



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

Caracterización analítica de nano-MOFs diseñados para la liberación controlada de fármacos

MAIALEN URIBARRENA ARRESE- IGOR

Oviedo, Julio 2022

ÍNDICE

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCIÓN	2
2.1.	MATERIALES FUNCIONALES DE NUEVA GENERACIÓN EN BIOANÁLISIS	2
2.1.1.	Nanomateriales	2
2.2.	TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE NANOMOFs: FFF	9
2.2.1.	Bases teóricas del FFF.....	9
2.2.2.	F1FFF.....	11
3.	OBJETIVO	18
4.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	19
4.1.	MATERIALES Y REACTIVOS	19
4.2.	INSTRUMENTACIÓN	20
4.2.1.	Cambio de membrana	20
4.3.	CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LOS nanoMOFs BAJO ESTUDIO	22
4.3.1.	UV-Vis	22
4.3.2.	Fluorescencia.....	22
4.4.	PURIFICACIÓN POR ULTRFILTRACIÓN CON AMICONES®	22
4.5.	CARACTERIZACIÓN INTEGRAL MEDIANTE AF4 ACOPLADO A DISTINTOS DETECTORES	23
4.5.1.	Optimización del método de separación por AF4.....	23
4.5.2.	Estudios de recuperación	25
4.6.	PRUEBAS DE ESTABILIDAD.....	26
4.7.	ICP-MS/MS	26
4.8.	INCUBACIÓN DEL nanoMOF EN UN MEDIO RICO EN BSA.....	27
4.8.1.	Determinación de la relación MOF:BSA	28
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
5.1.	CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LOS nanoMOF	31
5.1.1.	Análisis espectrofotométrico y fotoluminiscente	31
5.2.	CARACTERIZACIÓN MEDIANTE AF4 ACOPLADO A DISTINTOS DETECTORES	38
5.2.1.	Optimización del método de separación	38
5.2.2.	Estudios de recuperación	42
5.3.	ESTUDIOS DE ESTABILIDAD Y CARACTERIZACIÓN ELEMENTAL.....	42
5.4.	INCUBACIÓN DE BSA CON EL MOF.....	43
6.	CONCLUSIONES	46
7.	BIBLIOGRAFÍA	47

1. RESUMEN

Cada vez existe una mayor necesidad de disponer de herramientas analíticas que permitan conseguir una adecuada caracterización de los nano materiales, debido a la gran popularidad que estos están adquiriendo dentro de multitud de campos científico-tecnológicos en los últimos años. Dentro de todos los tipos de nano materiales se encuentran los nanoMOFs, un tipo de estructuras metalorgánicas porosas con creciente interés en el mundo de la medicina, mayormente en el desarrollo de nuevos sensores químicos y en aplicaciones relacionadas con la liberación controlada de fármacos.

En esta línea de trabajo, en este trabajo de Fin de Máster se propone el empleo de una plataforma bioanalítica capaz de realizar una caracterización exhaustiva de dos tipos de nanoMOFs de cobre. Para abordar este objetivo, se ha optimizado un método de fraccionamiento (separación en flujo) de muestras conteniendo nanoMOFs en suspensión acuosa, basado en el empleo de la instrumentación AF4 acoplado a los detectores MALS, UV-Vis, fluorescencia e ICP-MS/MS como detector elemental.

En una primera etapa se realizó una caracterización off-line de las muestras conteniendo dos tipos distintos de nanoMoFs, en donde se pudo constatar que los dos nanoMOFs bajo estudio muestran unas características espectroscópicas dispares, concluyendo así la presencia de dos compuestos con comportamiento muy diferente. En una segunda etapa se llevó a cabo un estudio de las condiciones experimentales más adecuadas para conseguir un fraccionamiento eficaz, empleando un sistema de AF4. En este estudio se llevó a cabo el acoplamiento del sistema de AF4 a un detector tipo ICP-MS/MS con objeto de estudiar la extensión en la formación de una proteína corona, cuando los nanomateriales se incorporan en un medio rico en BSA. El detector elemental permite cuantificar relaciones Cu:S, especialmente útiles para determinar el número de moléculas de BSA que se unen a la superficie del nanoMOF, persiguiendo así el poder tener una idea de las diferentes estructuras y afinidades que muestran las estructuras estudiadas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. MATERIALES FUNCIONALES DE NUEVA GENERACIÓN EN BIOANÁLISIS

Gracias a los avances que se han dado en la ciencia década tras década, hoy en día son muchos los materiales que se encuentran disponibles para un uso rutinario en distintas aplicaciones y tecnologías (incluyendo en química analítica). Aun así, debido al rápido desarrollo que se está dando en los diferentes ámbitos tecnológicos y científicos, se está continuamente investigando el diseño y síntesis de nuevos materiales para poder así cubrir y mejorar las necesidades actuales. Así, continuamente se proponen nuevas rutas de síntesis de materiales híbridos preparados a escala nanométrica, dotando los materiales tradicionales de nuevas y ventajosas propiedades.

Tradicionalmente, el desarrollo de estos nuevos materiales era un proceso lento, ya que las herramientas analíticas de caracterización disponibles eran muy limitadas. Sin embargo, hoy en día, los extraordinarios avances recientes alcanzados en el desarrollo de nueva instrumentación adaptada a la caracterización de los materiales ha permitido que el proceso de desarrollo y entrada en el mercado de un nuevo material actualmente se dé con mucha más rapidez. Muchos de los avances que se están experimentando en este ámbito derivan del extraordinario desarrollo que ha experimentado la nanociencia y nanotecnología, que han permitido la aparición de nuevos nanomateriales dotados de unas características especiales que están revolucionando numerosos campos científico-tecnológicos.

2.1.1. Nanomateriales

El término nanomaterial está constituido por el prefijo “nano” proveniente del griego que significa “enano”. Existen diversas definiciones de nanomateriales, siendo una de las más aceptadas la que define un nanomaterial como un material convencional pero que posee una dimensión externa comprendida entre los 1-100 nm y que tienen por lo menos una dimensión en el rango del sub-nanometro a 10 nm¹. La definición dada por la Comisión Europea dice que para poder considerar un nanomaterial por lo menos la mitad de las partículas deben medir 100 nm o menos. Aun así, existen algunas pequeñas moléculas y algunos materiales que se crean naturalmente que no se les define como nanomateriales, aunque puedan llegar a estar en el intervalo de 1-100 nm². En la *figura 1* se muestra una imagen en la que se puede comparar el tamaño de un nanomaterial con elementos más familiares.

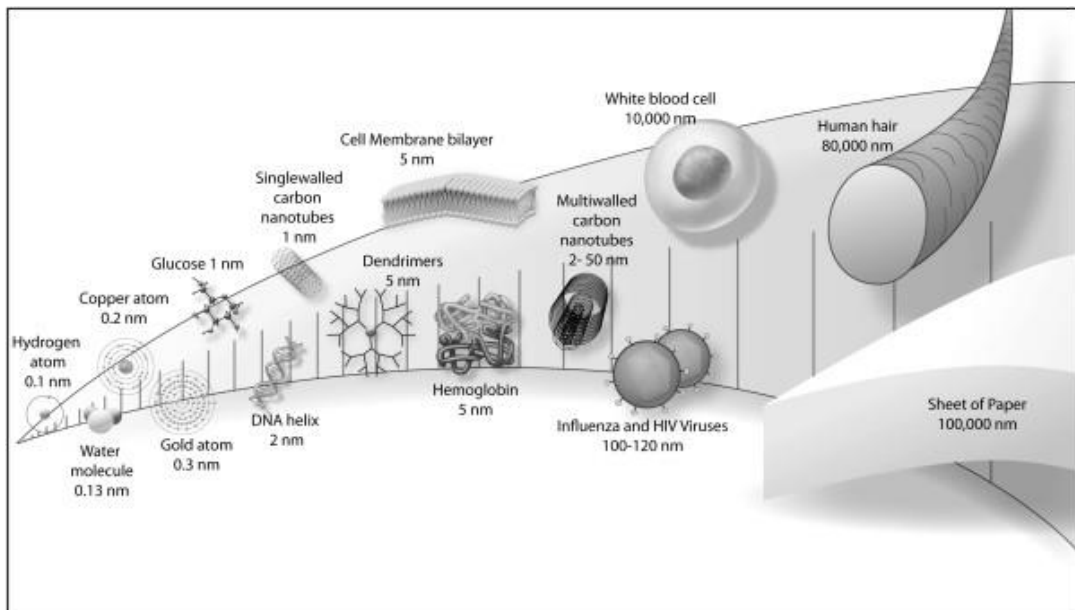


Figura 1. Comparación del tamaño de los nanomateriales a elementos más conocidos³.

Este tipo de materiales pueden crearse naturalmente o generarse tras una síntesis química, produciendo estructuras diseñadas para cumplir una función específica. Además, presentan diferentes propiedades físico- químicas comparándolo con el mismo material de mayor tamaño, como son por ejemplo las propiedades de la superficie, forma, color, estabilidad, solubilidad, etc. Aparte de caracterizarse por su pequeño tamaño también se caracterizan por su gran área superficial por unidad de masa. El área superficial depende tanto de la forma como del tamaño y cualquier cambio en una de estas dos puede afectar en las propiedades fisicoquímicas del material¹. Tanto por sus características como por la posibilidad de poder funcionalizar el material de una manera particular, dependiendo del uso que se le quiera dar, el uso de los nanomateriales se está extendiendo en muchas y diferentes áreas, desde la medicina y cosmética hasta la preservación del medio ambiental y la purificación del aire⁴.

Aun así, los mismos atributos que hacen que las nanopartículas sean de interés, son los que hacen que tengan algunas desventajas. Su pequeño tamaño puede hacer que sea más fácilmente absorbido por las células, dando lugar a problemas de citotoxicidad o daños morfológicos, y aunque su uso se esté extendiendo muy rápido, todavía hay muy poca información sobre los efectos nocivos que pueden causar estos materiales en los diferentes medios biológicos⁵. Es por ello por lo que para poder sacarle el máximo potencial a los

nanomateriales y poder descubrir tanto sus ventajas como desventajas es muy importante disponer de herramientas analíticas robustas para la correcta caracterización de estos⁶.

Existen muchos tipos de nanomateriales con diferentes tamaños, formas, naturaleza química y diferente procedencia (natural, incidental o artificial). Las dimensiones espaciales de las nanopartículas son muy variables y de una gran influencia en sus propiedades. Atendiendo a su aspecto dimensional, pueden ser clasificadas en cuatro grupos: OD (las tres dimensiones (x,y,z) <100 nm), 1D (dos dimensiones <100nm), 2D (una dimensión <100nm) y 3D (ninguna dimensión <100nm: se trata de un material compuesto formado por el agrupamiento de nanomateriales individuales). También se pueden dividir por su morfología, estado y composición química. Así se pueden encontrar las nanopartículas, quantum dots o nanonords entre muchos otros⁷. Junto a todos estos se encuentran los nanoMOFs, un nanomaterial que en los últimos años está resultando ser de gran interés en numerosas áreas⁸. Como este tipo de materiales es el que se ha empleado como “analito” en este trabajo fin de Máster, a continuación, se procederá a describir brevemente este tipo de nanoestructuras.

2.1.1.1. Nano-MOFs

Las estructuras metal orgánicas, más conocidas como MOF por sus siglas en inglés *Metal-organic frameworks*, son una clase de material híbrido poroso formados por el autoensamblaje de metales iónicos o clústeres y ligandos orgánicos creando una estructura de red periódica⁹. Estos materiales han capturado gran atención y conseguido mucho desarrollo en los últimos años tras su descubrimiento en el año 1980¹⁰. Gracias a sus características como son la gran área superficial (pueden llegar a tener hasta un área superficial de 7000m²/g)¹¹, alta porosidad y poros de gran tamaño, la diversidad estructural que puede llegar a tener gracias a su gran cantidad de cadenas orgánicas y clústeres metálicos¹², los MOFs pueden ser utilizados en diversas aplicaciones. Su funcionalidad versátil también los convierte en un material interesante, ya que, pueden ser modificados después de haber sido sintetizados dependiendo de la funcionalidad que se les quiera dar. El esqueleto tan flexible que muestran también es de gran utilidad para las diferentes aplicaciones¹². Además, también pueden llegar a ser tanto biodegradables como biocompatibles. Es por esto por lo que son muy usados en catálisis, almacenamiento de gas, en metodologías analíticas de separación, biomedicina, sensores químicos, aplicaciones energéticas y muchos otros ámbitos¹³.

El metal utilizado durante la síntesis no solo determina la estructura del MOF, sino que también su estabilidad. Los metales más comunes que se usan son el zinc, circonio, titanio, hierro o cobre. Sabiendo esto, se pueden encontrar muchos y diferentes estructuras cristalinas de MOFs¹⁴. En la *figura 2* se pueden ver algunas estructuras cristalinas que contienen diferentes MOFs.

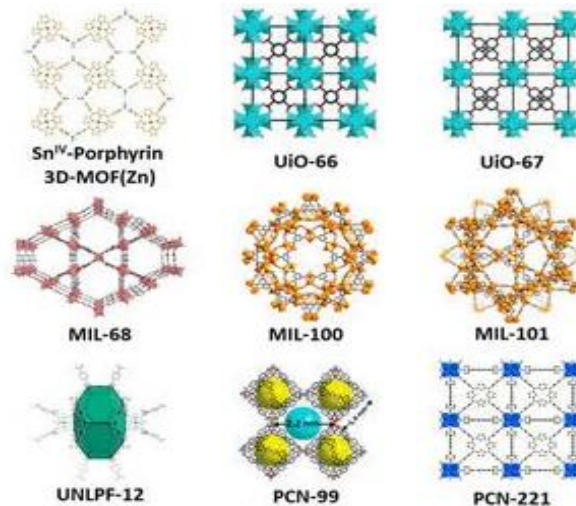


Figura 2. Diferentes estructuras cristalinas de los MOFs¹⁴.

Los MOFs son sintetizados con diferentes tamaños de ligandos que pueden variar desde unos pocos nanómetros hasta micrómetros. El tamaño de este varía dependiendo de la aplicación que se le quiera dar. Por ejemplo, para el almacenamiento de gas se usan los MOF de microescala, en cambio para el transporte de fármacos se hace uso de los nanoMOFs¹⁵. Por esta razón, últimamente se está investigando mucho la síntesis y aplicación de los MOFs a nano escala y hasta ahora, al igual que muchos otros nanomateriales, han mostrado grandes ventajas en comparación al material de mayor tamaño¹⁶. Los nanoMOFs no se pueden describir como los nanomateriales generales, ya que MOFs de tamaños de hasta 500 nm han sido descritos como MOFs de nano escala¹⁵.

Al tratarse de un material bastante nuevo, los efectos tóxicos que estos materiales pueden causar no están todavía bien estudiados. Muchos estudios han mostrado que la posible citotoxicidad de este tipo de estructuras está muy relacionada con el tamaño del material, ya que determina la absorción de este en la célula, con la forma, la naturaleza de la superficie funcionalizada o la propia estabilidad estructural del material¹⁷. Además, en los nanoMOFs la toxicidad no solo está determinada por las propiedades morfológicas de la estructura, el metal y material utilizado para la síntesis como por ejemplo el ligando, también

son parámetros importantes¹⁵. Por ello, se está constantemente trabajando en regularizar los límites de seguridad de estos materiales. Para esto es necesario el desarrollo de métodos analíticos eficaces y sensibles capaces de proporcionar la información físico-química requerida sobre este tipo de nanoestructuras¹⁸.

Los nanoMOFs están causando mucho interés en el mundo de la medicina, más precisamente en el transporte controlado de fármacos dentro del cuerpo, siendo así un gran avance para terapias de cáncer¹⁹. Su gran porosidad y superficie interna de carácter anfifílico permite la incorporación de una gran variedad de fármacos (hidrofóbicos, hidrofílicos y anfifílicos), llenando entre el 20-70 % de su capacidad con un rendimiento de hasta el 100 %²⁰. Analizar la degradación de los nanoMOFs es muy importante cuando se hace una administración intravenosa de los mismos. Por una parte, estos materiales deben presentar una gran estabilidad para ser capaces de circular por el flujo sanguíneo transportando el analito de interés, pero a su vez deben de degradarse para poder expulsar el fármaco y no acumularse dentro del cuerpo. Es por ello, por lo que a la hora de diseñar un MOF, hay que tener en cuenta la estabilidad y la biodegradación de este, el cual depende mucho de la ruta sintética y método de purificación utilizado¹³. El tamaño del MOF es también una de las características más importantes cuando se trata de aplicaciones biomédicas²¹. Una de las aplicaciones de los nanoMOFs más recientemente descritas es su uso como agentes de contraste en aplicaciones de *imagen molecular*, ya que incorporando un ion metálico paramagnético y un material luminiscente pueden ser usados en resonancias magnéticas e imágenes ópticas²². A la vista del extraordinario potencial que presenta este tipo de nanoestructuras, es claro que llevar a cabo una síntesis controlada de un MOF es un aspecto importante a la hora de usarlos en las diferentes aplicaciones.

CONTROL DE TAMAÑO

Gracias al pequeño tamaño que presentan los nanoMOFs pueden ser utilizados en muchas aplicaciones donde un MOF de mayor escala no puede ser utilizado. Es por ello, que controlar el tamaño de partícula de un MOF es esencial, mayormente para las aplicaciones biológicas. Para ello, se pueden usar aditivos como inhibidores de crecimiento en el proceso de la síntesis para posponer el proceso de crecimiento y reducir el tamaño del MOF²³. Es posible también modular el proceso de nucleación y de crecimiento, los métodos de la síntesis

y los parámetros experimentales²⁴. Además de esto, también se puede usar la ultra sonicación como un acercamiento práctico para controlar el proceso de cristalización. La irradiación de ultrasonidos es una técnica que puede incrementar el transporte de masas y acelerar la difusión molecular reduciendo de esta manera el tamaño de partícula²⁵.

CONTROL DE LA MORFOLOGÍA

La estructura y la morfología son dos aspectos muy importantes a la hora de determinar las propiedades del nanoMOF, ya que puede estar atribuido a su toxicidad y aplicaciones²⁶. También pueden influir en la interacción de las nanopartículas con los fluidos biológicos y por lo tanto su trabajo u objetivo a realizar. La morfología se puede ajustar utilizando diferentes espaciadores en la estructura del MOF²⁷, cambiando el tipo de ligando e ion metálico²⁸, controlando los parámetros de la síntesis²⁹ o utilizando varios aditivos en la reacción³⁰. La versatilidad de los nodos metálicos y ligandos orgánicos hacen también posible modificar la composición y la estructura del MOF.

Las dimensiones y geometría del MOF dependen mucho del metal que se utilice. Por ejemplo, los metales Mn y Co tienden a juntarse en una geometría tetraedral, el Ni y el Fe en cambio crean una estructura cuadrada plana. En el caso de los ligandos bidentados, como son la pirazina o bipyridina, transforman la estructura a una construcción tridimensional²⁹.

CONTROL DE LA POROSIDAD

La porosidad, a la vez que el tamaño y la morfología, tienen un gran efecto a la hora de usar los MOFs en las diferentes aplicaciones. Los poros grandes se pueden sintetizar a partir de la elongación del tamaño de los ligandos. En este sentido, hay que tener en cuenta que la naturaleza del ligando es un factor determinante de la porosidad del material. También se puede controlar la porosidad del MOF utilizando diferentes tipos de aditivos³¹.

CONTROL DE LA ESTABILIDAD Y DEGRADACIÓN

La estabilidad y degradación del nanoMOF también son parámetros importantes a la hora de trabajar con estos materiales. Estos dos parámetros dependen mucho de la calidad de los cristales sintetizados y del metal y ligando utilizados. La degradación dependerá mucho

de las condiciones del medio en el que se encuentre el material: pH, fuerza iónica, etc. Hay algunos ligandos que pueden degradarse al exponerse a la luz o subidas de temperatura³².

IMPORTANCIA DE CARACTERIZACIÓN DE UN nanoMOF

A raíz de lo anteriormente expuesto es evidente que, a la hora de sintetizar un nuevo nanoMOF, resulta indispensable asegurar una adecuada caracterización del mismo, aspecto clave a la hora de garantizar su uso de manera segura y lo más efectiva posible. En el caso concreto de los nanoMOFs, al tratarse de un nanomaterial, la distribución del tamaño, porosidad y tamaño de poro, área superficial, forma, potencial Z, agregación e impurezas son algunos de los parámetros clave que es preciso conocer con precisión.

Hoy en día está aceptado que para poder llevar a cabo una caracterización completa de este tipo de nanoestructuras es preciso recurrir a la utilización de más de un instrumento (que ofrezca información complementaria) y hacer uso de una instrumentación híbrida. Existen numerosos métodos que se pueden utilizar para la evaluación de los nanomateriales o nanoMOFs, incluyendo técnicas de espectroscopía óptica, microscopía electrónica o espectroscopía de masas, de forma directa o acopladas a técnicas cromatográficas o electroforéticas³³. Las herramientas de caracterización de nanoMOFs más habitualmente utilizadas hasta la fecha incluyen técnicas microscópicas como por ejemplo el STM (*Scanning Tunneling Microscopy*) o el AFM (*Atomic Force Microscopy*) capaces de ofrecer información sobre el tamaño, la distribución del tamaño, forma, estructura, etc. La difracción de rayos X XRD (*X-ray Diffraction*), es asimismo muy empleada para determinar la estructura para los materiales cristalinos. Aparte de todo esto también existen más técnicas como son el DLS (*Dynamic Light scattering*) empleado para la caracterización de la distribución del tamaño hidrodinámico, IR (*Infrared Spectroscopy*) para analizar las propiedades de la superficie o SEM (*Scanning electron Microscopy*) para la caracterización de la forma, tamaño o distribución de tamaño³⁴.

En cuanto a las técnicas de separación de los nanomateriales se pueden usar desde cromatografía de exclusión de tamaños o técnicas de electroforesis entre otros. Estas técnicas, que en aplicaciones concretas ofrecen una información valiosa, sin embargo, en numerosas ocasiones presentan bajas recuperaciones del analito, baja resolución o interacciones no deseadas con las nanopartículas provocando de esta manera cambios en los resultados. Es por

ello, que, para hacer una separación y análisis continuo, eficaz y exacta es preciso emplear herramientas de separación alternativas como son las técnicas de fraccionamiento de flujo de campo (FFF), entre ellas la más conocida la AF4 (Asymmetrical Flow Field - Flow Fractionation).

2.2. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE NANOMOFs: FFF

2.2.1. Bases teóricas del FFF

El fraccionamiento de flujo de campo, conocido como FFF por sus siglas en inglés *Field-Flow fractionation*, se trata de una técnica de separación muy versátil debido a la posibilidad de aplicar diferentes campos externos, estructura de canal, condiciones de operación, dependiendo del tipo de molécula que se quiera separar. Es por esto por lo que sirve para la separación de una gran variedad de materiales: polímeros, emulsiones, sedimentos geológicos, biopartículas, nanopartículas, etc. Es la única técnica analítica de separación que es capaz de separar todos los materiales de entre 1-1000 nm con una buena resolución. Aparte de esto, ofrece entre otros, su acoplamiento a detectores adecuados que permiten ofrecer información continua sobre el tamaño de la partícula en un amplio rango (de 1 nm a 100 μm). Al contrario de lo que ocurre en una técnica de separación cromatográfica, en las técnicas FFF no hay interacción física entre el analito de la muestra y una fase estacionaria, siendo por ello una técnica de separación especialmente adecuada a analitos inestables o que pueden desestabilizarse a raíz de la interacción con una fase estacionaria. Además, la posibilidad de adaptar el eluyente a la naturaleza de la nanopartícula hace que esta no sufra de importantes alteraciones durante el análisis, manteniendo su estructura nativa. Así, se puede hacer un acoplamiento online a diferentes detectores y poder conseguir una amplia información sobre la partícula con la que se está trabajando³⁵.

FFF es una metodología la cual basa sus principios en el uso de un flujo para conducir las partículas por un sistema de separación, como pasa en la cromatografía. Tanto en el fraccionamiento de flujo de campo como en la cromatografía, después de la inyección del analito en el sistema, este es conducido por un flujo mediante una cámara donde ocurre la separación o fraccionamiento. De esta manera, los analitos de interés son detectados individualmente por el detector acoplado por su orden de llegada o tiempo de elución. Aun así, aunque la base de las dos técnicas sea similar son varias las diferencias³⁶:

- En la cromatografía la cámara de flujo es una columna empaquetada donde ocurre la separación. En FFF, se trata de un canal.
- En la cromatografía, la separación se basa en la interacción del analito con la fase estacionaria de la columna y una fase móvil la cual interactúa también con el analito y rompe esa interacción haciendo que el analito eluya. En cambio, en FFF el canal no contiene ninguna fase estacionaria ni fase móvil el cual interaccione con el analito. Este contiene un eluyente cuyo fin es solo transportar las muestras por el sistema y la separación se da con la aplicación de un campo externo perpendicularmente aplicado al flujo laminar del canal. La fuerza del campo externo puede ser fácilmente controlada y se puede variar dependiendo las necesidades del análisis.

En el fraccionamiento de flujo de campo, el flujo que se crea dentro del canal es de perfil parabólico o casi parabólico. En un tipo de flujo de estas características, la velocidad a la que viajan los analitos es diferente según y cual sea su distancia a la pared. La velocidad al lado de las paredes será mínima debido a la fricción del fluido contra esta y contra más al centro se mueva la velocidad irá aumentando gradualmente. Con este tipo de flujo no se podrá encontrar gran diferencia en el tiempo de migración entre las diferentes partículas. Es por ello por lo que se debe aplicar un campo externo perpendicularmente al flujo parabólico para conseguir una separación visible³⁶. La función de este campo es focalizar las diferentes partículas en el fondo del canal y dependiendo de su coeficiente de difusión las partículas se moverán a diferentes alturas de esta. Como la velocidad del flujo laminar no es la misma en las diferentes alturas del canal, las partículas que se coloquen en diferentes puntos, llegarán en un intervalo de tiempo separado al detector³⁵. Esto se ve reflejado en la *figura 3*.

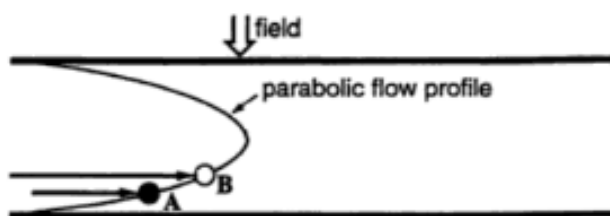


Figura 3. Diferencia en la migración de dos partículas diferentes³⁶.

El campo externo utilizado para la separación de las partículas debe cumplir tres características esenciales:

1. La fuerza del campo debe ser lo suficientemente alta para poder focalizar los diferentes componentes.
2. Debe contener una selectividad adecuada para que los diferentes componentes sean focalizados en diferentes puntos para poder así establecer la separación.
3. Deben de ser fáciles de implementar para hacer que el uso del instrumento sea sencillo, barato y práctico.

Existen diferentes tipos de campo que se pueden aplicar según cual sea el analito que se quiera analizar, es por ello por lo que la técnica FFF tiene una gran versatilidad y aplicabilidad. En la *tabla 1* se recogen las diferentes técnicas de FFF que se pueden encontrar según el campo externo aplicado³⁶.

Tabla 1. Diferentes técnicas de FFF según el campo externo que se aplica.

CAMPO	TÉCNICA
Sedimentación (Sd)	FFF de sedimentación (SdFFF) FFF de centrifugación FFF gravitacional
Térmico (Th)	FFF térmico (ThFFF)
Flujo cruzado (F1)	FFF de flujo (F1FFF)
Eléctrica (E1)	FFF eléctrico (E1FFF)
Magnética (Mg)	FFF magnético (MgFFF)
Dieléctrica (D1)	FFF dieléctrico (D1FFF)

Actualmente la técnica más utilizada para el análisis y caracterización de nanomateriales es el FFF de flujo (F1FF), donde la fuerza externa es un flujo cruzado perpendicularmente aplicado al flujo laminar³⁷. Se trata de la instrumentación más sencilla y la que más desarrollo ha tenido hasta la fecha.

2.2.2. F1FFF

La teoría de F1FF fue desarrollado por Giddings y sus colaboradores. Esta es la más universal de las técnicas de FFF. Se basa en principios hidrodinámicos donde las partículas se separan debido a un flujo cruzado de un líquido eluyente aplicado perpendicularmente al flujo del canal. Las paredes del canal son permeables permitiendo de esta manera que el flujo

cruzado traspase el canal, pero la pared por donde este flujo sale (pared de acumulación) contiene una membrana de ultrafiltración la cual retiene las partículas de interés en el canal. Las partículas eluyen a causa del flujo laminar que se aplica en el sistema. Aunque las partículas se encuentren en constante movimiento Browniano en todas las direcciones, el flujo cruzado hará que estas partículas cambien su movimiento y se focalicen cerca de la pared de acumulación. Así mismo, las partículas que contengan un mismo coeficiente de difusión serán igualmente afectados por este flujo cruzado y se colocarán a una misma altura del canal (l) después del proceso de focalización. Esta posición depende de la velocidad inducida por el flujo cruzado (U) y el coeficiente de difusión de las partículas (D)³⁸. Esto se ve reflejado en la *ecuación 1*.

$$l = \frac{D}{U} \quad [1]$$

Como anteriormente se ha mencionado, a causa de la geometría del canal, el flujo laminar es de un perfil parabólico con diferentes velocidades según la distancia que tengan hacia la pared. De esta manera la velocidad de transporte de las partículas por el canal incrementará con l y por consiguiente su tiempo de retención será menor. Con esto se concluye que la retención es una función del coeficiente de difusión y que las partículas con diferentes coeficientes de difusión serán separadas³⁸.

El coeficiente de difusión de un compuesto puede calcularse usando la ecuación de Stokes- Einstein (*ecuación 2*) sabiendo el diámetro hidrodinámico de la partícula (d_h), donde k es la constante de Boltzmann, T la temperatura y η la viscosidad del líquido portador³⁸:

$$d_h = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad [2]$$

Viendo la *ecuación 2* se puede concluir que contra mayor sea el diámetro hidrodinámico menor será el coeficiente de difusión de una partícula, por lo tanto, menor el valor de l y por consiguiente también la velocidad a la que serán transportados. Es por esto por lo que las moléculas de mayor tamaño eluyen más tarde que las más pequeñas. Este tipo de elución se conoce como *normal mode*, pero también existe un modo de elución denominado estérico donde las grandes partículas eluyen antes que las pequeñas debido a la fuerza conocida como *lift force* que se crea cuando las partículas grandes se acercan a la pared de acumulación³⁶.

F1FF ofrece una separación de alta resolución de nanopartículas. Aun así, F1FF puede estar afectado por diferentes procesos como son la agregación de partículas o interacción de las partículas con la membrana entre otros. Estos procesos deben minimizarse en la etapa de optimización para conseguir así una buena separación. En esta etapa hay que seleccionar cuidadosamente la naturaleza y composición de la fase portadora, el tipo de membrana, o el tamaño del poro de la membrana, entre otros parámetros ³⁸.

Son dos los tipos de F1FFF que se utilizan hoy en día dependiendo de la configuración del canal: el simétrico (F1FFF) y el asimétrico (AsF1FFF). La diferencia entre ambos es instrumental. En los dos casos el canal está constituido por dos bloques de Perspex separados por un espaciador el cual define la geometría y grosor del canal. En el caso del simétrico las dos fritas que contiene son permeables y en el caso del asimétrico es permeable una única frita, la de la pared de acumulación. Aparte de esto, la forma del espaciador también es diferentes, ya que la asimétrica contiene una forma especial para que el flujo sea igual al principio y al final del canal. El canal se va estrechando según se acerca a la salida para que con la bajada del flujo externo la velocidad del flujo se mantenga constante. En la *figura 3* se puede observar la configuración de un sistema F1FFF asimétrico.

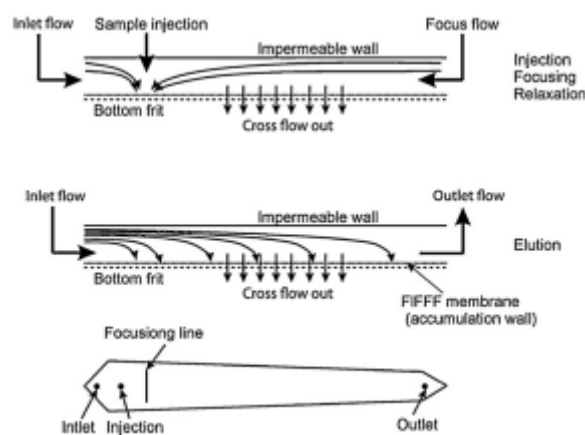


Figura 3. Esquema de trabajo de un sistema AsF1FFF ³⁸.

2.2.2.1. *Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation: AF4*

El AF4 (*Asymmetric Flow field-flow fractionation*) está basado en el principio de AsF1FF. Esta herramienta de análisis, como bien se puede apreciar en la *figura 4*, está constituida por diferentes módulos: depósito del eluyente, módulo para desgasificar los eluyentes, módulo para controlar el flujo cruzado, un módulo donde se encuentra el canal de separación (suele

ser un horno para mantener la separación a una temperatura constante) y por último el detector. Como anteriormente se ha mencionado, esta instrumentación permite la separación de nanomateriales en función de su diámetro hidrodinámico tras la interacción del analito con un flujo externo aplicado perpendicularmente. Este flujo cruzado es el que separa las diferentes partículas según su tamaño.



Figura 4. Imagen de la instrumentación AF4 utilizada en el presente trabajo.

Existen cuatro etapas que forman parte del proceso de separación con la técnica AF4. Primeramente, se encuentra la inyección, donde la muestra es introducida al canal de separación mediante una válvula de 6 vías. A continuación, tiene lugar una etapa de enfoque. Aquí las partículas de la muestra se enfocan en la cabeza del canal. Para que esto ocurra se deben aplicar dos flujos: el de enfoque y el cruzado. Así mismo, los analitos son empujados hacia la pared de acumulación, donde se encuentra la membrana semipermanente. En este mismo proceso, se eliminan las especies de menor tamaño capaces de atravesar los poros de la membrana, normalmente suelen ser elementos disueltos en la disolución que no contienen ningún valor en el análisis y que pueden llegar a ser interferentes. Por último, se encuentra la fase de elución. Aquí, el flujo cruzado se va disminuyendo gradualmente y en un modo de elución normal, los de menor diámetro hidrodinámico serán las que difundan más en el flujo laminar y sean transportados más rápidamente. Estas etapas se ven reflejadas en la *figura 5*.

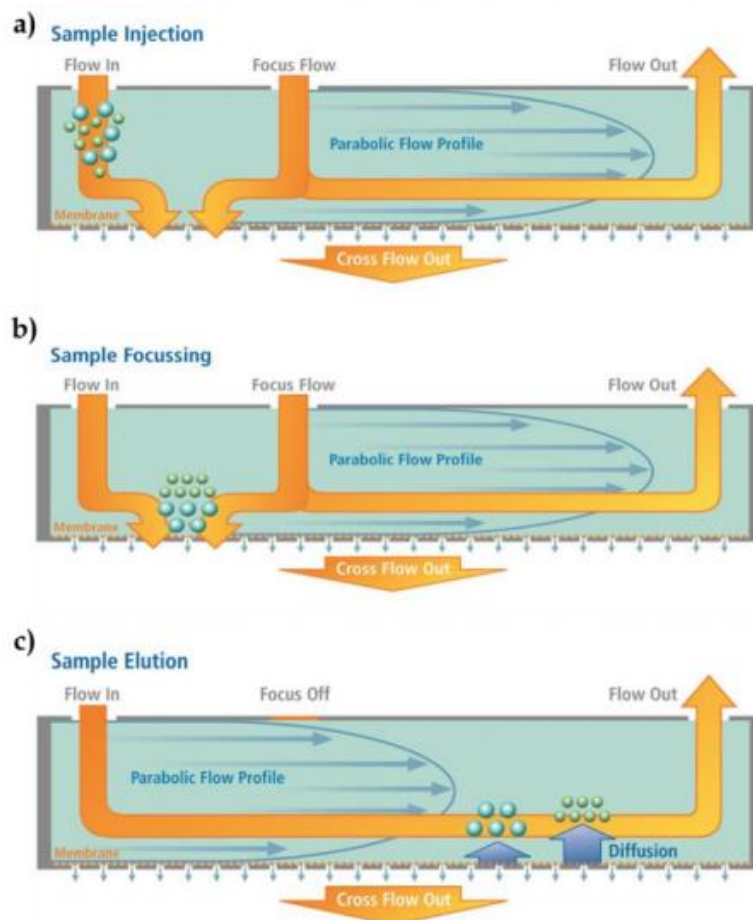


Figura 5. Esquema de las etapas del proceso de separación de las nanopartículas en la instrumentación AF4. (Obtenido del manual AF2000 Postnova Analytics).

Como bien se ha mencionado anteriormente, esta técnica mantiene inalterada la estructura de los analitos nanoparticulados. Por otro lado, de forma similar a las técnicas de separación cromatográficas, la técnica de AF4 puede acoplarse de manera sencilla y en-línea (online) a diferentes detectores, como son el UV-VIS, fluorescencia, MALS (*Multi Angle Scattering*) o ICP-MS (*Inductively Couple Plasma Mass Spectrometry*) pudiendo de esta forma obtener una información mucho más detallada de los diferentes parámetros físico-químicos del analito. En la *figura 6* se puede observar un esquema de la instrumentación híbrida que se obtiene acoplando los detectores a la instrumentación de AF4.

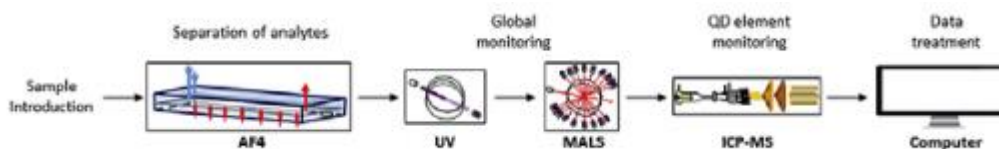


Figura 6. Esquema del sistema híbrido acoplado los detectores UV, MALS y ICP-MS a la instrumentación AF4³⁹.

Los detectores de fluorescencia y UV-VIS ofrecen información sobre las características espectroscópicas y luminiscentes del analito. Estas se pueden determinar previamente de una manera offline para tener una idea de cómo se comporta y así en modo online verificar su presencia. Con un calibrado inicial, sería posible calcular la concentración del analito de interés con los datos obtenidos con estos detectores.

MALS o detección óptica molecular de dispersión de luz, recoge la intensidad de la luz difractada por una nanopartícula en suspensión a diferentes ángulos frente a la fuente de luz (láser) incidente. Con estos datos se puede determinar la masa molar absoluta, tamaño de partícula del compuesto y también la distribución de la masa en la misma partícula³⁸. Una de las limitaciones de este instrumento es que no se consigue ningún resultado con analitos que emiten en la misma longitud de onda que el láser del mismo, no pudiendo de esta manera analizar todo tipo de material. En la *figura 7* se puede observar el esquema de un detector de este tipo.

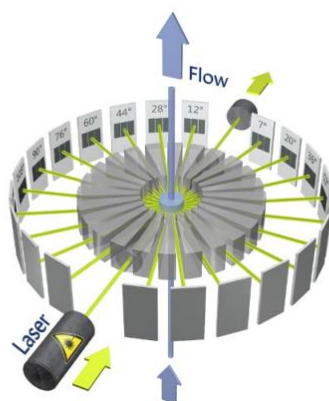


Figura 7. Esquema del funcionamiento del detector de MALS (adquirido del manual MALS PN3621 Postnova Analytics).

Usando como detector el ICP-MS (espectrómetro de masas con fuente de plasma con acoplamiento inductivo) se puede hacer una cuantificación elemental detallada del analito de interés. Se trata de una técnica muy sensible, con unos límites de detección muy bajas, de hasta el orden de ng/l capaz de proporcionar información de la composición elemental de los componentes de la muestra⁴⁰. Una de las limitaciones de este instrumento es que los elementos detectados no se saben exactamente de donde provienen (es decir, procedentes de las especies nanoparticuladas o de iones u otras especies presentes en el medio), pero trabajando en combinación con la AF4 haciendo una separación previa es posible saber su

proveniencia. Aparte de esto, puede que durante el análisis se encuentren interferencias tanto isobáricas como poliatómicas, aunque estas se pueden evitar programando el sistema para ello. En la *figura 8* se pueden ver las diferentes partes que contiene un instrumento de ICP-MS. De izquierda a derecha se pueden observar: el nebulizador, donde la muestra se convierte en aerosol; la antorcha, donde la muestra se ioniza gracias al plasma de alta temperatura; una interfase constituida por un *sampler* y un *skimmer* necesaria para que la muestra entre de un sistema de presión atmosférica a uno de alto vacío; un analizador de masas (en este caso cuadrupolo) y un detector.

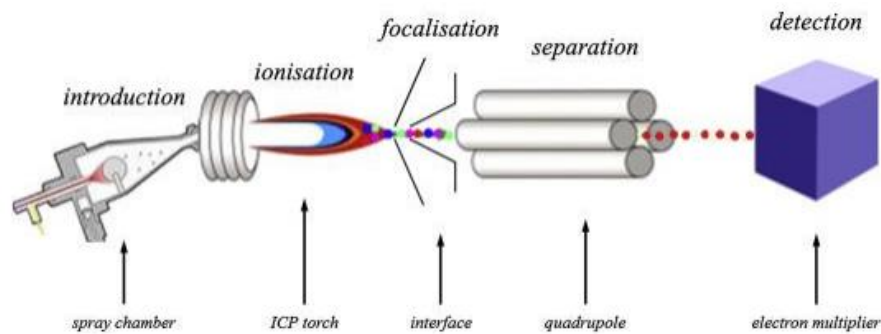


Figura 8. Esquema de un instrumento de ICP-MS con las diferentes partes que lo constituyen⁴¹.

Con toda esta combinación de instrumentos y detectores es posible hacer una caracterización detallada de los diferentes materiales que se quieran analizar cómo son por ejemplo los nanoMOFs.

3. OBJETIVO

A la vista de lo expuesto anteriormente, es evidente la necesidad de disponer de diferentes técnicas analíticas robustas para la caracterización exhaustiva de los nuevos nanomateriales, antes de ser utilizados en la aplicación para la que han sido desarrollados.

En este sentido, el objetivo principal de este trabajo es evaluar una plataforma analítica basada en el acoplamiento de un sistema de separación en flujo (AF4) con detectores moleculares (MALS, VIS-UV y fluorescencia) y elementales (ICP-MS/MS) para caracterizar analíticamente y evaluar la estabilidad y posible degradación de nano-MOFs, sintetizados por el grupo de investigación Nanobionátesis de la Universidad de Oviedo.

Para poder llevar a cabo este objetivo principal, el trabajo se ha dividido en diferentes etapas:

- Familiarización con la instrumentación de AF4, sus principios, funcionamiento y mantenimiento.
- Familiarización con el detector ICP-MS/MS: puesta en marcha, calibración y utilización. Cálculo de las relaciones estequiométricas.
- Realizar caracterizaciones espectroscópicas off-line de los nanoMOFs sintetizados por el grupo de Nanobioanálisis utilizando la espectroscopía UV-VIS y técnicas fotoluminiscentes de análisis.
- Evaluación de la plataforma analítica basada en el acoplamiento de un sistema de AF4 con detectores moleculares y elementales (ICP-MS/MS) para llevar a cabo la caracterización de los nanoMOFs sintetizados,

Desde un punto de vista académico, con la elaboración del trabajo se persiguió completar los conocimientos teóricos adquiridos durante el Máster de Ciencias Analíticas y Bioanalíticas:

- Ser capaz de elaborar una revisión bibliográfica sobre el tema específico del que se está trabajando.
- Adquirir capacidad para trabajar en un laboratorio de investigación.
- Poder desarrollar un pensamiento crítico para la interpretación de los resultados conseguidos.

4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En este apartado se recogen todos los materiales, reactivos e instrumentación requerida para llevar a cabo las diferentes caracterizaciones necesarias del *nanoMOF* de Cu con el que se ha trabajado.

4.1. MATERIALES Y REACTIVOS

Fueron varios los materiales que se utilizaron durante todo el trabajo. Para la preparación de las diferentes disoluciones de nanoMOFs se utilizaron tubos Eppendorf de 1.5 mL, tubos de fondo redondo con faldón de 14 mL, pipetas Pasteur de plástico graduadas entre 1- 3 mL, Micropipetas de diferentes volúmenes con sus puntas desechables:

- 2- 20 μ L y 20- 200 μ L de Eppendorf Research plus, Sigma- Aldrich (Suiza).
- 100- 1000 μ L de Metter Toledo.
- 0.5- 10 μ L y 1- 10 mL de LLG (Labware, España).

A continuación, se enumeran todos los reactivos que se utilizaron durante la caracterización del material de interés. Los nanoMOFs que se han utilizado, denominados en los sucesivos como “nanoMOF rojo” y “nanoMOF verde”, en función de sus colores en suspensión acuosa, fueron sintetizados en la facultad de química de la Universidad de Oviedo por el grupo de investigación Nanobionátesis. Los reactivos utilizados para ello han sido: DOBDC, Sigma- Aldrich (Alemania) y Acetato de Cobre, Sigma- Aldrich (Alemania).

Los reactivos utilizados durante todo el trabajo han sido: albúmina de suero bovino (BSA) \geq 96%, Sigma-Aldrich (Alemania); TWEEN[®]20, Sigma- Aldrich (Alemania); TWEEN [®]80, Sigma- Aldrich (Alemania); MES hydrate, Sigma- Aldrich (Alemania); Acetato de sodio, Sigma- Aldrich (Alemania); Phosphate Buffer Solution, Sigma- Aldrich (Alemania); ácido nítrico subboiling; patrones elementales de S y Cu 1000 ppm, Certipur[®]Merck (Alemania);

Todas las disoluciones acuosas se prepararon usando agua Mili-Q obtenida por el sistema de generación de agua Mili-Q Purelab Flex ELGA.

Para la puesta en marcha del ICP-MS se ha usado la disolución Tube para el calibrado del mismo: ICP: Tuning Solution for ICP-MS (matrix: 2% wt HNO₃), 1 μ g/L Ce, Co, Li, Mg, Tl, Y, Agilent Technologies (EE. UU.) y HNO₃ subboiling 2%.

4.2. INSTRUMENTACIÓN

Para el desarrollo del trabajo se utilizaron varios instrumentos. Primeramente, para poder preparar las diferentes disoluciones de nanoMOFs se han usado una balanza de precisión ME 204, Mettler Toledo (EE. UU.); baño ultrasonido, Selecta Ultrasons (Barcelona) y el Vortex Velp® Scientifica. Para la caracterización del nanoMOF se ha usado el espectrofotómetro de UV-VIS Genesys 10S UV-vis, Thermo Scientific (EE. UU.); el fluorímetro Varion Cary Eclipse y un sistema de separación AF4 AF2000 Focus, Postnova Analytics (Alemania) acoplado a un detector UV-vis 1260 Infinity MWD, Agilent (Alemania), a un detector de fluorescencia Agilent 1260 Infinity FLD (Agilent, Alemania) y a un detector MALS PN3621, Postnova Analytics (Alemania) con el software Nova FFF versión 2.1.0.5 Postnova (Alemania).

Para las medidas de luminiscencia, tanto para UV-VIS como para la fluorescencia, se utilizó una celda de cuarzo de 1.5 ml y 1 cm de paso óptico. Se usó una jeringa de inyección de ajuste manual HAMILTON SYR 1750RN con una capacidad de 50 μ L para la inyección de la muestra en el sistema AF4. El separador utilizado ha sido de 500 μ m plástico de la casa Postnova Analytics. Se usaron dos tipos de membranas durante la caracterización con AF4, ambas membranas de la casa Postnova Analytics y con unas dimensiones de 294 mm x 30 mm.

- Membrana de Celulosa Regenerada (RC): tamaño de poro de 20 kDa y 30 kDa.
- Membrana de Poliétersulfona (PES): tamaño de poro 10 kDa.

Para el proceso de purificación se utilizaron AMICONES® de 3 y 30 kDa y un volumen de 0.5 ml para estudios de purificación y una centrifugadora GYROZEN 1580R, GYROZEN (Alemania). Para el ICP, el *sampler* y *skimmer* utilizados fueron de Nikel de la casa Agilent Technologis, USA.

4.2.1. Cambio de membrana

El estado de la membrana es un factor clave a la hora de optimizar la separación de los compuestos con la instrumentación AF4. Hay que controlar que no esté degradada o saturada para que esto no influya en la representación de los resultados adquiridos. Aparte de esto, también hay que controlar que este bien colocada, puesto que un mal ajuste o colocación puede variar drásticamente los resultados. En la *figura 9* se puede observar la imagen de una canal de separación instalado en la AF4.

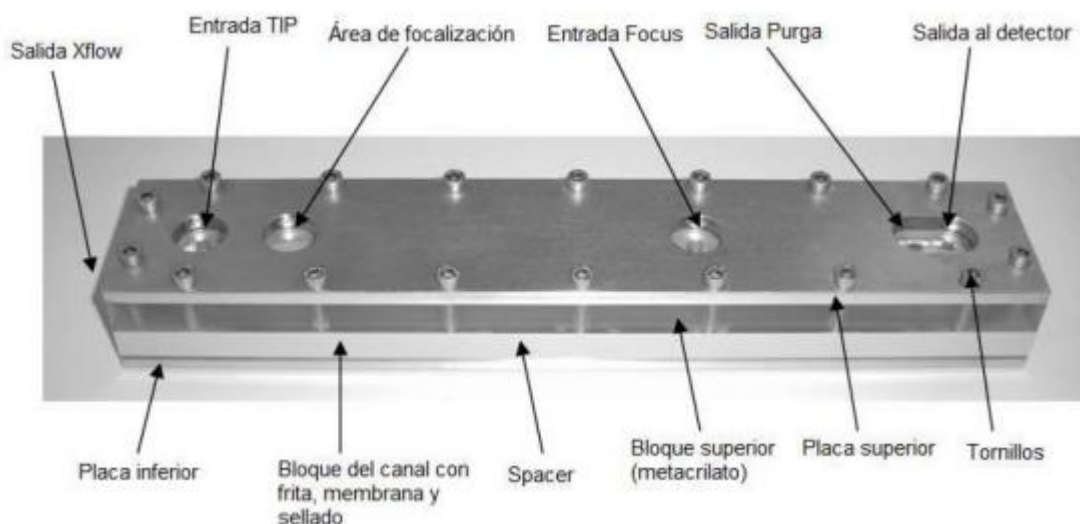


Figura 9. Canal de separación del sistema AF4 con cada una de sus partes y conexiones (extraído del manual práctico de AF4).

Durante este trabajo se reemplazaron las membranas varias veces. En ninguno de los casos se llegó a detectar un posible mal comportamiento de esta, pero el cambio se llevó a cabo para probar la separación con diferentes tipos y tamaños de poro. Para ello fueron varios los pasos que se siguieron. Primeramente, se apagaron todos los flujos para poder así desconectar todas las conexiones del canal de separación (*imagen 9*): entrada de muestra (TIP), flujo de focalización (Focus), flujo cruzado (Xflow), salida del detector y salida de la purga. Una vez habiendo desconectado todas las conexiones se retiró el soporte de la membrana del horno para proceder al desmontaje de esta (normalmente al lado de un fregadero). Se aflojaron los tornillos con una llave dinamométrica de 6 Nm y se separaron las diferentes partes de la misma, entre ellas el espaciador y la membrana. La membrana se retiró y se colocó una nueva después de limpiarla con abundante agua Mili-Q por ambas caras para quitar de esta manera cualquier impureza posible. Para la colocación de esta sobre la placa cerámica, se debe fijar la parte más brillante hacia el lado de arriba. Todo esto se llevó a cabo con unas pinzas limpiadas con anterioridad a su uso. Una vez habiendo colocado la membrana correctamente se limpió el espaciador y se colocó encima seguido por la placa de metacrilato. Después de esto se volvieron a colocar los tornillos y se apretaron con la misma llave dinamométrica.

Así mismo quedó cambiada la membrana de la AF4 dentro del soporte. Para volverla a incorporar la membrana en el horno y poder continuar trabajando es muy importante eliminar todas las posibles burbujas de aire entre el espaciador y la placa de metacrilato. Para

ello, se conecta la conexión del detector e insertando un poco de flujo para que pase el eluyente, se observa cuidadosamente si hay alguna. Una vez eliminadas, se conectan la purga y el *focus* dejando estabilizar el sistema durante un tiempo con flujo constante de eluyente. Después se realizaron las primeras medidas de blanco para poder así comprobar si el equipo estaba preparado para su utilización.

4.3. CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LOS nanoMOFs BAJO ESTUDIO

En una primera etapa se ha llevado a cabo una caracterización espectroscópica de los nanoMOFs bajo estudio.

4.3.1. UV-Vis

Para determinar la longitud de onda de absorción máxima de los nanoMOF bajo estudio se utilizó el espectrofotómetro de UV-Vis Genesys 10S Thermo Scientific. La muestra acuosa conteniendo los nanoMOF se introdujo en una cubeta de cuarzo de 1.5 ml y de 1 cm de paso óptico la cual se introdujo en el instrumento. Determinando la línea de base con el disolvente empleado para la preparación de las disoluciones, se hizo un barrido de longitudes de onda entre 190 nm y 700 nm, obteniendo de esta manera la longitud de onda máximo de absorbancia.

4.3.2. Fluorescencia

Una vez determinada la longitud de onda de absorción se procedió a determinar las de emisión y excitación con el espectrofotómetro Varion Cary Eclipse. Para ello, sabiendo la longitud de onda óptima de absorción medida con el visible ultravioleta, utilizando este mismo valor como la longitud de onda de excitación, se pudo determinar la de emisión haciendo un barrido entre las longitudes de onda 400- 700 nm. Después de conseguir la longitud de onda de emisión, fijando este valor, se optimizó la de excitación haciendo un segundo barrido entre 190- 400 nm.

4.4. PURIFICACIÓN POR ULTRAFILTRACIÓN CON AMICONES®

Se decidió purificar las disoluciones de trabajo utilizando una metodología de ultrafiltración empleando filtros de tamaño de poro controlado, con objeto de eliminar las posibles impurezas presentes en ella y poder así hacer una mejor caracterización de la

disolución. Para ello se seleccionaron filtros Amicon® de 3 y 30 kDa. Se introdujo la disolución en él y se centrifugó durante 15 minutos a 7000 rpm. Así las partículas más pequeñas pasan la membrana y quedan depositadas abajo. Los elementos que se quedan en la parte superior se vuelven a disolver en el disolvente de trabajo para poder hacer un análisis de ellos.

4.5. CARACTERIZACIÓN INTEGRAL MEDIANTE AF4 ACOPLADO A DISTINTOS DETECTORES

4.5.1. Optimización del método de separación por AF4

Para poder optimizar la separación de los nanoMOFs con el instrumento AF4 se han utilizado diferentes tipos de eluyentes, membranas y condiciones de trabajo. Las disoluciones de trabajo se prepararon en agua Mili-Q, partiendo de una concentración inicial de 0.5 mg/ml de nanoMOF tanto rojo como verde haciendo después una dilución 1:20 de los mismos en agua Mili-Q. Una de las muestras se preparó usando PBS 10 nM para la dilución 1:20. Estas muestras se fueron inyectando en el equipo en las diferentes condiciones de la *tabla 2* variando los parámetros definidos en ella.

Tabla 2. Diferentes parámetros que se han variado para la optimización de la separación con la instrumentación AF4.

MEMBRANA	ELUYENTE	XFLOW (ml/min)	F. DETECTOR (ml/min)	t de INYECCIÓN (min)
CELULOSA (10kDa)	MQ	0.3	0.5	2
		0.5	0.5	2
		1	0.5	2
	TWEEN80 (0.005 %)	0.3	0.5	2
		0.5	0.5	2
		1	0.5	2
	TWEEN20 (0.002 %)	0.5	0.5	2
	TWEEN20 (0.05 %)	0.5	0.5	2
		0.3	0.5	2
		0.6	0.5	2
		0.5	0.5	1
		2	0.5	2
	TWEEN20 (0.1 %)	0.5	0.5	3

		0.5	0.3	2
		0.5	0.7	2
	MQ	0.5	0.5	2
PES (10kDa)	TWEEN20 (0.1 %)	0.5	0.5	2
CELULOSA (30 kDa)	TWEEN20 (0.1 %)	0.5	0.5	2
	MQ	0.5	0.5	2
	MQ (muestra PBS)	0.5	0.5	2

Antes de la inyección de cada analito se inyectó primeramente un blanco del medio en donde la disolución estaba preparada. Se trabajó con un volumen de inyección de 20 μ L a una temperatura constante de 25°C y con un espaciador de 500 μ m. El flujo de TIP fue de 0.2 ml/min, con un tiempo de transición de 1 minuto y tras cada tiempo de inyección, se determinó un decaimiento del flujo cruzado de 5 minutos. Cada elución se dividió en dos etapas: una primera con un decaimiento de 5 minutos del flujo cruzado establecido a 0 ml/min y un segundo de otros 5 minutos donde el flujo cruzado se mantuvo a 0 ml/min para la elución de los posibles analitos retenidos en la membrana durante el proceso de focalización. El diagrama de la etapa de elución se puede ver en la *figura 10* donde se trabaja con un flujo cruzado de 0.5 ml/min y con un tiempo de inyección de 2 minutos.

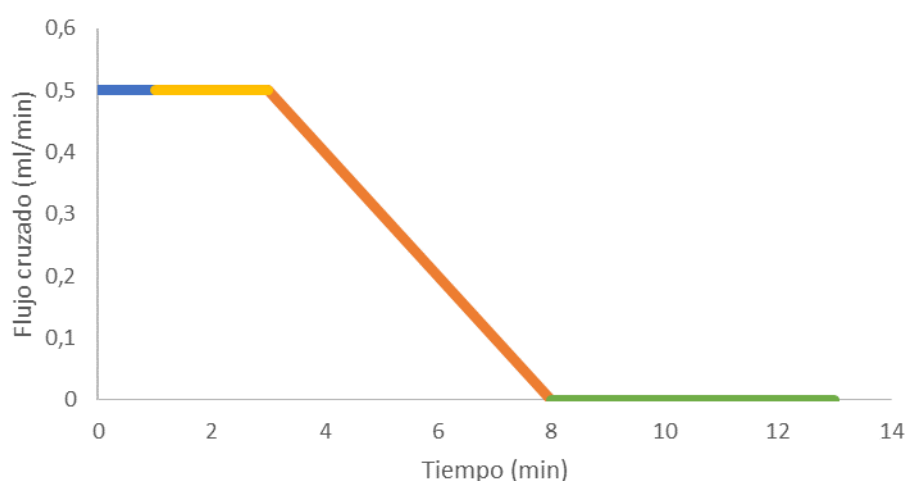


Figura 10. Esquema de las diferentes etapas durante el proceso de elución: tiempo de transición (azul), tiempo de inyección (amarillo), primera etapa (naranja) y segunda etapa (verde).

Se utilizaron los detectores UV-Vis, fluorescencia y MALS como detectores acoplados a la AF4 para la determinación de la separación. Las longitudes de onda que se usaron para la detección fueron las establecidas por la caracterización off-line: 215nm, 245 nm y 320 nm para el detector UV-Vis y 350 nm para la excitación y 520 nm para la emisión para el detector de fluorescencia.

Aparte de todo lo mencionado, también se introdujeron las muestras diluidas en las diferentes disoluciones utilizadas para el estudio de estabilidad (apartado 4.6). En esta separación se utilizó el agua como eluyente con una membrana de celulosa de 30 kDa. El flujo cruzado y el flujo del detector utilizados fueron de 0.5 ml/min y el tiempo de inyección de 2 minutos.

4.5.2. Estudios de recuperación

Para saber cuánto analito se pierde durante todo el proceso con el equipo AF4, es necesario hacer un estudio de recuperación realizando un FIA (*Flow injection Analysis*). Para ello se debe inyectar el analito de interés y realizar el análisis en las condiciones deseadas de separación, pero sin aplicar el flujo cruzado, programando un flujo cruzado de 0 ml/min. De esta manera, la ausencia de un flujo cruzado garantizaría, a priori, que no hay pérdidas de analito por adsorciones sobre la membrana o paso a través de los poros, y por ello se debe suponer que la recuperación de este es del 100 %, es decir, no hay pérdidas del analito durante su paso a través del canal de separación. Posteriormente, se realiza la separación del analito en las mismas condiciones, pero aplicando el flujo cruzado deseado. En este caso, al haber un periodo de deposición sobre la membrana puede haber una cierta pérdida de analito. Simplemente comparando el área de pico obtenido en cada una de las inyecciones se consigue estimar el porcentaje de recuperación del proceso (*ecuación 3*). Las áreas que se deben de comparar son las obtenidas con el detector de UV-VIS o ICP-MS, ya que al tratarse de un detector de concentración detecta todos los elementos que llegan a él.

$$\text{Recuperación} = \frac{\text{Área del pico con flujo cruzado}}{\text{Área del pico del FIA}} \times 100 \quad [3]$$

4.6. PRUEBAS DE ESTABILIDAD

Se analizó el comportamiento de los dos tipos de nanoMOFs bajo estudio en diferentes condiciones para así evaluar su comportamiento en las mismas. Para ello se usaron mezclas de PBS 10 nM, MES hydrate 10 nM ajustando el pH a 6, acetato de sodio 10 nM ajustando también el pH a 6, fosfato 10 nM y ácido nítrico subboiling para establecer un pH de 4. Todas estas disoluciones se utilizaron para hacer la dilución 1:20 partiendo de los nanoMOFs disueltos en agua a una concentración de 0.5 mg/ml. Las disoluciones de MES, PBS y acetato de sodio se filtraron con un quitasalto, filtro y bomba de vacío para quitar cualquier posible impureza antes de introducir las en el sistema AF4. La disolución de MES también se utilizó como eluyente en uno de los análisis.

Para realizar estas pruebas se realizaron primeramente pruebas espectroscópicas como se han descrito anteriormente. Posteriormente las muestras se introdujeron en el sistema AF4 utilizando los detectores de UV-Vis, fluorescencia, MALS y ICP-MS/MS.

4.7. ICP-MS/MS

El ICP-MS/MS se ha utilizado como detector elemental acoplado en línea al sistema AF4 durante la caracterización de los nanoMOFs. Antes de ser acoplado al sistema de separación se debe de realizar la puesta en marcha del equipo verificando que todos los parámetros necesarios se encuentren en valores adecuados para su uso. Estos parámetros son la exactitud de masa, la sensibilidad del instrumento y la resolución de masa. También se usa una disolución conocida como "Tune" el cual contienen los metales Litio, Ytrio y Talio para la calibración del equipo. Contiene Ce a su vez para la determinación de óxidos y dobles cargados. Una vez habiendo optimizado dichos parámetros es posible acoplar el equipo a la AF4.

Durante el experimento se han utilizado el gas Ar para el plasma, un flujo de oxígeno de 0.35 ml/min para la celda de reacción y un flujo de 3.5 ml/min para la celda de colisión. Este instrumento contiene un triple cuadrupolo donde el primero y el segundo trabajan como selectores de masa, mientras que el segundo trabaja como una celda de colisión o de reacción (*figura 11*).

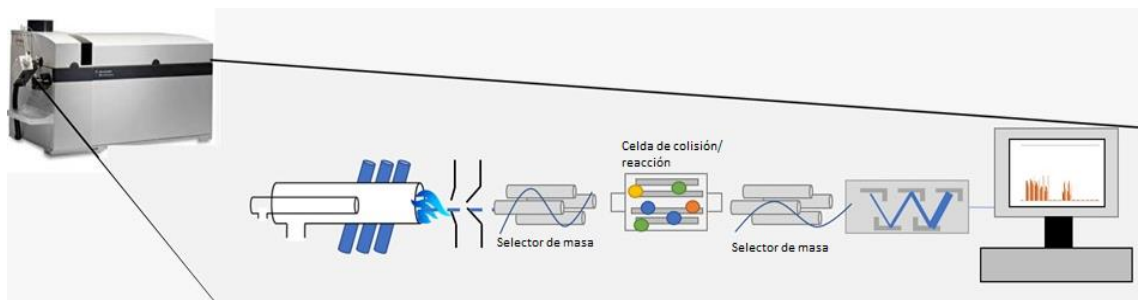


Figura 11. Partes del ICP utilizado con el triple cuadrupolo: los dos selectores de masa y la celda de colisión/ reacción.

A lo largo de este trabajo se han seleccionado el S y el Cu como los elementos que se han cuantificado con ICP-MS/MS. Dependiendo de la masa seleccionada en cada uno de los cuadrupolos se pueden distinguir dos modos de adquisición de datos: *Mass Shift* y *Mass mode*. En el modo de adquisición *Mass Shift* la masa escogida en el primer cuadrupolo corresponde a la masa del elemento de interés mientras que la masa escogida en el tercero es la masa correspondiente a un producto de una reacción ocurrida en la celda de reacción. En este caso específico colisiona con el oxígeno creando un óxido del producto para poder así eliminar cualquier interferencia poliatómica. En el caso del *Mass Mode* la masa escogida en los dos analizadores de masa es la misma que corresponde al analito de interés y en este caso el cuadrupolo del medio trabaja como celda de colisión presurizado con helio, eliminando así cualquier posible interferencia. En este experimento el azufre se ha medido en *Mass Shift* mientras que el cobre se ha medido en *Mass mode*. (tabla 3).

Tabla 3. Métodos de medida de cada elemento de interés.

MODOS DE MEDIDA	IONES MEDIDOS
Mass Shift	$^{32}\text{S}^+ \longrightarrow ^{48}\text{SO}^+$
Mass mode	$^{63}\text{Cu}^+ \longrightarrow ^{63}\text{Cu}^+$

4.8. INCUBACIÓN DEL nanoMOF EN UN MEDIO RICO EN BSA

Se han preparado varias incubaciones de nanoMOF en medios ricos en BSA a distintas concentraciones, con objeto de estudiar la formación de la proteína corona (capa proteica en la superficie del nanomaterial). El análisis de las muestras de bioconjugación con ICP-MS/MS permite cuantificar la relación molar entre S y Cu, información que permite cuantificar el número de moléculas de BSA que se conjugan al nanoMOF. Para esto, se han preparado 4 disoluciones diferentes de una relación MOF: BSA de 1:1, 1:2, 1:10 y 1:50. Las mezclas se han

tenido en constante agitación durante la noche y se inyectaron en el sistema AF4-ICP-MS/MS a la mañana siguiente.

4.8.1. Determinación de la relación MOF:BSA

Para poder llevar a cabo esta determinación se calculó la estequiometría de Cu:S realizando un fiagrama con patrones de cobre y azufre inorgánicos. Se prepararon 5 disoluciones de una relación Cu:S de 1:1, 1:2, 1:10 y 1:50 que se inyectaron directamente en el ICP mediante una válvula de 6 vías. Así mismo, se realizó un calibrado mediante ICP-MS/MS relacionando las áreas de los picos obtenidos para el Cu y S con las diferentes relaciones molares de Cu:S inyectadas. Posteriormente, se inyectó la mezcla de MOF: BSA en el sistema AF4. La señal analítica obtenida ha podido convertirse finalmente en una relación molar de MOF:BSA, teniendo en cuenta que la molécula de BSA contiene 39 átomos de azufre, el nanoMOF verde un átomo de Cu en su estructura y el nanoMOF rojo dos átomos de Cu en sus estructuras.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se han seleccionado, como analito modelo, dos nanoMOFs sintetizados por el grupo de Nanobioanálisis de la Universidad de Oviedo. Los nanoMOFs bajo estudio se identifican como nanoMOF rojo y nanoMOF verde. El objetivo principal del trabajo ha sido el intentar caracterizar los dos nanoMOFs empleando la plataforma híbrida de AF4 acoplada a detectores el MALS, UV-VIS, fluorímetro y ICP-MS/MS. Los analitos (nanoMOF) recibidos muestran un distinto color, uno es rojo y el otro es verde y su diferencia se encuentra en la síntesis, ya que el verde contiene dos veces más de ligando que el rojo. Los componentes principales de la síntesis han sido el cobre acetato ($\text{CuAc}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), el ligando DOBDC (2,5-dihydroxyterephthalic acid) y DMF como medio de reacción. La estructura del ligando se ve reflejada en la *figura 12*.

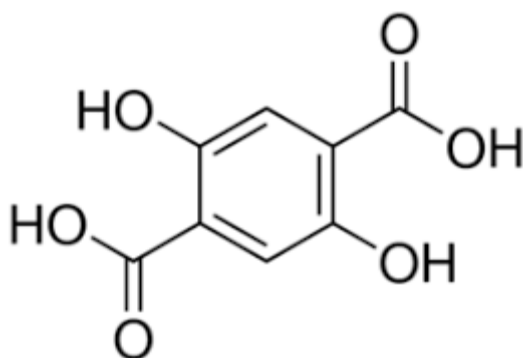


Figura 12. Estructura de ligando utilizado para la síntesis de los dos nanoMOFs.

Los nanomateriales bajo estudio han venido acompañados de un conjunto de información sobre los mismos. Gracias al análisis mediante difracción de rayos X se puede verificar que los dos materiales sintetizados presentan una estructura cristalina. En el caso de nanoMOF verde, se ha llevado a cabo la difracción de rayos X de monocristal donde se ha podido concluir la estequiometría y su estructura. Así mismo este análisis indica una estequiometría de $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{CuN}_3\text{O}_9$ la cual viene dada por una estructura cobre ligando de 1:1, dos moléculas de DMF coordinadas y una molécula de DMF libre en la estructura. Para crear la estructura laminar que muestran cada ligando se encuentra parcialmente unido a 4 átomos de cobre creando una lámina. Los diferentes planos están conectados entre sí a través de 2 átomos de cobre formando la estructura laminar que caracteriza al nanoMOF verde. Esto se puede ver reflejado en la *figura 13*.

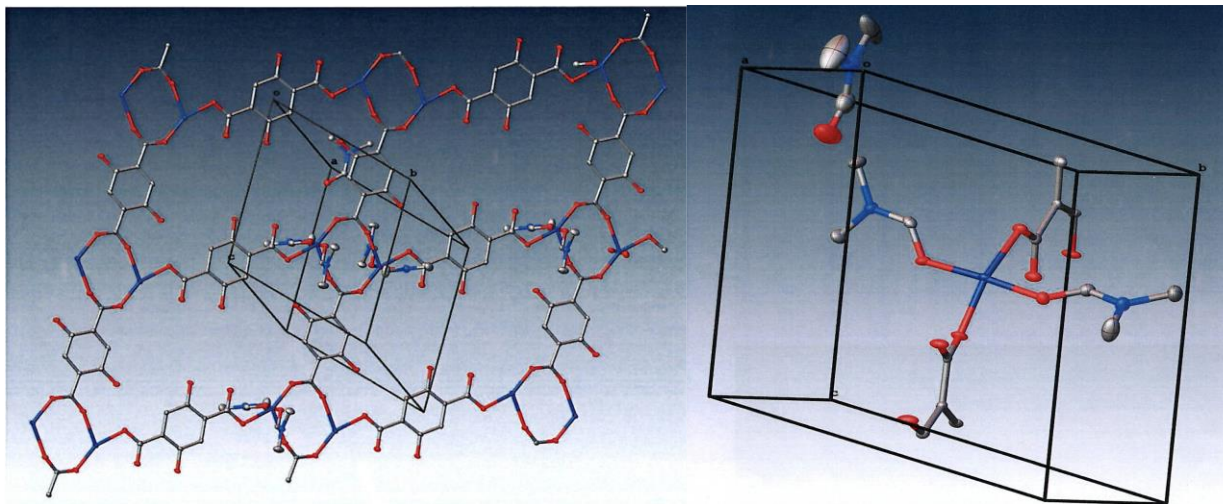


Figura 13 Estructura laminar del nanoMOF verde.

Esta misma información no ha podido ser proporcionada para el nanoMOF rojo, ya que no se ha realizado ningún estudio para su determinación. Aun así se sabe que su fórmula empírica puede ser $\text{Cu}_2(\text{C}_8\text{H}_2\text{O}_6)(\text{C}_3\text{H}_7\text{NO})_2(\text{H}_2\text{O})_2$ y que se trata de un nanoMOF de tipo MOF-74. Al tratarse de unos nanoMOFs nuevos la información que se tiene sobre ellos es escasa, es por ello por lo que se ha querido hacer una caracterización de ellos con los equipos presentes en el laboratorio.

En las imágenes de TEM que se han proporcionado se puede también observar que los nanoMOFs sintetizados presentan una estructura y dimensiones constantes de un tamaño en la escala de los nanómetros (*figura 14*).

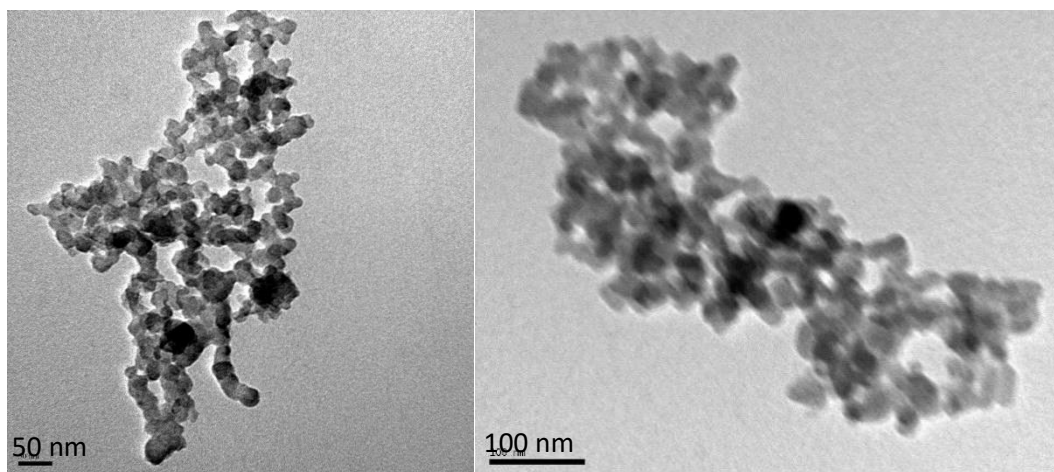


Figura 14. Imágenes de TEM de los nanoMOFs de trabajo. Izquierda nanoMOF verde y derecha nanoMOF rojo.

5.1. CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LOS nanoMOF

Previamente al análisis de los analitos empleando la instrumentación de AF4 acoplada a distintos detectores, se ha hecho un análisis espectrofotométrico de los mismos para poder identificar sus bandas de absorción VIS-UV, excitación y emisión fotoluminiscente.

5.1.1. Análisis espectrofotométrico y fotoluminiscente

En las *figuras 15 y 16* se recogen los espectros de absorbancia y fluorescencia, respectivamente, obtenidos para los dos nanoMOF de interés y para los reactivos utilizados para su síntesis (ligando DOBDC y cobre acetato). Todas las medidas se han hecho a una misma concentración de nanoestructuras, llevando una disolución inicial de 0.5 mg/ ml a una dilución de 1:20.

En primer lugar, una comparación de los perfiles de los espectros fotoluminiscentes y UV-VIS del nanoMOF verde y el ligando permite determinar claramente que el comportamiento que muestran las dos especies (nanomaterial y ligando) es muy parecido. En ambos casos, tanto en el espectro de absorbancia como en el de emisión, la intensidad de la señal proveniente del nanoMOF verde es más intensa. Una explicación posible para este efecto observado está en consonancia con un estudio que se realizó en el año 2021 por J. Y Ma et al⁴², en donde se pudo observar como la intensidad de la emisión de fluorescencia disminuía cuando a una disolución de DMF se le iba añadiendo agua. En el caso del nanoMOF

verde, este contiene en su estructura una pequeña cantidad de DMF utilizado para su síntesis en su estructura, que puede justificar que la señal de intensidad sea ligeramente mayor que cuando el ligando se encuentra en medio acuoso. Para verificar esta hipótesis se midieron los espectros de fluorescencia del nanoMOF verde en diferentes medios: solo agua, 50% agua 50% DMF y solo DMF. El resultado se puede observar en la *figura 17*, donde se ve claramente que la fluorescencia del compuesto incrementa en presencia de DMF.

Los espectros fotoluminiscentes y VIS-UV registrados evidencia que existen unas analogías totales entre el nanoMOF verde y el ligando libre, en cuanto a sus características espectroscópicas. Asumiendo que la razón de la tendencia observada era que podría haber ligandos sueltos en disolución que enmascarasen las señales de absorción/emisión del nanoMOF, se llevó a cabo una purificación de la disolución por Amicones de 3 y 30 kDa para así poder eliminar los ligandos sueltos. Pero, aun así, tanto la disolución del sobrenadante como la del nanoMOF seguían dando la misma señal de fluorescencia, por lo que la purificación no fue efectiva.

Así pues, en este caso no existe una evidencia clara del éxito en la obtención de un nuevo compuesto distinto del ligando libre.

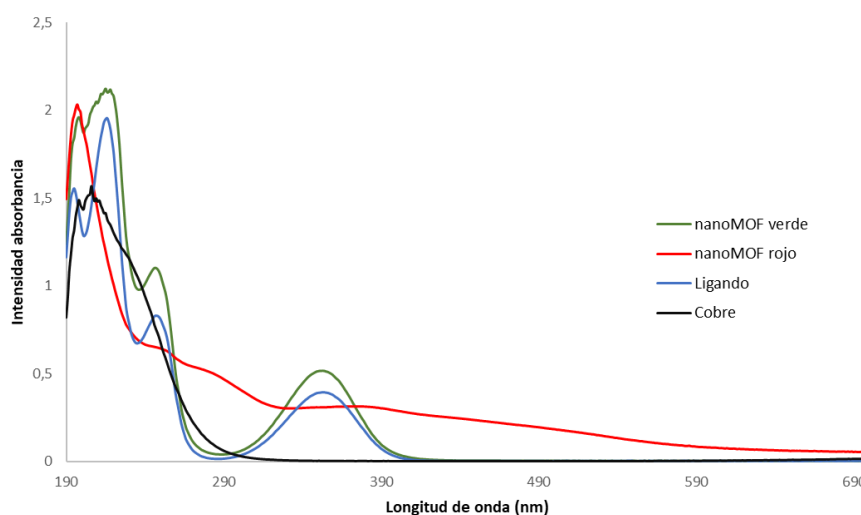


Figura 15. Espectro de absorción para los nanoMOFs verde y rojo, el ligando y acetato de cobre.

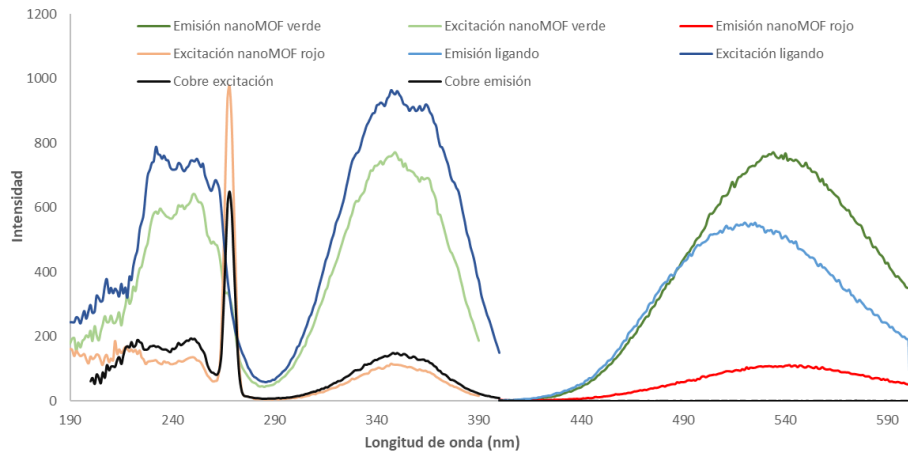


Figura 16. Espectro de emisión y excitación para los nanoMOFs verde y rojo, el ligando y el cobre acetato (longitud de onda de excitación 320 nm).

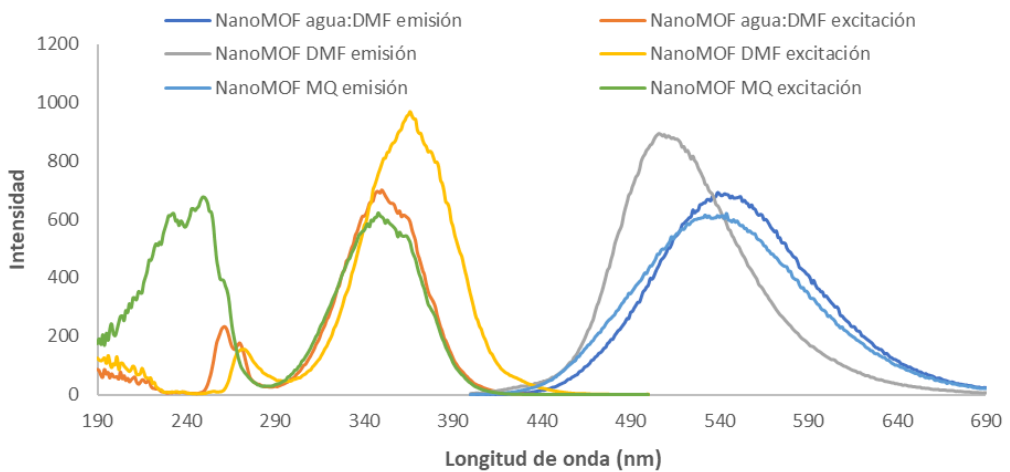


Figura 17. Espectro de fluorescencia del nanoMOF verde en las diferentes cantidades de DMF.

En el caso del compuesto rojo, la tendencia tanto de UV-Vis como el de fluorescencias es completamente distinto a lo observado en el caso del MOF verde. En este caso, las bandas de emisión como de excitación fotoluminiscente observadas al analizar la muestra que contiene el nanoMOF han disminuido considerablemente frente al ligando libre, tanto que en el caso del nanoMOF rojo es posible observar la banda de dispersión Raman, ya que aparece al valor medio de la longitud de onda de emisión que se ha utilizado. El valor utilizado ha sido de 530 nm y esta banda, simétrica y bien definida aparece alrededor de 265 nm. Con esta información, sí que se puede inferir que hay algún cambio estructural del ligando y del cobre, el cual crean una nueva estructura con un comportamiento espectroscópico diferente.

Además, la disminución de la emisión fluorescente puede ser un factor clave a la hora de verificar la posible coordinación entre el ligando y el cobre creando una estructura, hecho que está en consonancia con los resultados descrito en un trabajo llevado a cabo por Rahimi et al (2008), en donde se pudo ver como el cobre actuaba como *quencher* al crear una estructura no tan fluorescente con el material fluorescente⁴³. Aparte de esto, en otro estudio que se realizó en el 2020 se vio que en los MOFs de tipo 74 el ligando DOBDC perdía parte de su luminiscencia en el estado sólido por la unión de los grupos hidróxidos del fenol para crear la estructura del nanoMOF⁴⁴. Esto mismo que pasa en el estado sólido puede que sea la misma causa de su pérdida de fluorescencia en el líquido.

Viendo también las bandas de emisión de fluorescencia en la *figura 16*, se puede ver claramente que lo que proporciona la fluorescencia al compuesto es el ligando, ya que este contiene una banda intensa alrededor de 520 nm y el cobre no tiene señal de emisión.

En la *figura 18*, se puede observar que en una mezcla donde se juntan el cobre, acetato y el ligando los cuales han sido utilizados para la síntesis de los nanoMOFs que se están analizando, sin que se cree ninguna interacción entre ellos: las bandas de absorción de la mezcla son las características del ligando. Esto se puede ver en la misma forma, pero también al bajar la cantidad de ligandos, ya que la intensidad del espectro también baja. Así mismo se puede concluir que en presencia de los dos elementos donde no exista ninguna interacción entre los dos, mediante esta técnica solo se llega a apreciar la presencia de ligando, ya que contiene unas características espectroscópicas más intensas.

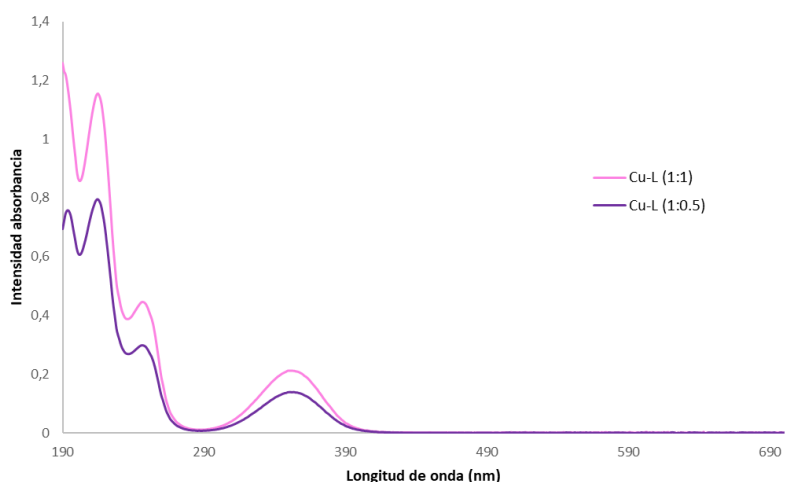


Figura 18. Espectro de absorción de las mezclas Cu-L 1:1 y 1:0.5.

Se decidió diluir los nanoMOFs de interés en tres diferentes disoluciones salinas para ver su comportamiento en presencia de diferentes sales como son el PBS, acetato de sodio y MES hidratado., El comportamiento espectroscópico de dichos analitos nanoestructurados en los diferentes medios se pueden en las *figuras 19, 20, 21 Y 22*. En este caso, de nuevo, el cambio más acusado en los espectros registrados se aprecia en el nanoMOF rojo. A simple vista, en presencia de PBS y acetato la disolución de nanoMOF rojo perdió su color volviéndose transparente, actuando igual que el nanoMOF verde, ya que las disoluciones preparadas con este mismo nanoMOF no han mostrado color en ningún momento. Además, en presencia de estas dos sales se puede apreciar que tanto el espectro de absorción y la de fluorescencia cambian su forma asemejándose al del nanoMOF verde y ligando, obteniendo una fluorescencia que anteriormente no demostraba (*figuras 19 y 20*).

A la vista de los datos obtenidos, se puede concluir que, en presencia de fosfatos (PBS) y acetatos, ocurre una sustitución con el ligando, donde estos dos elementos quedan coordinados al cobre y el ligando queda suelto, pudiendo observar así sus características espectroscópicas. Viendo la diferencia de la intensidad de la fluorescencia entre el PBS y acetato, se puede también pensar que la sustitución es más probable con el tampón de PBS ya que aparte de los fosfatos también contiene otros elementos los cuales se pueden coordinar con el cobre sustituyendo de esta manera el ligando. Se puede apreciar que el pico procedente de la dispersión Raman se encuentra desplazado, esto se debe a que la longitud

de onda de emisión utilizada ha variado entre 520 y 530 nm para poder así conseguir la excitación máxima del compuesto, haciendo que el pico de dispersión también se desplace.

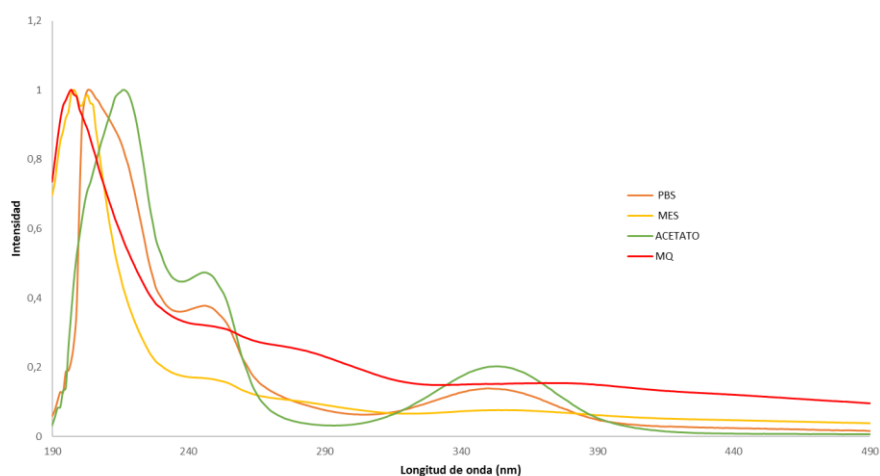


Figura 19. Espectro de absorción del nanoMOF rojo en diferentes medios.

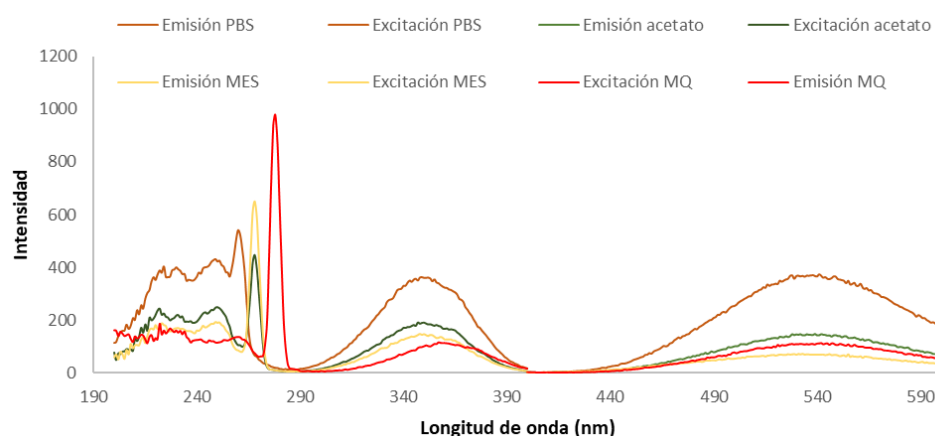


Figura 20. Espectro de emisión y excitación del nanoMOF rojo en diferentes medios (excitación a 320 nm).

En el caso del nanoMOF verde, la tendencia ha sido diferente, ya que aun en presencia de sales la forma del espectro de absorbancia ha sido la misma que en agua Mili-Q. Lo que sí se puede apreciar es una bajada de intensidad en el espectro de fluorescencia (*figura 22*). Esto puede deberse a la presencia de sales, ya que en un trabajo anteriormente realizado se pudo observar como la fluorescencia de un elemento disminuía en presencia de sales porque estas estimulaban su agregación, haciendo así que la fluorescencia fuese menor⁴⁵.

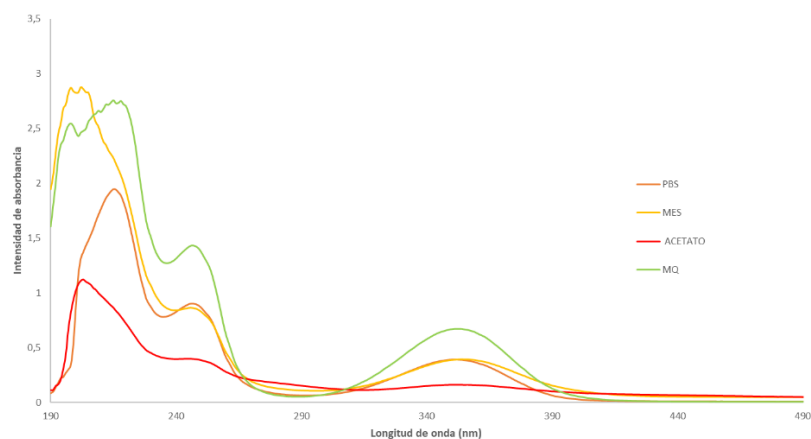


Figura 21. Espectro de absorción del nanoMOF verde en diferentes medios.

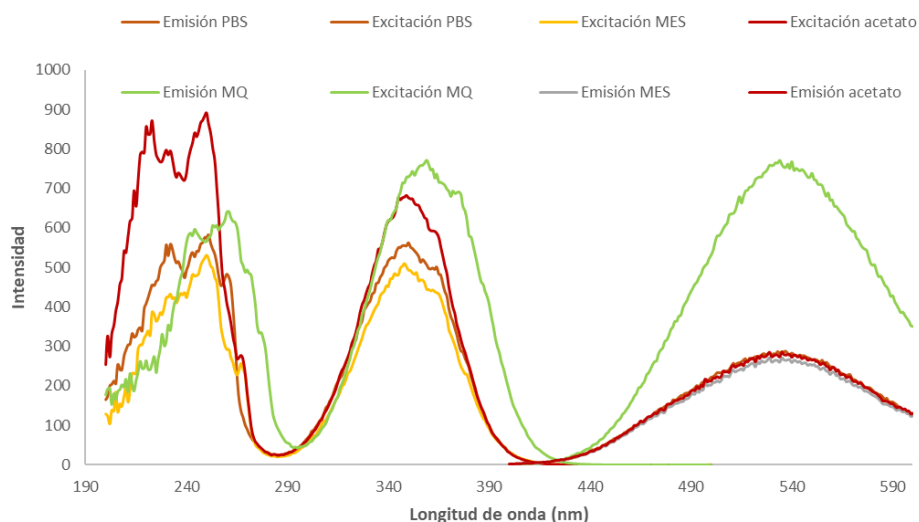


Figura 22. Espectro de emisión y excitación del nanoMOF verde en diferentes medios (excitación a 320 nm).

ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

Tras mantener los dos nanoMOFs en medio acuoso durante tres semanas se puede observar que en los dos casos tanto la intensidad del espectro de absorbancia como la de emisión y de excitación disminuye notablemente si se comparan con los valores de intensidad de las *figuras 15 y 16*. Así mismo se puede concluir que con el paso del tiempo, el ligando, quién da estas características espectroscópicas al nanoMOF se va degradando, dejándolo casi sin ninguna señal de fluorescencia. Esto se puede ver en las *figuras 23 y 24*.

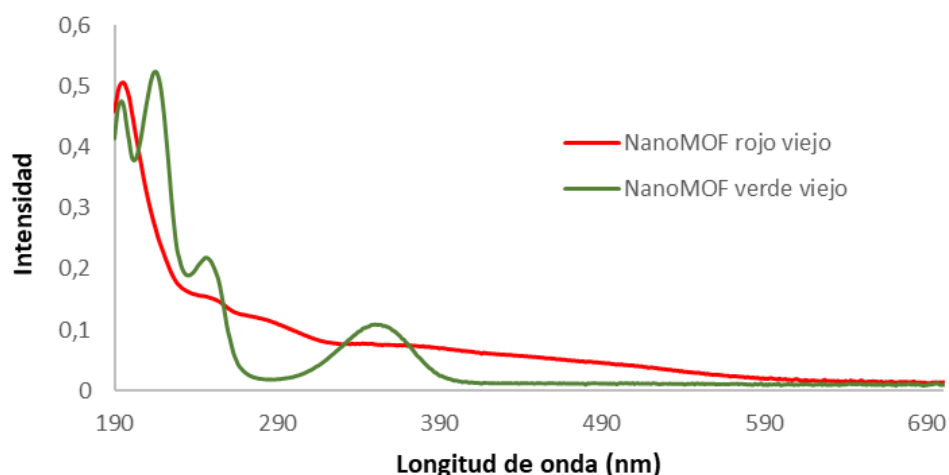


Figura 23. Espectro de absorción de los nanoMOFs rojo y verde después de tres semanas.

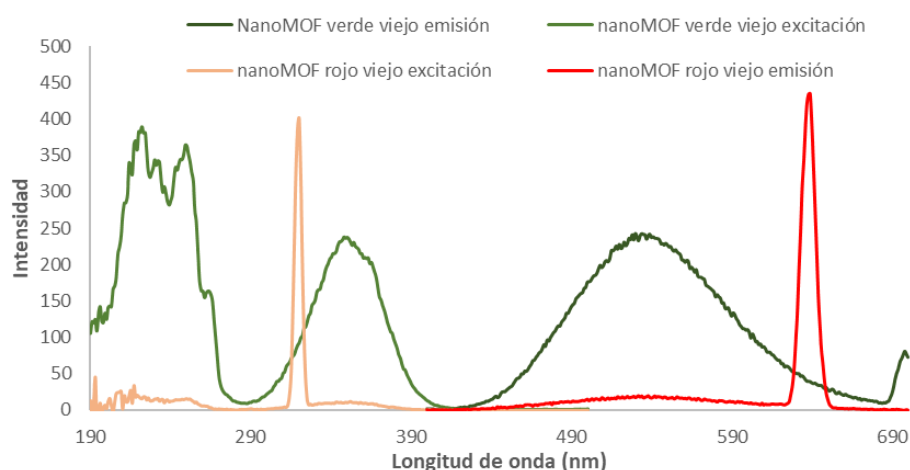


Figura 24. Espectros de excitación y emisión de los nanoMOFs rojo y verde después de tres semanas.

5.2. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE AF4 ACOPLADO A DISTINTOS DETECTORES

5.2.1. Optimización del método de separación

Como se ha mencionado en el apartado 4.5.1, para proceder a la optimización de la separación de los nanoMOFs se ha realizado, en primer lugar, una optimización de los parámetros de medida de la AF4 (*tabla 2*). Desafortunadamente, tras numerosos intentos, no ha habido posibilidad de conseguir un fraccionamiento adecuado que permita una correcta caracterización de los nanoMOF bajo estudio, ya que la banda de elución analito de interés (nanoMOFs) siempre ha salido junto al volumen muerto, justo después del tiempo de focalización, alrededor del minuto 4 (2 minutos de tiempo de inyección más otros 2 de

focalización). Esto se puede ver en la *figura 25*: en todos los casos el tiempo de elución se encuentra alrededor del minuto 4. En alguno de los intentos el pico se puede observar desplazado, pero eso se debe a que el tiempo de inyección se ha disminuido o aumentando, haciendo de la misma manera que el tiempo de elución del volumen muerto salga antes o más tarde. La intensidad de los picos también varía dependiendo del eluyente utilizado, la intensidad obtenida a un flujo cruzado de 0.5 ml/min con TWEEN 80 es mayor que la conseguida con el agua MQ. El pico azul se encuentra más desplazado hacia la derecha debido a que el tiempo de inyección utilizado fueron 3 minutos en vez de 2.

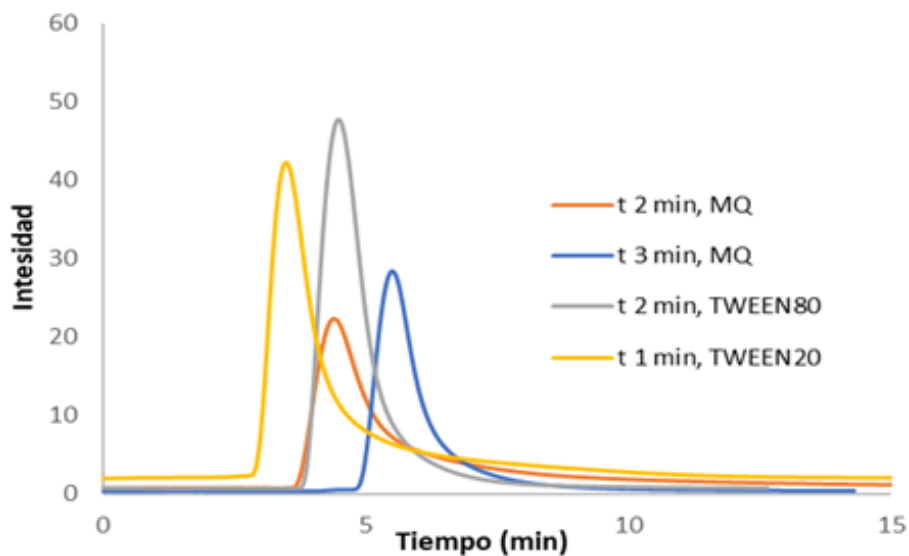


Figura 25. Fractograma para los diferentes métodos que se han probado: diferentes eluyentes y tiempo de inyección .

Se han ensayado diferentes flujos cruzados, ya que su fuerza está directamente relacionada con la eficiencia de la separación. Así, se ha probado con flujos de entre 0.3 y 2 ml/min, pero no se ha visto ningún cambio significativo en el tiempo de elución, aunque si una disminución en los porcentajes de recuperación de analito, ya que a flujos cruzados muy elevado algunos analitos, normalmente los de peso molecular alto, han podido ser absorbidos por la membrana. Con el incremento del flujo cruzado se esperaba que el tiempo de elución también incrementase y conseguir un mejor fraccionamiento, pero no ha sido así. Subiendo el flujo cruzado también se consigue que el volumen muerto disminuya ya que se minimiza la pre- elución de las partículas menos retenidas⁴⁶. Se decidió seguir trabajando con un flujo cruzado de 0.5 ml/min ya que este valor se consideró suficiente como para poder ver un cambio en caso de haber fraccionamiento y el recuperamiento era bastante aceptable. En la

figura 26 también se puede apreciar como baja la intensidad de la señal de fluorescencia cuando sube la del flujo cruzado.

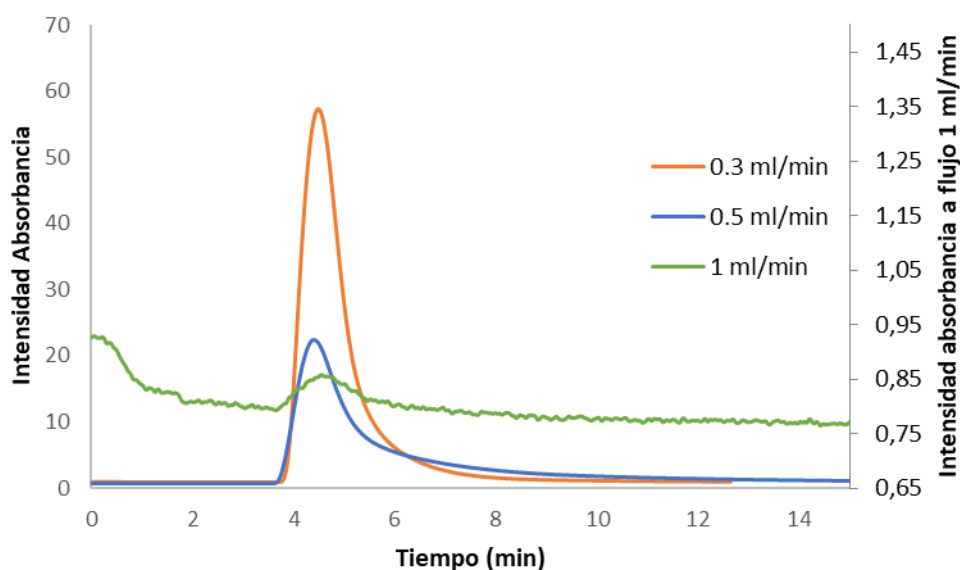


Figura 26. Intensidad de absorción del pico obtenido para diferentes flujos.

Teniendo la información de que el comportamiento de los nanoMOF puede estar afectado por cambios en el pH, se decidió estudiar su comportamiento en un medio ácido, pensando que tanto la membrana y el analito se encontrarían parcialmente protonados y habría una repulsión electrostática entre ellos, haciendo que este salga antes. Desafortunadamente, no se observó ningún cambio en el perfil del fractograma obtenido. También se trabajó con medios salinos (PBS, acetato de sodio y MES hidratado) y no se consiguió ningún cambio aparente.

En la optimización de las condiciones experimentales del AF4 se evaluaron membranas de distinta naturaleza. Las membranas utilizadas son inertes, procurando una mínima interacción con el analito, se colocan para poder filtrar los elementos de no interés analítico y para que mediante el flujo cruzado los analitos queden depositados en ella. En este estudio se comparó el comportamiento en la separación (fractograma obtenido) utilizando una membrana de celulosa regenerada y una membrana de PES (polietersulfona), que al estar cargada más negativamente ejercería en principio una menor interacción con respecto al analito por la repulsión entre cargas. Sin embargo, no se observó ninguna mejora en la separación dependiente de la naturaleza de la membrana utilizada. También se evaluó el empleo de membranas con distintos tamaños de poro, sin éxito en mejorar la separación.

En el caso del eluyente, se ensayó el uso de medios acuosos y de medios acuosos conteniendo diferentes tipos y porcentajes de tensoactivos “Tween”, pensando que estos podrían crear micelas alrededor del compuesto siendo de esa manera más retenidos. Aun así, el tiempo de retención de los analitos fue el mismo que el conseguido empleando únicamente agua Mili-Q como disolución portadora.

El espaciador es un componente del canal de separación que se encarga de delimitar el volumen de difusión de las partículas. En todos los ensayos realizados se ha seleccionado el espaciador más grande, el de 500 μm , ya que de esta manera existe más volumen donde las partículas puedan difundir y por consiguiente caer a tiempos más largos. Si con un separador de este tamaño no se retienen tampoco lo harán con uno menor, como por ejemplo con el de 350 μm . Utilizando un espaciador más grande se puede conseguir mejor recuperación, ya que se pueden emplear menores flujos cruzados para conseguir el mismo resultado que con un espaciador de 350 μm ⁴⁶.

Así mismo, con todos los intentos que se han llevado a cabo, no se ha notado ningún cambio en el tiempo de retención de los analitos. Todos los resultados que se han conseguido han sido proporcionados por los detectores de UV-VIS y fluorescencia, en ningún momento se ha podido conseguir ninguna información del MALS. Este equipo contiene un láser que emite luz a 520 nm, en la misma banda de emisión del analito con el que se ha trabajado, es por ello por lo que no se mide nada en este valor ya que el instrumento no sabría diferenciar entre la luz reflejada y la del láser.

Aparte de todo esto, se decidió inyectar el ligando utilizado para la síntesis de los nanoMOFs en el sistema, con una membrana de celulosa de 30 kDa. El ligando, por su pequeño tamaño se esperaba que se filtrase por la membrana y que no diese señal, pero aun así se pudo ver una señal en el mismo punto que el resto. Esto dio que pensar que probablemente el ligando no se encuentre bien disuelto en el agua y cree alguna metaestructura el cual por su tamaño no pueda ser filtrado por la membrana ni quede retenido, dando señal justo después del tiempo de elución. Viendo esto, se puede llegar a pensar que los nanoMOFs también se pueden juntar en disolución creando estructuras más grandes las cuales no son retenidas. Aun así, no se puede hacer un análisis controlado de esto, ya que debido a la longitud de onda de emisión del analito no se pueden utilizar ni el DLS ni el MALS.

5.2.2. Estudios de recuperación

El objetivo principal del estudio ha sido optimizar una separación con el instrumento AF4, es por ello por lo que la recuperación de cada uno de los métodos ha quedado en un segundo plano. Aun así, se han realizado varios FIAs para poder así comparar la recuperación conseguida con cada uno de los métodos. Integrando los picos conseguidos con el detector de UV-VIS, la recuperación conseguida para los métodos empleado un flujo cruzado de 1 ml/min y 0.5 ml/min, han sido de 0.09 % y de 80.35 % respectivamente (*tabla 4* Es por ello por lo que se decidió trabajar con un flujo cruzado de 0.5 ml/min. El flujo cruzado de 0.3 ml/min que se probó ofreció una mejor recuperación, pero la fuerza ejercida por este flujo se consideró insuficiente para poder llevar a cabo una separación.

Tabla 4. Valores de integración de los picos de FIA, del método y la recuperación obtenida en cada uno de los flujos cruzados empleados.

	Flujo cruzado 0.5 ml/min	Flujo cruzado 1 ml/min
FIA 1	4369.4	5030.5
FIA 2	4766.3	4777.3
NANOMOF	3670	4.2
RECUPERACIÓN	80.35 %	0.09 %

5.3. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD Y CARACTERIZACIÓN ELEMENTAL

Para los estudios de estabilidad y elementales se ha acoplado el ICP-MS/MS al AF4 como detector elemental. Al no haber ningún fraccionamiento ni retención en el sistema de la AF4 se ha visto el pico proveniente del cobre al principio de cada análisis, en el mismo punto en el que se ha detectado el nanoMOF en los detectores de la AF4. Con este tipo de detector se han podido diferenciar diferentes tipos de poblaciones en un mismo pico proveniente de diferentes elementos, como por ejemplo el cobre y el fósforo en la mezcla con PBS. Aun así, no se ha podido observar ningún dato más relevante, de manera que no es posible deducir si la cantidad de cobre que ha sido detectada proviene del nanoMOF o de alguna impureza presente en la mezcla. Las diferentes posiciones del pico que se pueden observar en la *figura 27* se pueden deber a que los datos no se empezaron a adquirir justo en el mismo momento. Se puede observar que la intensidad de los picos tampoco varía mucho de un elemento a otro ni de una disolución a otra.

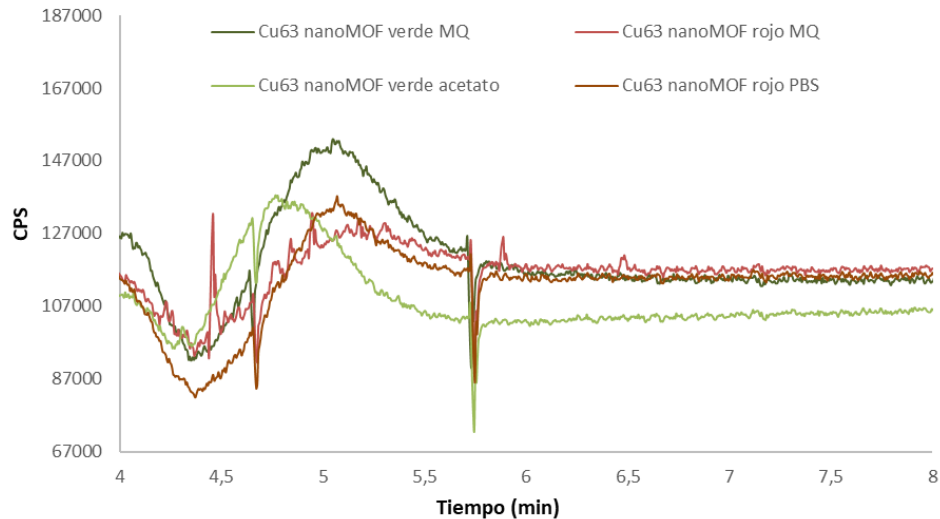


Figura 27. Perfil elemental del cobre para el nanoMOF verde y rojo en diferentes medios.

5.4. INCUBACIÓN DE BSA CON EL MOF

Mediante la incubación de los nanoMOFs en medios con diferentes cantidades de BSA se ha intentado estudiar la formación de la proteína corona en la superficie de cada uno de los nanoMOFs. Con el fiagrama realizado gracias al CP-MS/MS se ha obtenido una recta de calibrado la cual ha relaciona las áreas de S/Cu inorgánicos con la relación molar de los mismos (estos son conocidos). El fiagrama se ha realizado con estos dos elementos, ya que, el nanoMOF contiene cobre y el BSA azufre. así mismo, sabiendo la cantidad de Cu que contiene cada nanoMOF y la de cantidad de azufre que contiene cada BSA, midiendo las diferentes mezclas realizadas en el ICP-MS/MS y gracias a la recta de calibrado se han podido determinar la relación molar de BSA-nanoMOF. En la *figura 28* se pueden ver los picos conseguidos para los pinchazos de las diferentes relaciones de Cu y S inorgánicos. Con el área de estos picos y sabiendo la cantidad de moles de cada una de las mezclas se ha podido llevar a cabo un calibrado (*figura 29*). La fiabilidad de este calibrado es bastante alta ya que contienen una R^2 de 0.9971. Este calibrado se ha realizado inyectando directamente la muestra al ICP-MS/MS conectando una válvula de 6 vías entre la AF4 y el ICP-MS. En la *figura 28*, se puede observar como las cuentas por segundo del azufre van aumentando según sube su cantidad en la mezcla.

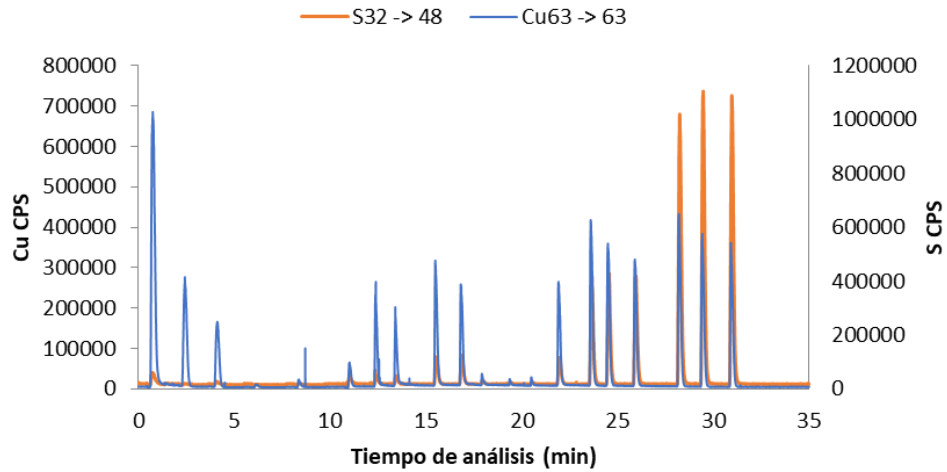


Figura 28. Cuentas por Segundo del cobre y azufre inorgánico inyectado.

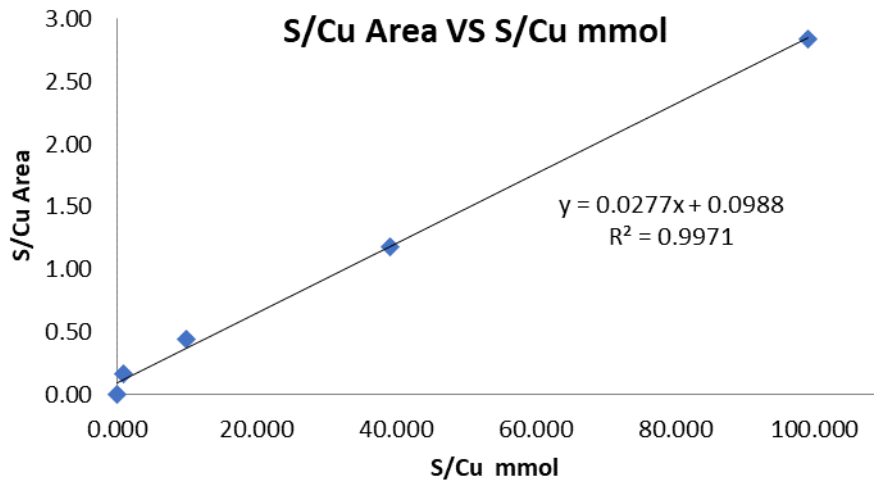


Figura 29. Recta de calibrado del fiagrama S/Cu área vs S/Cu mmol.

Se inyectaron las mezclas de BSA: nanoMOF en el AF4 acoplado al ICP-MS a una relación molar de 1:1, 1:2, 1:10 y 1:50 tanto para el rojo como para el verde. Calculando la relación de las áreas conseguidas y sustituyendo dicho valor en la recta de calibrado se pudieron conseguir las diferentes relaciones BSA:nanoMOF expuestas en las *tablas 5 y 6*.

Tabla 5. Relación molar BSA/ nanoMOF rojo.

RELACIÓN MOLAR DE INCUBACIÓN	RELACIÓN BSA/ NANOMOF ROJO
1:1	3.23

1:2	5.19
1:10	15.44
1:50	15.17

Tabla 6. Relación molar BSA/nanoMOF verde.

RELACIÓN MOLAR DE INCUBACIÓN	RELACIÓN BSA/ NANOMOF VERDE
1:1	5.08
1:2	4.67
1:10	5.58
1:50	11.32

Como se puede observar los dos elementos ofrecen una relación diferente hacia la BSA, por lo que con esto se puede concluir que contienen un área y posiblemente estructura diferente.

En el caso del nanoMOF rojo, según se añade más BSA la relación va subiendo hasta llegar a una saturación, donde, aunque se añada más BSA la relación sigue siendo la misma, alrededor de 15 moléculas de BSA por una de nanoMOF. En el caso del verde, parece que no sigue ningún patrón, ya que con las relaciones 1:1, 1:2 y 1:10 llega a una especie de saturación, pero al añadir una cantidad muy elevada parece que más átomos de BSA son capaces de rodear el nanoMOF. Así pues, con estos datos y sabiendo que el nanoMOF verde contiene una estructura laminar, se puede concluir que el rojo contiene una estructura diferente el cual contiene una mayor área superficial donde cabe la posibilidad de interactuar con más moléculas de BSA.

6. CONCLUSIONES

A lo largo del trabajo realizado, se ha llevado a cabo la evaluación de una plataforma analítica basada en el acoplamiento de un sistema de separación en flujo (AF4) con detectores moleculares (MALS, VIS-UV y fluorescencia) y elementales (ICP-MS/MS) para caracterizar analíticamente y evaluar la estabilidad y posible degradación de dos nano-MOFs, sintetizados por el grupo de investigación Nanobionátesis de la Universidad de Oviedo. Las principales conclusiones que se han podido adquirir de este Trabajo de Fin de Máster han sido las siguientes:

- Se ha realizado una caracterización espectroscópica exhaustiva de los nanoMOF bajo estudio utilizando la espectroscopía UV-VIS y técnicas fotoluminiscentes de análisis. Los resultados obtenidos demuestran la superioridad, en términos de estabilidad, de los nanoMOF rojos frente a los verdes.
- Con los diferentes métodos y condiciones empleados no se ha podido llevar a cabo el fraccionamiento en flujo eficaz y conseguir la información deseada mediante la instrumentación de AF4 acoplado de los diferentes detectores.
- El empleo del ICP-MS/MS para llevar a cabo el análisis de los nanoMOFs expuestos a medios ricos en proteínas ha permitido estimar el número de moléculas de BSA que se han unido a una nanoestructura MOF.

El desarrollo de este trabajo ha dado también la oportunidad de adquirir diversas competencias académicas relacionadas con el ámbito de investigación como por ejemplo manejo de bibliografía, interpretación de resultados o la familiarización con la instrumentación analítica avanzada entre otros. Además, ha sido estrictamente necesario aprender las reglas de seguridad en el laboratorio y tener la capacidad de trabajar con el resto de compañeros.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Lin PC, Lin S, Wang PC, Sridhar R. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology Advances*. 2014;32(4):711-726.
2. Warheit DB, Webb TR, Sayes CM, Colvin VL, Reed KL. Pulmonary Instillation Studies with Nanoscale TiO₂ Rods and Dots in Rats: Toxicity Is not Dependent upon Particle Size and Surface Area. *Toxicological Sciences*. 2006;91(1):227-236.
3. Yokel RA, MacPhail RC. Engineered nanomaterials: exposures, hazards, and risk prevention. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*. 2011;6(1):7.
4. Kahan DM, Braman D, Slovic P, Gastil J, Cohen G. Cultural cognition of the risks and benefits of nanotechnology. *Nature Nanotechnology*. 2009;4(2)
5. Boverhof DR, David RM. Nanomaterial characterization: considerations and needs for hazard assessment and safety evaluation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010;396(3):953-961.
6. Picas L, Milhiet PE, Hernández-Borrell J. Atomic force microscopy: A versatile tool to probe the physical and chemical properties of supported membranes at the nanoscale. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2012;165(8):845-860.
7. Saleh TA. Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities. *Environmental Technology & Innovation*. 2020;20:101067.
8. Kuppler RJ, Timmons DJ, Fang QR, et al. Potential applications of metal-organic frameworks. *Coordination Chemistry Reviews*. 2009;253(23-24):3042-3066.
9. Li D, Zhang S, Feng X, Yang H, Nie F, Zhang W. A novel peroxidase mimetic Co-MOF enhanced luminol chemiluminescence and its application in glucose sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2019;296:126631.
10. Hoskins BF, Robson R. Infinite polymeric frameworks consisting of three dimensionally linked rod-like segments. *J Am Chem Soc*. 1989;111(15):5962-5964.
11. Deria P, Mondloch JE, Karagiari O, Bury W, Hupp JT, Farha OK. Beyond post-synthesis modification: evolution of metal-organic frameworks via building block replacement. *Chem Soc Rev*. 2014;43(16):5896-5912.
12. Yang J, Wang H, Liu J, et al. Recent advances in nanosized metal organic frameworks for drug delivery and tumor therapy. *RSC Advances*. 2021;11(6):3241-3263.
13. Christodoulou I, Bourguignon T, Li X, et al. Degradation Mechanism of Porous Metal-Organic Frameworks by In Situ Atomic Force Microscopy. *Nanomaterials*. 2021;11(3):722.
14. López-Magano A, Jiménez-Almarza A, Alemán J, Mas-Ballesté R. Metal-Organic Frameworks (MOFs) and Covalent Organic Frameworks (COFs) Applied to Photocatalytic Organic Transformations. *Catalysts*. 2020;10(7):720.
15. Sajid M. Toxicity of nanoscale metal organic frameworks: a perspective. *Environmental Science and Pollution Research*. 2016;23(15):14805-14807.
16. Cai X, Xie Z, Li D, Kassymova M, Zang SQ, Jiang HL. Nano-sized metal-organic frameworks: Synthesis and applications. *Coordination Chemistry Reviews*. 2020; 417.

17. Sajid M, Ilyas M, Basheer C, et al. Impact of nanoparticles on human and environment: review of toxicity factors, exposures, control strategies, and future prospects. *Environmental Science and Pollution Research*. 2015;22(6):4122-4143.
18. Rodrigues SM, Trindade T, Duarte AC, Pereira E, Koopmans GF, Römken PFAM. A framework to measure the availability of engineered nanoparticles in soils: Trends in soil tests and analytical tools. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016;75:129-140.
19. Yang J, Yang Y. Metal–Organic Frameworks for Biomedical Applications. *Small*. 2020;16(10):1906846.
20. Quijia CR, Lima C, Silva C, Alves RC, Frem R, Chorilli M. Application of MIL-100(Fe) in drug delivery and biomedicine. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2021; 61:102217.
21. Li S, Tan L, Meng X. Nanoscale Metal-Organic Frameworks: Synthesis, Biocompatibility, Imaging Applications, and Thermal and Dynamic Therapy of Tumors. *Advanced Functional Materials*. 2020;30(13):1908924.
22. Cai W, Wang J, Liu H, et al. Gold nanorods metal-organic framework core-shell nanostructure as contrast agent for photoacoustic imaging and its biocompatibility. *Journal of Alloys and Compounds*. 2018; 748:193-198.
23. Paula M, Barros A, Wanderley K, et al. Metal Organic Frameworks for Selective Degradation of Amoxicillin in Biomedical Wastes. *J Braz Chem Soc*. Published online 2018.
24. Li X, Wang J, Liu X, et al. Direct Imaging of Tunable Crystal Surface Structures of MOF MIL-101 Using High-Resolution Electron Microscopy. *J Am Chem Soc*. 2019;141(30):12021-12028.
25. Nguyen Thi HP, Ninh HD, Tran C van, Le BT, Bhosale S v., La DD. Size-Control and Surface Modification of Flexible Metal–Organic Framework MIL-53(Fe) by Polyethyleneglycol for 5-Fluorouracil Anticancer Drug Delivery. *ChemistrySelect*. 2019;4(8):2333-2338.
26. RAMAN V, SURESH S, SAVARIMUTHU PA, et al. Synthesis of Co₃O₄ nanoparticles with block and sphere morphology, and investigation into the influence of morphology on biological toxicity. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2016;11(2):553-560.
27. Ghosh SK, Ribas J, Bharadwaj PK. Metal–organic framework structures of Cu with pyridine-2,6-dicarboxylate and different spacers: identification of a metal bound acyclic water tetramer. *CrystEngComm*. 2004;6(45):250-256.
28. Mandal B, Chung JS, Kang SG. Exploring the geometric, magnetic and electronic properties of Hofmann MOFs for drug delivery. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2017;19(46):31316-31324.
29. Abazari R, Reza Mahjoub A, Slawin AMZ, Carpenter-Warren CL. Morphology- and size-controlled synthesis of a metal-organic framework under ultrasound irradiation: An efficient carrier for pH responsive release of anti-cancer drugs and their applicability for adsorption of amoxicillin from aqueous solution. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2018; 42:594-608.
30. Hatakeyama W, Sanchez TJ, Rowe MD, Serkova NJ, Liberatore MW, Boyes SG. Synthesis of Gadolinium Nanoscale Metal–Organic Framework with Hydrotropes: Manipulation of Particle Size and Magnetic Resonance Imaging Capability. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2011;3(5):1502-1510.

31. Wang Z, Hu S, Yang J, et al. Nanoscale Zr-Based MOFs with Tailorable Size and Introduced Mesopore for Protein Delivery. *Advanced Functional Materials*. 2018;28(16):1707356.
32. Ahmadi M, Ayyoubzadeh SM, Ghorbani-Bidkorbbeh F, et al. An investigation of affecting factors on MOF characteristics for biomedical applications: A systematic review. *Heliyon*. 2021;7(4):06914.
33. Sapsford KE, Tyner KM, Dair BJ, Deschamps JR, Medintz IL. Analyzing Nanomaterial Bioconjugates: A Review of Current and Emerging Purification and Characterization Techniques. *Analytical Chemistry*. 2011;83(12):4453-4488.
34. Lin PC, Lin S, Wang PC, Sridhar R. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology Advances*. 2014;32(4):711-726.
35. Meermann B. Field-flow fractionation coupled to ICP–MS: separation at the nanoscale, previous and recent application trends. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015;407(10):2665-2674.
36. E.Schimpf M, Caldwell K, Giddings JC, eds. *Field- Flow Fractionation Handbook.*; 2000.
37. Laborda F, Bolea E, Cepriá G, et al. Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples. *Analytica Chimica Acta*. 2016; 904:10-32.
38. Baalousha M, Stolpe B, Lead JR. Flow field-flow fractionation for the analysis and characterization of natural colloids and manufactured nanoparticles in environmental systems: A critical review. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218(27):4078-4103.
39. Faucher S, Charron G, Lützen E, et al. Characterization of polymer-coated CdSe/ZnS quantum dots and investigation of their behaviour in soil solution at relevant concentration by asymmetric flow field-flow fractionation – multi angle light scattering – inductively coupled plasma - mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2018;1028:104-112.
40. J.Hill S, ed. *Inductively Coupled Plasma Spectrometry and Its Applications*. 2nd ed.; 2007.
41. Aceto M. The Use of ICP-MS in Food Traceability. In: *Advances in Food Traceability Techniques and Technologies*. Elsevier; 2016:137-164.
42. Ma JY, Hsu KL, Mata JP, Wu CM, Lo CT. Solvency and salt addition influence the photoresponsivity and fluorescence in an azobenzene-containing block copolymer. *Polymer (Guildf)*. 2021;228:123941.
43. Rahimi Y, Goulding A, Shrestha S, Mirpuri S, Deo SK. Mechanism of copper induced fluorescence quenching of red fluorescent protein, DsRed. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008;370(1):57-61.
44. Henkelis SE, Rademacher D, Vogel DJ, et al. Luminescent Properties of DOBDC Containing MOFs: The Role of Free Hydroxyls. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2020;12(20):22845-22852.
45. Amado AM, Ramos AP, Silva ER, Borissevitch IE. Quenching of acridine orange fluorescence by salts in aqueous solutions: Effects of aggregation and charge transfer. *Journal of Luminescence*. 2016; 178:288-294.
46. Ferreira HS, Moreira-Alvarez B, Montoro Bustos AR, Encinar JR, Costa-Fernández JM, Sanz-Medel A. Capabilities of asymmetrical flow field – Flow fractionation on-line coupled to

different detectors for characterization of water-stabilized quantum dots bioconjugated to biomolecules. *Talanta*. 2020; 206:120228.