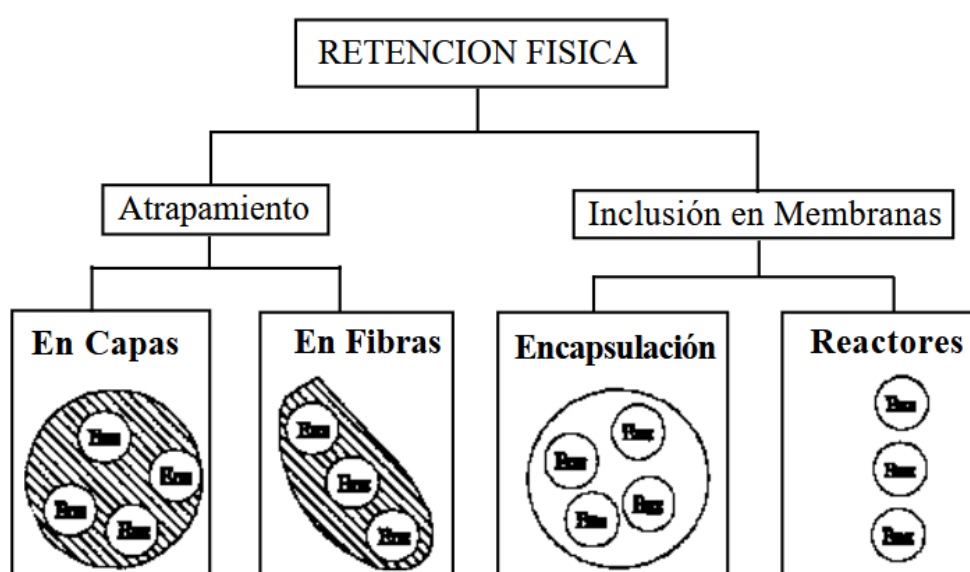


Figura 7: Inmovilización: Uniones físicas y sus tipos [12]

2.4 Técnicas

2.4.1 Espectrofotometría de onda

Técnica de detección de moléculas que analiza la interacción entre una sustancia y una longitud de onda determinada. Se basa en la ley de Beer-Lambert que relaciona la absorbancia de la sustancia, su concentración y la longitud del rayo de luz para determinar la cantidad de energía absorbida. Cada sustancia tiene una curva de absorción única, con la que se puede determinar la presencia de ella analizando los patrones de absorción.

La prueba utilizada en este experimento es la del ácido biciconínico (BCA), un método que analiza la interacción del ácido biciconínico, la luz y la reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} . En un medio alcalino, el cobre se reduce, el cual forma un complejo con el ácido, volviéndose morado oscuro. Este complejo absorbe luz a 562nm en una proporción lineal con la proteína.

Las estructuras macromoleculares como las proteínas son las que inician la reacción del ácido biciconínico y el cobre, por lo que a mayor presencia la reacción es más rápida. Es común que los espectrofotómetros tengan integradas las curvas patrón de los métodos más comunes, con los que se comparan los resultados captados. [13]

Capítulo 3. Procedimiento Experimental

Se necesita utilizar una nanopartícula que sea inerte en la sangre, es decir que no sea adsorbida por la proteína más abundante en la sangre, la albúmina. Para ello tenemos que determinar bajo que parámetros o no es absorbida por esta partícula. Vamos a evaluar 5 tipos de nanopartículas con FBS y BSA.

Parámetros modificables	
pH	7, 9, 11
Concentración de Proteína	1mg/ml, 0.2 mg/ml
Tiempo	15min a 1 semana
Nanopartícula	GO, EGO, CNT, GNP, CNF
Parámetros estáticos	
Temperatura ambiente	25°C
Cantidad Nanopartícula	10mg

Tabla 2: Parámetros del experimento

Método de evaluación:

Mediante el uso de un espectrofotómetro se va a evaluar la absorbancia de las proteínas a 562nm, la cantidad de luz absorbida por el compuesto es directamente proporcional a la cantidad de proteína que tenemos. Evaluaremos el líquido en la interfaz tras centrifugar la mezcla del buffer con la proteína, si sabemos cuánto hay en el restante que no se ha agregado, sabremos cuanto no se ha adsorbido.

Se van a tomar muestras en intervalos temporales de 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 24 horas y una semana para observar la progresión de la adsorción por parte de la proteína y poder analizar su comportamiento a largo plazo.

Materiales:

Espectrofotómetro	Espectrostar
Software Espectrofotómetro	NanoStar Data Analysis
Centrifuga	VWR CompactStar CS4
Balanza analítica	Pioneer Ohaus
BSA	Extraída de: Pierce BCA Kit
FBS	Gibco
Multi-Walled Carbon Nanotubes	Sigma-Aldrich
Graphene Oxide	Nanoinnova
Graphene nanoplatelets	Sigma-Aldrich
Carbon nanofibers	Sigma-Aldrich
Expanded graphere oxide	Sigma-Aldrich
BCA kit	Pierce BCA Kit
Noria	VWR Rotating Mixer XL

Tabla 3: Materiales utilizados en el experimento

3.1 Espectro de Absorción de la Proteína

Para poder analizar el grado de absorción por parte de la proteína es necesario conocer su espectro de absorción 562nm. La proporción de absorción es directamente proporcional a la concentración de proteína. Se ha utilizado un kit de BCA comercial con las diluciones ya dotadas, incluyendo cuantos mg/ml hay en la cantidad de líquido. Ya que la FBS disponible es pura, tuvimos que realizar diluciones individuales y determinar la concentración de proteína por mililitro.

3.1.1 BSA

Para conocer el espectro de absorción de la BSA se ha utilizado el Pierce BCA Kit.

Dilution Scheme for Standard Test Tube Protocol and Microplate Procedure (Working Range = 20-2,000µg/mL)			
<u>Vial</u>	<u>Volume of Diluent (µL)</u>	<u>Volume and Source of BSA (µL)</u>	<u>Final BSA Concentration (µg/mL)</u>
A	0	300 of Stock	2000
B	125	375 of Stock	1500
C	325	325 of Stock	1000
D	175	175 of vial B dilution	750
E	325	325 of vial C dilution	500
F	325	325 of vial E dilution	250
G	325	325 of vial F dilution	125
H	400	100 of vial G dilution	25
I	400	0	0 = Blank

Figura 8: Diluciones Pierce BCA kit

Donde obtuvimos que la proporción concentración absorbancia era la siguiente:

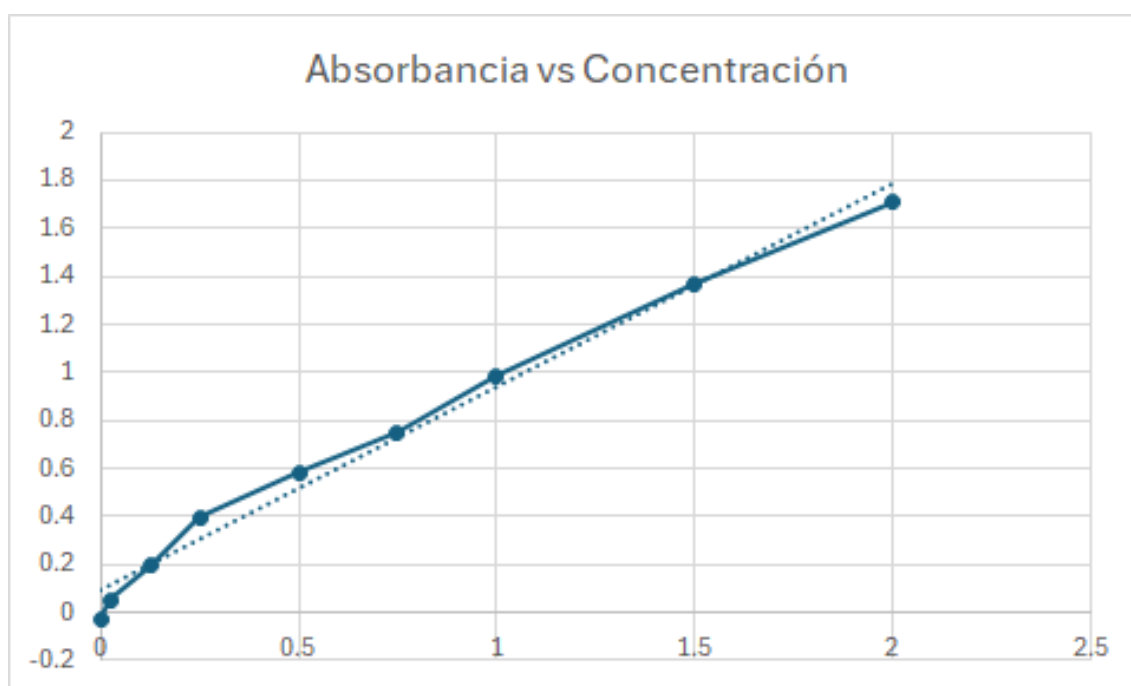


Figura 9: Proporción absorbancia-concentración de BSA, con ecuación:

$$y=0.8449x+0.092$$

3.1.2 FBS

Se realizaron diluciones manuales de suero fetal bovino para determinar la proporción mg/ml. En el caso de la FBS, partíamos de mezclas mucho más concentradas de proteína y

partículas, por lo que fue necesario realizar un recalibrado para poder tener una recta patrón lo más ajustada posible a nuestros resultados y ser capaces de interpretarlos mucho más fiablemente (y es por ello por lo que tenemos dos versiones distintas). Gracias a estos calibrados, pudimos conocer las concentraciones de los stocks de proteína de los que partíamos. En el caso de la BSA teníamos 2 mg/ml y en la FBS 50 mg/ml. Fue imprescindible para hacer los cálculos de los volúmenes de stock que debíamos emplear en cada experimento.

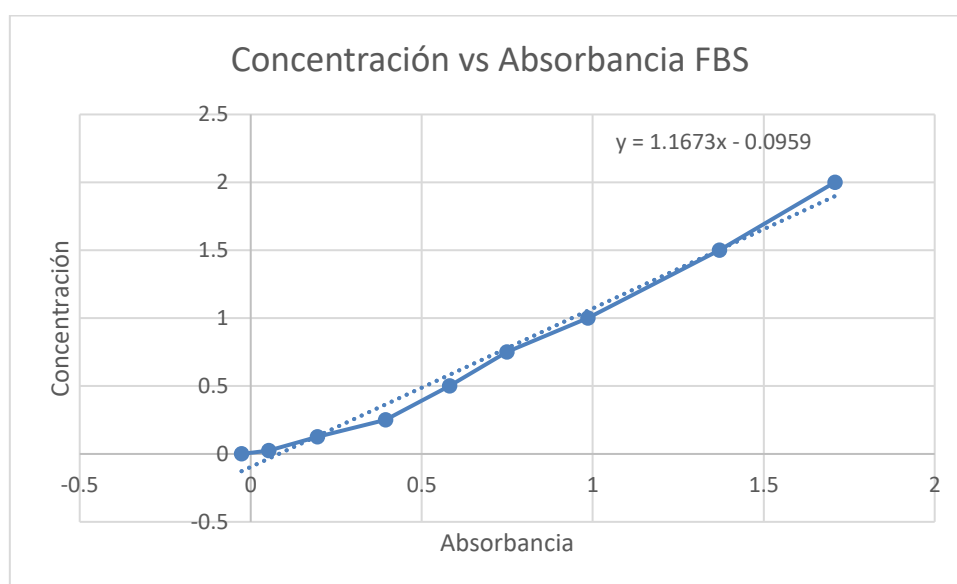


Figura 10: Proporción absorbancia-concentración de FBS, con ecuación: $y=1.1673x-0.0959$

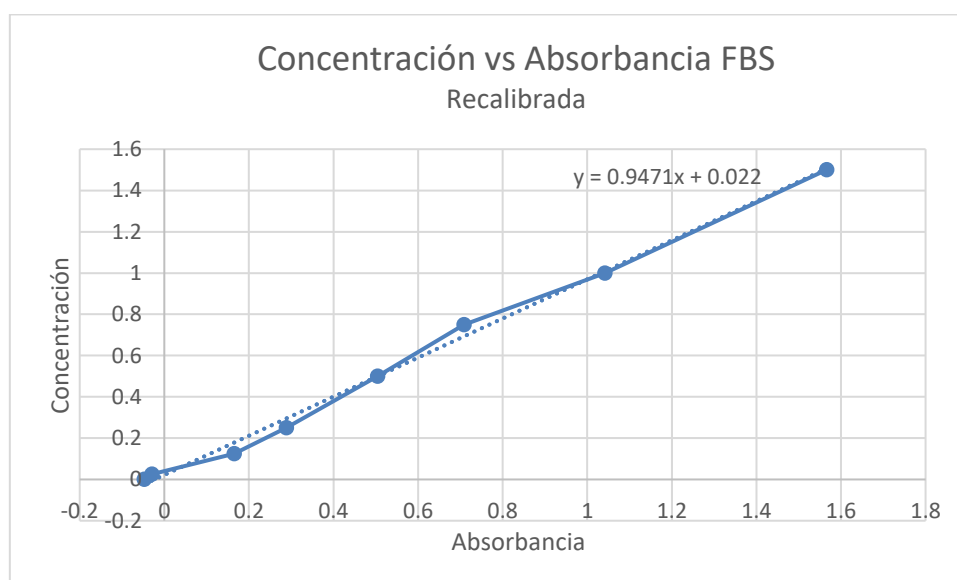


Figura 11: Proporción absorbancia-concentración de FBS, con ecuación: $y=0.9471x+0.022$

Durante el experimento, se utilizarán las ecuaciones obtenidas por el espectrofotómetro para obtener el valor de concentración de la proteína en el volumen medido, se comparará la medida al valor inicial donde no hay nanopartículas introducidas en el sistema.

3.2 Procedimiento Experimental

Debido a que el experimento se repite en varias iteraciones cambiando variables como la nanopartícula y la proteína y su concentración, se describirá el procedimiento genérico aplicado en cada caso.

Antes de elaborar los experimentos se prepararon soluciones buffer de pH 7, pH9 y pH 11. Para el buffer de pH 7 se utilizó agua destilada y fosfato monopotásico 25mM. Para el buffer de pH 9 se utilizó agua destilada y bicarbonato de sodio 25mM, en el caso del de pH 11 se añadieron gotas de hidróxido de sodio hasta conseguir el pH deseado.

- Utilizando una balanza analítica se pesan 10mg de la nanopartícula y se coloca en un Eppendorf.
- En un tubo Falcon se depositan 4ml del buffer correspondiente.
- Se añaden la cantidad correspondiente de proteína al buffer, dependiendo de la concentración deseada.
- Se toman dos muestras tiempo 0 de 25 μ l de la mezcla de buffer y proteína y se colocan en una placa multipocillo. Se toman dos muestras para garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos en cada punto.
- Utilizando una pipeta se introduce la nanopartícula a la mezcla de buffer y proteína.
- Se coloca el tubo Falcon en un agitador tipo noria.
- Al pasar 15 minutos, se centrifuga el tubo Falcon a 5000rpm durante un minuto*
- Se toman dos muestras de 25 μ l y se colocan en la placa multipocillo. Es importante tomar solamente del líquido restante de la centrifugación, cercano a la interfase.
- Se vuelve a colocar el tubo Falcon en la noria y se centrifuga y toman muestras tras pasar 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 120 minutos, 1200 minutos y 10080 minutos.
- Una vez se hayan tomado las muestras, se introduce la placa multipocillo en el espectrofotómetro para poder comprobar la cantidad de proteína.

*Ciertas nanopartículas tardan más en depositarse, puede que requieran más tiempo

3.3 Resultados

Nº	FECHA	PROTEÍNA	CONCENTRACIÓN mg/ml	PARTÍCULA	pH	% de proteína libre mínima	t minutos	% en t 10080
1	05/03/2025	BSA	0.2	GO	7	75%	10080	75%
2	05/03/2025	BSA	0.2	GO	9	67%	10080	67%
3	12/03/2025	FBS	0.2	GO	7	87%	120	100%
4	12/03/2025	FBS	0.2	GO	9	71%	10080	71%
5	19/03/2025	FBS	1	GO	7	87%	30	100%
6	19/03/2025	FBS	1	GO	9	84%	15	100%
7	26/03/2025	FBS	1	CNF	9	100%	0	100%
8	26/03/2025	FBS	1	GNP	9	100%	0	100%
9	26/03/2025	FBS	1	EGO	9	84%	1200	100%
10	26/03/2025	FBS	1	CNT	9	66%	1200	100%
11	02/04/2025	FBS	1	EGO	9	82%	15	91%
12	02/04/2025	FBS	1	EGO	11	68%	1200	80%
13	02/04/2025	FBS	1	CNT	9	43%	10080	43%
14	02/04/2025	FBS	1	CNT	11	51%	10080	51%
15	07/05/2025	BSA	0.2	CNT	9	0%	1200	0%
16	07/05/2025	BSA	0.2	CNT	11	0%*	1200	0%*
17	07/05/2025	FBS	0.2	CNT	9	0%	1200	0%
18	07/05/2025	FBS	0.2	CNT	11	0%	1200	0%

Tabla 4: Resumen de resultados del experimento

*Se formó un pellet

Capítulo 4. Discusión y Análisis de Resultados

4.1 Nanotubos de Carbono

Se puede observar que, con diferencia, las nanopartículas con mayor grado de inmovilización son los nanotubos de carbono, teniendo porcentajes de proteína libre mínimos en muchos casos de un 0%.

Es importante resaltar la relación concentración proteína con la inmovilización. Al haber una cantidad menor de proteínas, hay suficientes nanotubos para suplir a todas. Los nanotubos tienen un tamaño bastante superior a las proteínas, pudiendo adsorber a varias en distintos puntos de unión, incluyendo el interior y exterior de la partícula. Cuando la concentración de proteínas por mililitro es pequeña, hay suficientes proteínas para ser inmovilizadas por todos los tubos. Al aumentar la concentración, no hay suficientes nanotubos para suministrar a todas, por lo que muchas proteínas se quedan libres. En este caso sería interesante probar con una cantidad mayor de nanopartículas para evaluar exactamente a que proporción de nanopartículas por gramo de proteína dejamos de tener todas inmovilizadas.

Los nanotubos de carbono al ser multi-pared y oxidados a un 30% son muy reactivos y tienen grupos libres en la superficie que permiten que se adhieran a otros. En este caso los nanotubos utilizados estaban funcionalizados con ácido carboxílico, aumentando todavía más su reactividad. Estas partículas tienen una afinidad natural a las proteínas mediante interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, en muchos casos las proteínas acaban atrapadas en los nanotubos, sin haber necesidad de modificar el medio. Una propiedad interesante de los nanotubos de carbono es que, al ser introducidos a altas temperaturas, las estructuras se separan, perdiendo su forma. Sin embargo, al utilizar solamente temperatura ambiente, la estructura se conserva.

[14]

En este caso el tamaño de nuestros nanotubos era de $D\ 9.5\text{ nm} \times L\ 9.5\text{ nm} \times 1.5\text{ }\mu\text{m}$, el de la proteína albúmina suele rondar los $3 \times 8\text{ nm}$, por lo que es muy probable que las proteínas hayan sido atrapadas en el interior del tubo y adsorbidas en las paredes. Al ser bastante más grandes los nanotubos y tener tanta superficie que no solo interactúa si no que

son reactivas, teniendo grupos funcionales por todos los lados es normal que hayan tenido la mayor tasa de inmovilización.

En el caso de los experimentos con concentración de 1mg/ml de FBS, podemos ver que el pH menos básico tiene una tasa de inmovilización mayor, al tener menos proteína libre en la mayoría de los casos que la solución de pH 11. Sin embargo, en muchos casos la diferencia es relativamente pequeña, y si tomamos en cuenta el porcentaje de error, es probable que la diferencia no sea particularmente significativa.

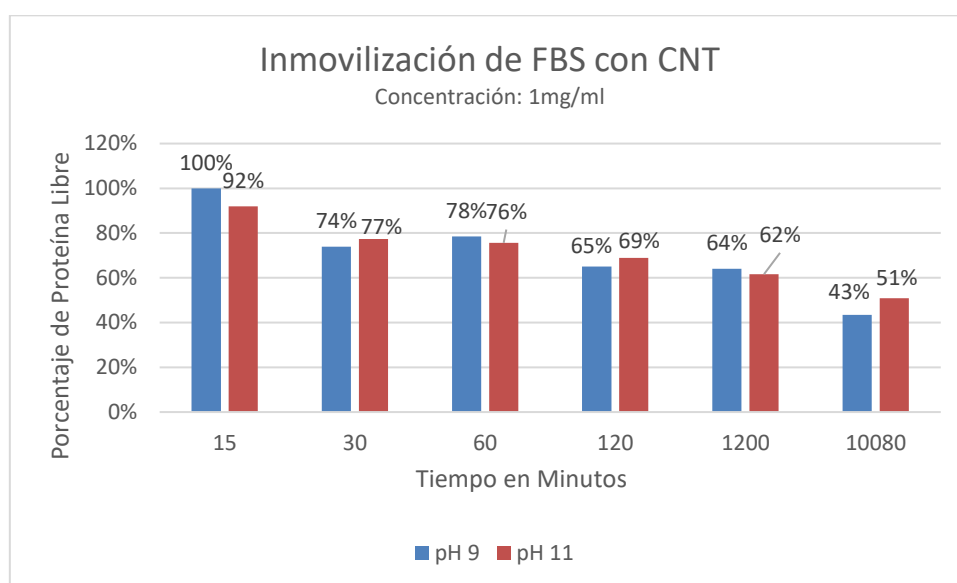


Figura 12: Comparación de valores de inmovilización de FBS con CNT a pH 9 y 11 a concentración 1mg/ml

Al disminuir la concentración de proteína, podemos ver que la inmovilización no solo es más rápida, sino que tenemos valores aceptables a la hora en el caso del pH 9 y a las dos horas en el caso del pH 11. Por lo general con otras nanopartículas difícilmente llegamos a un grado de proteínas libres menor a 60%.

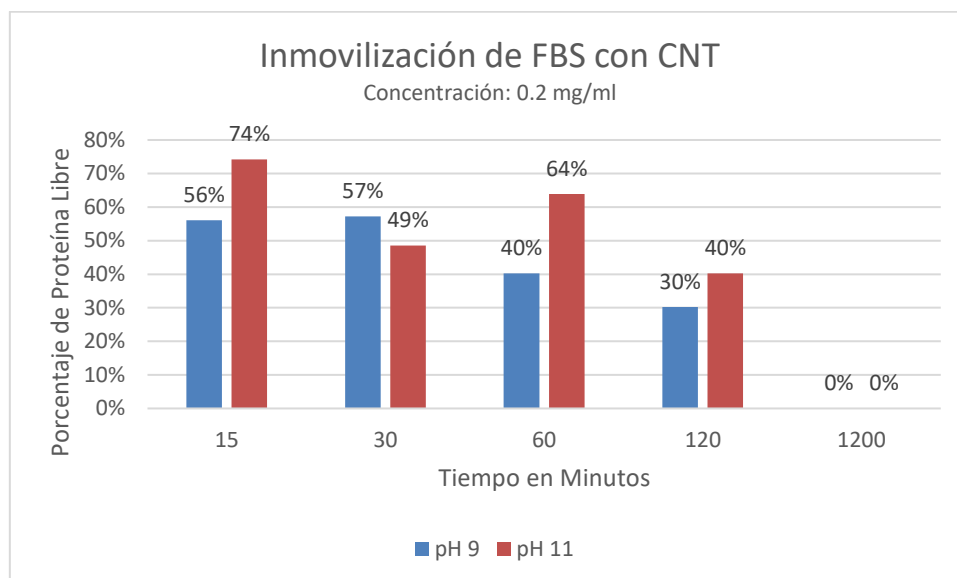


Figura 13: Comparación de valores de inmovilización de FBS con CNT a pH 9 y 11 a concentración 0.2 mg/ml

La BSA a concentraciones pequeñas, de 0. mg/ml dio resultados parecidos, teniendo un porcentaje más alto de inmovilización desde los 15 minutos en la solución de pH 9.

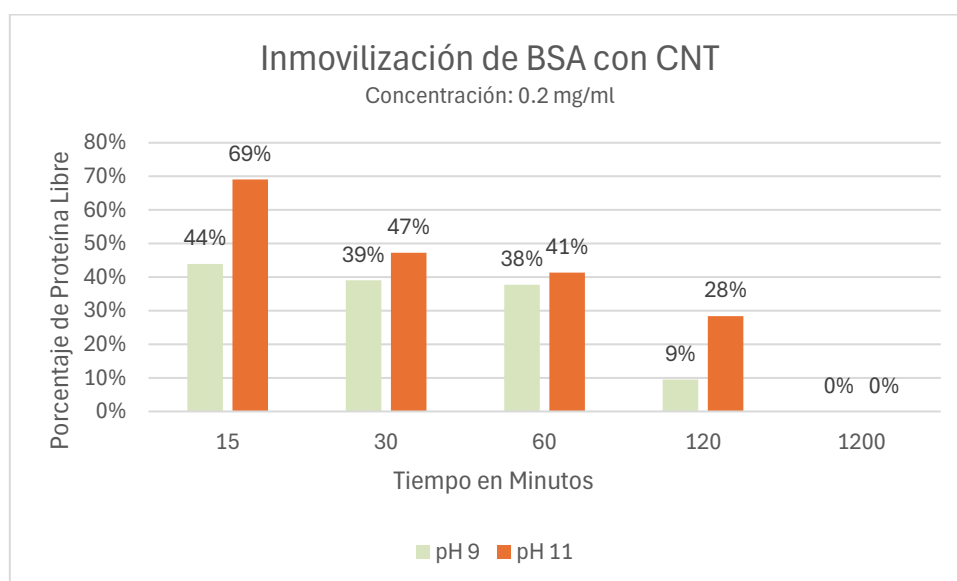


Figura 14: Comparación de valores de inmovilización de BSA con CNT a pH 9 y 11 a concentración 0.2 mg/ml

Sin embargo, en este caso, puede ser que el buffer de pH 11 no fuese compatible con el medio comercial en el que se suspende la BSA. A pesar de quedarse durante 24h en constante movimiento mediante la noria, al siguiente día la suspensión formó una aglomeración o pellet, teniendo que sonicar la solución para poder separarla, y aun así con

dificultad. Es cierto que el pH alto cambia la estructura tanto de la proteína como de la nanopartícula, sin embargo, al solamente suceder en la BSA a pH 11, podemos asumir que el problema está en el medio comercial de la BSA.

Al obtener resultados buenos utilizando nanotubos en una proteína inactiva y con poca interacción relativa, podemos extrapolar la conclusión de que los nanotubos serían capaces de pegarse a otras partículas y proteínas.

4.2 Óxido de Grafeno

El óxido de grafeno expandido y normal sería el siguiente con mejores resultados, obteniendo un máximo de 67% de proteína libre con BSA a pH 9 en concentración de 0.2 mg/ml. En la mayoría de los casos, curiosamente, el máximo de inmovilización no se encuentra a la semana, teniendo una separación y volviendo a un valor superior o incluso a 100% de proteína libre.

En el caso de la BSA, podemos ver que el pH más alto favorece la inmovilización, sin embargo, hasta los sesenta minutos, la diferencia no es particularmente notable, e incluso tras una semana no es una proporción de inmovilización muy alta.

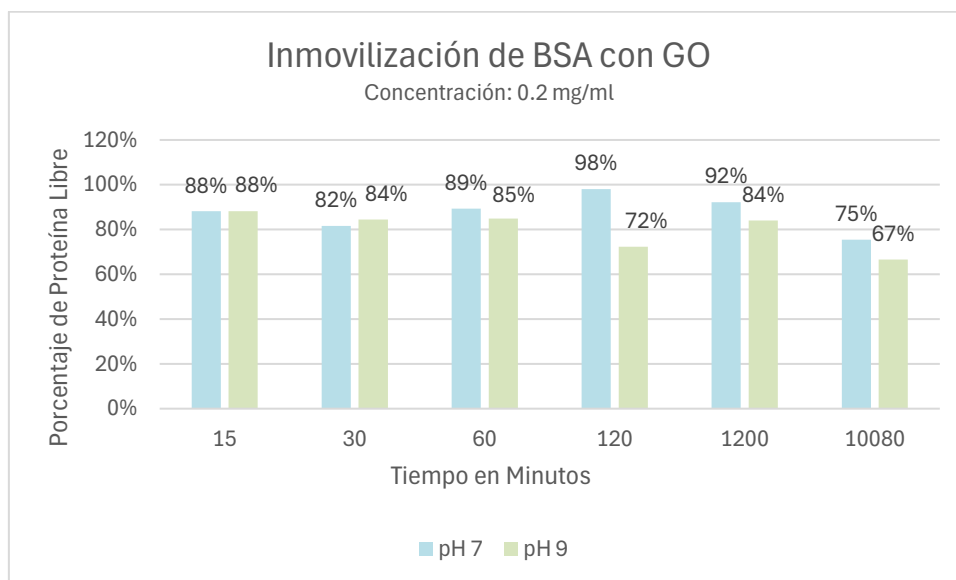


Figura 15: Comparación de valores de inmovilización de BSA con GO a pH 7 y 9 a concentración 0.2 mg/ml

En el caso de la FBS, obtenemos resultados similares, en todos los pHs y en todas las concentraciones. En el caso del pH neutro, podemos ver que no hay ninguna inmovilización salvo a la hora. Por lo general el pH neutro no promueve interacciones entre las moléculas ni modifica sus estructuras, por lo que es normal que la actividad sea poca. Los resultados son parecidos en el caso de una concentración más alta, donde en el caso del pH neutro, no se observa inmovilización tras los primeros 30 minutos, siendo además muy pequeña. Igualmente, en pH 9 los valores son menores que a menor concentración.

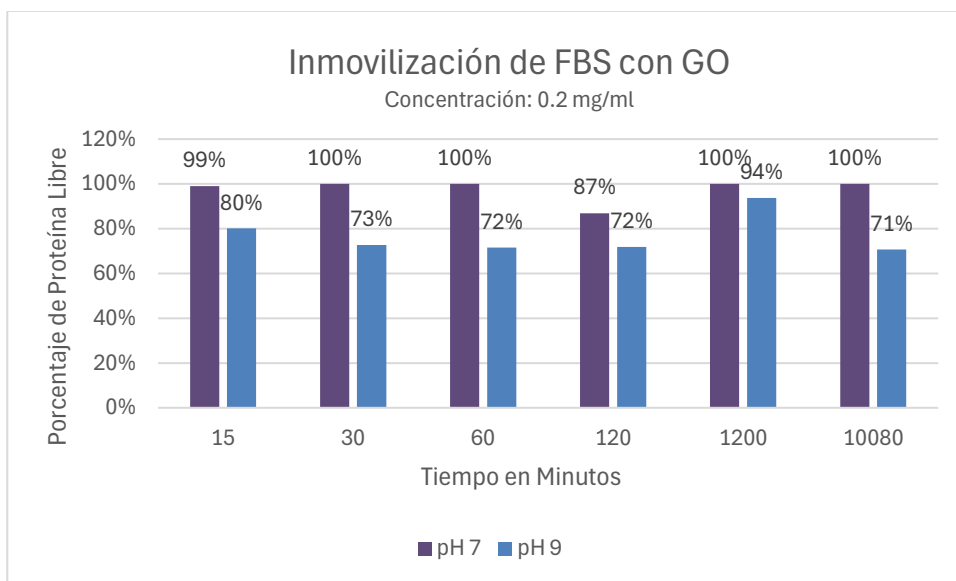


Figura 16: Comparación de valores de inmovilización de FBS con GO a pH 7 y 9 a concentración 0.2 mg/ml

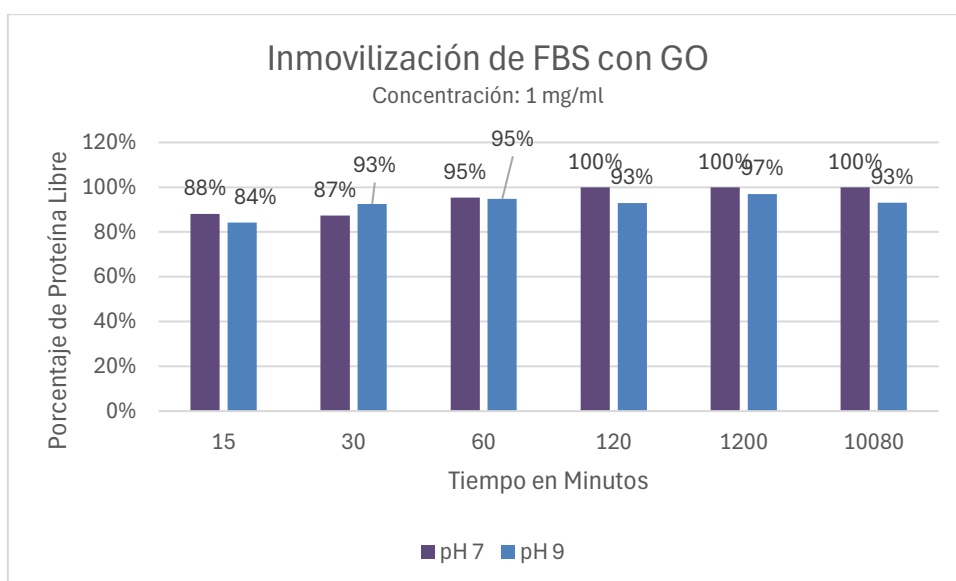


Figura 17: Comparación de valores de inmovilización de FBS con GO a pH 7 y 9 a concentración 1 mg/ml

Al utilizar óxido de grafeno expandido, se obtienen mejores resultados, a pesar de no ser ideales, tiene sentido que el EGO tenga mayor capacidad de inmovilización ya que está modificado químicamente para tener más puntos de funcionalización, los cuales son más reactivos. En este caso también, el pH mayor favorece la inmovilización.

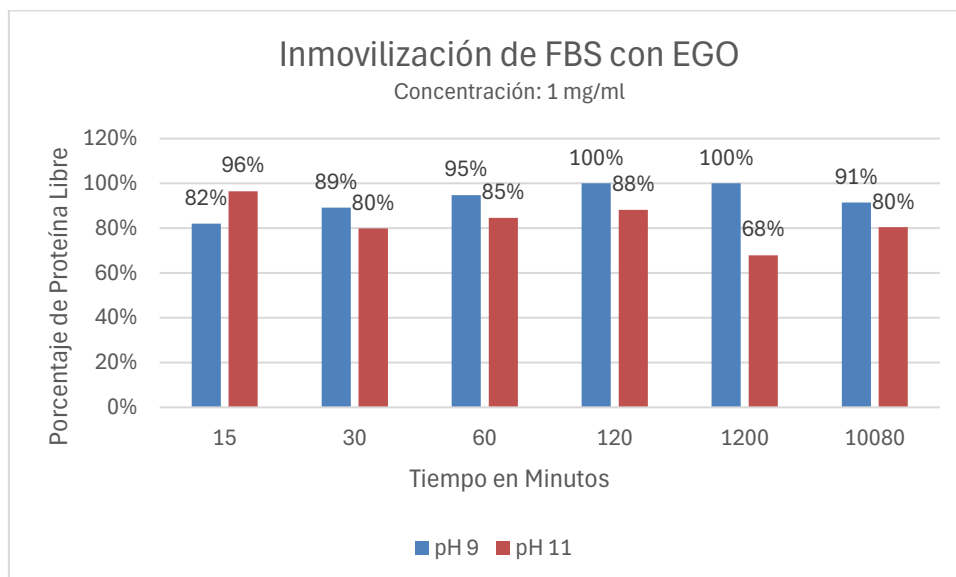


Figura 18: Comparación de valores de inmovilización de FBS con GO a pH 9 y 11 a concentración 1 mg/ml

4.3 Otras nanopartículas

Se examinó la interacción de las nanoplaquetas de grafeno y de las nanofibras de carbono con el FBS a pH 9, sin embargo, la tasa de proteína libre fue de 100% en todos los tiempos del experimento.

	t0	t15	t30	t60	t120	t1200	t10080
Proteína Libre GNF	100%	108%	104%	106%	102%	111%	125%
Proteína Libre CNP	100%	112%	105%	112%	104%	109%	125%

4.4 Resultados Generales

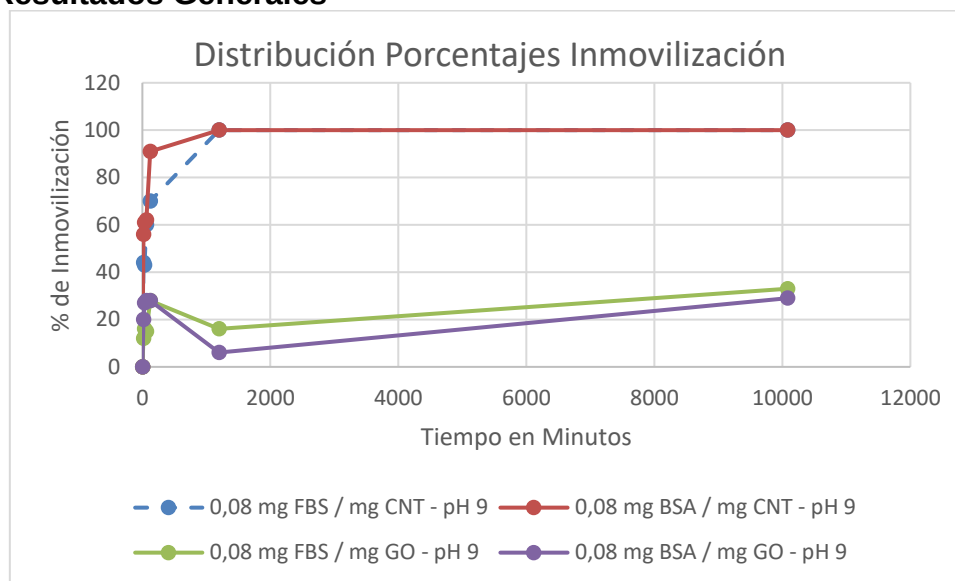


Figura 19: Gráfica comparativa de inmovilización de albúminas (BSA y FBS) sobre partículas con base de carbono (CNT y GO).

Tal como se puede observar en la figura 12, si tenemos en cuenta únicamente los mejores resultados obtenidos, podemos concluir que, en todos los casos, las concentraciones bajas de proteína son más favorables para la inmovilización de las proteínas. Esto puede deberse a que, tal como se mencionó anteriormente, tanto la BSA como la FBS tienen un tamaño y volumen muy superior a la mayoría de las nanopartículas y pueden estar compitiendo entre las propias moléculas de proteína por adsorberse sobre las nanopartículas disponibles, aparte de causar impedimentos estéricos a la hora de interaccionar con los grupos funcionales de las partículas oxidadas. En el caso de los nanotubos de carbono sería lo contrario, los nanotubos tienen una superficie bastante mayor a la proteína, teniendo entonces muchos puntos de unión al tener grupos reactivos en todas las caras. En este caso, se pueden adsorber muchas más proteínas por partícula, por lo que tener una concentración pequeña hace que sea posible que todas las partículas sean adsorbidas sin problema.

En cuanto a las diferencias en los resultados a diferentes pHs, en todos los casos vemos que el pH más alcalino favorece la inmovilización. Dado que el punto isoeléctrico de la BSA y la FBS está en el rango de pH ácido (4.5-5.5) en todos los pH ensayados, van a estar cargadas negativamente, pero el grado de deprotonación de los grupos amino de los aminoácidos básicos va a ser mayor cuanto más extremos sea el pH. A pH 11, el tratamiento es excesivamente agresivo, pero a pH 9 se llega a un compromiso en el que la proteína aún es

estable pero su superficie es más reactiva. Tal como se indicó en el apartado sobre la BSA, esta proteína es estable hasta pH 9, por tanto, los experimentos a pH 11 no arrojan resultados relacionables con la proteína en su configuración in vivo y se realizaron únicamente con fines académicos.

Respecto a la proteína, no hay diferencias muy significativas entre ellas. En la inmovilización sobre nanotubos, tiempos más cortos (60-120 minutos), aparentemente, la BSA se inmoviliza más rápido, pero el transcurso general del proceso sucede prácticamente en paralelo. Este fenómeno se repite en óxido de grafeno (GO), en el que también la BSA parece ser más lenta en tiempos inferiores a 60 minutos pero en los puntos finales su inmovilización parece ser mejor, aunque las diferencias son menores del 10%.

Finalmente, podemos apreciar que las diferencias más evidentes se dan entre los soportes. En el caso de la inmovilización en CNT, ambas proteínas alcanzan un 100% de inmovilización a las 20 horas (1200 minutos), proceso que es estable, ya que a la semana (10080 minutos) permanece completamente inmovilizada. El comportamiento sobre GO es mucho más complejo; la inmovilización máxima se alcanza a las 2 horas pero es muy inferior (entorno al 30%), a las 20 horas disminuye en ambas proteínas y se recupera a la semana. Una posible justificación podría ser que son uniones muy débiles, reversibles, y necesitan cierto tiempo para estabilizarse. Suceden de manera más o menos rápida, pero a las 24 horas aún no están completamente asentadas y necesitan más tiempo de incubación para fijarse en ese valor máximo.

Una posible explicación para esta diferencia es la configuración tridimensional de las partículas. Las nanopartículas de óxido de grafeno son mayoritariamente superficies planas relativamente lisas mientras que los nanotubos están plegados en forma de cilindros. Se puede relacionar la geometría y la relación superficie-volumen de cada una de las partículas con la disponibilidad y facilidad con la que las proteínas pueden acceder a los grupos funcionales y crear interacciones con el soporte, además de que el interior de los nanotubos es reactivo también, agrandando la superficie reactiva.

Con mención a los otros soportes y condiciones, no se consideran que los resultados sean suficientemente satisfactorios para incluirlos en esta comparativa. En el caso de las nanofibras y las nanoplaquetas, se puede afirmar que no existe inmovilización. Todos los

experimentos con resultados inferiores fueron útiles e importantes para realizar cribados e ir seleccionando en cada momento los mejores materiales y estrategias hasta lograr que en nanotubos, a concentraciones bajas de proteína y pH alcalino, se pudiera observar claramente una inmovilización completa de BSA y FBS sobre un soporte con base de carbono.

Capítulo 5. Conclusiones y Líneas Futuras

5.1 Líneas Futuras

En el futuro sería muy interesante evaluar el escalado del experimento, evaluando los resultados en volúmenes superiores, por ejemplo, en un litro. Esto nos ayudaría a evaluar de manera más parecida al medio real en el cuerpo humano, analizando a qué cantidades de nanopartículas, en particular nanotubos el porcentaje de inmovilización es del 100%, y con ello establecer una relación proporcional nanotubos-proteína en la que es seguro utilizar los nanotubos sin que haya un bloqueo. Otras líneas interesantes serían evaluar el experimento a distintas temperaturas y utilizar plasma humano.

Ya que hemos obtenido un 100% de inmovilización con los nanotubos y las diferentes fuentes de albúmina, sería interesante estudiar los usos de los nanotubos como bactericida. El objeto de este estudio sería examinar si hay inmovilización de proteínas de bacterias, bloqueándolas y haciéndolas inútiles, efectivamente neutralizando a las bacterias. Sería de particular importancia ya que cada vez lidiamos con bacterias más fuertes que desarrollan tolerancia a antibióticos comunes, por lo que se necesitan estudiar métodos alternativos. Es importante mencionar que la mayoría de los parámetros en los que hemos obtenido altas tasas de inmovilización corresponden a pHs que raramente se encuentran en la naturaleza, siendo las bacterias una excepción. También sería interesante evaluar como sería la interacción entre distintas proteínas y enzimas activas, y si su actividad incrementaría la tasa de inmovilización al ser partículas más reactivas.

Un factor importante es que en el laboratorio de nanotecnología no se disponen de los medios para poder examinar la interacción entre las nanopartículas y las proteínas, por lo que no se puede comprobar al 100% si es realmente una inmovilización o una interacción covalente. En un futuro sería interesante observar mediante un microscopio electrónico de transmisión o un microscopio electrónico de barrido la interacción que está ocurriendo realmente y poder evaluar el complejo proteína-partícula.

5.2 Conclusión

En conclusión, se ha podido determinar que la interacción entre las nanopartículas y la proteína albumina es relativamente segura. A alta concentración de proteínas, como es el caso de la sangre, es raro que las proteínas sean inmovilizadas, en muchos casos si hay una inmovilización es temporal y eventualmente se separan.

La única excepción serían los nanotubos de carbono, que en pHs altos y a concentraciones bajas de proteína en comparación con la cantidad de nanopartículas, son capaces de inmovilizar todas las proteínas disponibles y causar bloqueos. A pesar de que la sangre humana este a pH neutro y muy por debajo de un pH de 11, esta investigación abre las puertas a investigar la interacción que tendrían estas nanopartículas con proteínas de bacterias, las cuales tendrían unas condiciones más similares. Gracias a la estructura de los nanotubos y su alta reactividad en el interior, podemos determinar que son particularmente aptas para la inmovilización, y que, al ser capaces de inmovilizar proteínas inactivas y relativamente neutras, lo más probable es que se desarrollen muy bien con proteínas más reactivas.

Este experimento se ha realizado con materiales altamente disponibles, utilizando la proteína más abundante y el medio de cultivo más abundante. Al ser basadas en el carbono, las nanopartículas también son altamente disponibles y no causan daños medioambientales. En ningún momento se han utilizado temperaturas extremadamente altas o reactivos peligros, por lo que no ha sido necesario un comité de ética, esto a su vez implica que no se ha hecho un uso excesivo de energía o se ha desprendido gases tóxicos en ningún momento. Ningún experimento ha tenido subproductos, todo ha sido utilizado.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] D. Cordero, "CONCEPTOS GENERALES SOBRE LA ALBÚMINA HUMANA Y SU UTILIZACIÓN CLÍNICA" *Acta Médica Costarricense*, vol. 28, no. 1, pp. 32–38, Available: <https://www.binasss.sa.cr/revistas/amc/v28n11985/art6.pdf>
- [2] R. N. Moman, M. Varacallo, and N. Gupta, "Physiology, albumin," *Nih.gov*, Dec. 26, 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459198/>
- [3] T. P. H. Hutapea *et al.*, "Albumin: Source, preparation, determination, applications, and prospects," *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, vol. 8, no. 2, p. 100549, Jun. 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2023.100549>.
- [4] "Figura 1. Representación de la estructura terciaria de la albúmina,...," *ResearchGate*, 2024. https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Representacion-de-la-estructura-terciaria-de-la-albumina-proteina_fig1_322956580
- [5] M. Inagaki, F. Kang. "Graphene Oxide - an overview | ScienceDirect Topics," *Sciencedirect.com*, 2011. <https://www.sciencedirect.com/topics/materials-science/graphene-oxide>
- [6] I. Gago *et al.*, "Introducción al estudio de las propiedades antibacterianas del grafeno". *Revista de pensamiento Estratégico y Seguridad CISDE*, 1(2), 87-94. Nov. 2016.
- [7] M. Arces. Nanopartículas de Carbón. Presentación Académica. Asignatura de Nanotecnología Universidad Europea de Madrid.
- [8] F. Obite, G. Ijeomah, and J. S. Bassi, "Carbon nanotube field effect transistors: toward future nanoscale electronics," *International Journal of Computers and Applications*, vol. 41, no. 2, pp. 149–164, Jan. 2018, doi: <https://doi.org/10.1080/1206212x.2017.1415111>.
- [9] N. Nasajpour-Esfahani *et al.* "Carbon Nanofiber - an overview | ScienceDirect Topics," *www.sciencedirect.com*. <https://www.sciencedirect.com/topics/chemical-engineering/carbon-nanofiber>

- [10] "China factory high efficient 99.5% Graphene Nano Platelets with good price factory and suppliers | Theorem," /, 2024. <https://www.theoremchem.com/es/factory-high-efficient-99-5-graphene-nano-platelets-with-good-price-product/>
- [11] "Figura 1. Representación de las nanoplaquetas de grafeno" ResearchGate, 2024. https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-Plaquetas-de-Grafeno_fig1_313115380
- [12] D. Arroyo, "Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications," vol. 39, no. 2, 1998, Available: <https://www.ugr.es/~ars/abstract/arroyo.pdf>
- [13] "qPROTEIN (BCA) Kit para cuantificar proteínas totales PB-L Productos Bio-Lógicos PB-L Productos Bio-Lógicos." Available: <http://www.pb-l.com.ar/wp-content/uploads/2016/07/RA03-qPROTEIN.pdf>
- [14] Y. Gao and I. Kyratzis, "Covalent Immobilization of Proteins on Carbon Nanotubes Using the Cross-Linker 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide—a Critical Assessment," *Bioconjugate Chemistry*, vol. 19, no. 10, pp. 1945–1950, Oct. 2008, doi: <https://doi.org/10.1021/bc800051c>.