



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



INNOVACIONES NANOTECNOLÓGICAS

EN EL DESARROLLO DE PLATAFORMAS ANALÍTICAS
PARA LA EVOLUCIÓN DE LA SEGURIDAD AGROALIMENTARIA



ÁNGELA ÉCIJA ARENAS

TESIS DOCTORAL

2021

TITULO: *INNOVACIONES NANOTECNOLÓGICAS EN EL DESARROLLO DE
PLATAFORMAS ANALÍTICAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA
SEGURIDAD AGROALIMENTARIA*

AUTOR: *Ángela Écija Arenas*

© Edita: UCOPress. 2021
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

[https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/
ucopress@uco.es](https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es)

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Programa de doctorado: Química Fina

Título de la tesis: Innovaciones nanotecnológicas en el desarrollo de plataformas analíticas para la evaluación de la seguridad agroalimentaria / Nanotechnological innovations in the development of analytical platforms for the evaluation of the agri-food safety

Director: Juan Manuel Fernández-Romero

Autora de la tesis: Ángela Écija Arenas

Fecha de depósito tesis en el Idep: 5 de abril de 2021



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**INNOVACIONES NANOTECNOLÓGICAS EN EL
DESARROLLO DE PLATAFORMAS ANALÍTICAS PARA
LA EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD
AGROALIMENTARIA**

**NANOTECHNOLOGICAL INNOVATIONS IN THE
DEVELOPMENT OF ANALYTICAL PLATFORMS FOR
THE EVALUATION OF THE AGRI-FOOD SAFETY**

Tesis Doctoral

Ángela Écija Arenas

Córdoba, España 2021

**INNOVACIONES NANOTECNOLÓGICAS EN EL
DESARROLLO DE PLATAFORMAS ANALÍTICAS PARA LA
EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD AGROALIMENTARIA**

**NANOTECHNOLOGICAL INNOVATIONS IN THE
DEVELOPMENT OF ANALYTICAL PLATFORMS FOR THE
EVALUATION OF THE AGRI-FOOD SAFETY**

EL DIRECTOR

Firmado por FERNANDEZ ROMERO JUAN MANUEL -
30446213D con un certificado emitido por AC FNMT
Usuarios

Fdo. Juan Manuel Fernández Romero

Catedrático del Departamento de Química
Analítica de la Universidad de Córdoba

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias

LA DOCTORANDA

Firmado por ECIJA ARENAS
ANGELA - 15453359G con un
certificado emitido por AC FNMT

Fdo. Ángela Écija Arenas

Licenciada en Química

Juan Manuel Fernández Romero, Catedrático del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba, en calidad de director de la Tesis Doctoral presentada por la Licenciada en Química, Ángela Écija Arenas,

CERTIFICA: Que la Tesis Doctoral **“INNOVACIONES NANOTECNOLÓGICAS EN EL DESARROLLO DE PLATAFORMAS ANALÍTICAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD AGROALIMENTARIA”** ha sido desarrollada en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba (España) y el Institute of Analytical Chemistry, Chemo and Biosensors de la University of Regensburg (Alemania), y que, a mi juicio, reúne todos los requisitos exigidos a este tipo de trabajo.

Que D^a Ángela Écija Arenas es la primera autora de todos los trabajos científicos presentados en esta Tesis Doctoral. De acuerdo con la normativa de esta Universidad y los acuerdos internos, el primer autor es el responsable de la realización del trabajo experimental y de la producción del manuscrito. Además, ha participado en reuniones periódicas con el supervisor para evaluar y discutir los resultados obtenidos durante la Tesis Doctoral.

Y para que conste y surta los efectos pertinentes, expido el presente certificado en la ciudad de Córdoba, a 5 de abril de 2021.

Firmado por FERNANDEZ ROMERO JUAN MANUEL -
30446213D con un certificado emitido por AC FNMT
Usuarios

Fdo. Juan Manuel Fernández Romero



TÍTULO DE LA TESIS: INNOVACIONES NANOTECNOLÓGICAS EN EL DESARROLLO DE PLATAFORMAS ANALÍTICAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD AGROALIMENTARIA

DOCTORANDA: Ángela Écija Arenas

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

La doctoranda Dña. Ángela Écija Arenas cursó brillantemente los estudios del Máster en Química Fina Avanzada, obteniendo la calificación de Sobresaliente en su Trabajo Fin de Máster, cuyos resultados más relevantes se publicaron en la revista *Microchimica Acta*, situada en el primer cuartil del área de conocimiento.

La temática de la Tesis se encuadra dentro de una de las tendencias de vanguardia dentro de la Química Analítica, ya que se abordan innovaciones en la síntesis, separación y caracterización de nanomateriales, así como su incorporación como herramientas de utilidad en el desarrollo de plataformas analíticas determinativas de respuesta rápida orientadas a su aplicabilidad en el área agroalimentaria. Respecto a la síntesis de nanomateriales, tanto nanopartículas como liposomas, se ha optado por incorporar estructuras de carácter híbrido, con diferente funcionalidad y forma de aprovechamiento de su funcionalidad dentro del proceso analítico. En la resolución de las propuestas analíticas se han desarrollado diferentes metodologías separativas de los diferentes nanomateriales sintetizados, así como en la propuesta de plataformas analíticas basadas en la integración de sistemas continuos de análisis ya sean de flujo convencional como aquéllos desarrollados a escala microfluídica. La integración de las plataformas analíticas desarrolladas ha supuesto, en unos casos la incorporación de dispositivos miniaturizados para la aspiración de los nanomateriales separados mediante centrifugación en gradiente multifase de densidad (MDGC) en el sistema continuo de

análisis, y en otros casos, el acoplamiento de micro dispositivos electromagnéticos para la retención selectiva de los nanomateriales en la zona de reacción/detección en sistemas dinámicos convencionales y microfluídicos. Por otra parte, también se ha incorporado la innovación tecnológica de utilizar dispositivos de ensamblaje de los sistemas microfluídicos en el compartimento de muestra del un espectrofluorímetro convencional basado en la microfabricación mediante tecnología de impresión 3D. Se han establecido nuevos sistemas acoplados para la monitorización en-línea de los nanomateriales (h-NPs y h-Ls) separados mediante MDGC mediante sistemas continuos. También se ha propuesto la separación de liposomas híbridos mediante la técnica de fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF4) con detección multiángulo de la radiación dispersada (MALS). Finalmente, se han desarrollado dos metodologías para la determinación de residuos de antibióticos aminoglucósidos en muestras de agroalimentarias. La primera de ellas basada en el desarrollo de un biosensor aptamérico inmovilizado sobre grafeno y depositado en una superficie de oro para la detección en continuo mediante la técnica de plasmón de resonancia superficial (SPR). En el segundo caso, se ha demostrado la eficacia del uso plataformas analíticas microfluídicas basadas en el atrapamiento magnético en la zona de reacción/detección de magnetoliposomas híbridos (h-MLs) con reactivos encapsulados con detección fluorimétrica para la determinación de residuos de aminoglucósidos en alimentos.

La realización de la investigación recogida en la Memoria que se presenta ha permitido a la doctoranda adquirir una sólida formación analítica, adiestrándose en el manejo de técnicas de separación (MDGC, AF4), técnicas espectroscópicas de absorción (UV-VIS, FT-IR) y de emisión molecular, técnicas microscópicas óptica de absorción y de emisión, y electrónicas (TEM, SEM-EDX). Todo ello ha dado lugar a la preparación de 6 artículos científicos publicados o en vías de publicación, en revistas situadas en el primer cuartil del área de Química Analítica. También han sido fruto de esta Tesis Doctoral 9 comunicaciones a Congresos nacionales e internacionales, 7 de ellas orales.

La estancia realizada en el grupo de investigación del Prof. T. Hirsch (Universidad de Regensburg, Alemania) durante el desarrollo de la Tesis Doctoral ha completado de forma satisfactoria dicha formación, profundizando en nuevos

procedimientos de síntesis de nanomateriales de grafeno, que facilitaron la propuesta de un biosensor aptamérico para la determinación de kanamicina en alimentos.

Por todo ello, considero que la investigación desarrollada y recogida en esta Memoria, reúne todos los requisitos necesarios en cuanto a originalidad, innovación y calidad, por lo que se autoriza la presentación de la Tesis Doctoral de Dña. Ángela Écija Arenas.

Córdoba, 5 de abril de 2021

Firma del director

Firmado por FERNANDEZ ROMERO JUAN MANUEL -
30446213D con un certificado emitido por AC FNMT
Usuarios

Fdo. **Juan Manuel Fernández Romero**

MENCIÓN DOCTORADO INTERNACIONAL

Mediante la defensa de esta Memoria de Tesis Doctoral se pretende optar a la obtención de la Mención de “Doctorado Internacional” habida cuenta de que el doctorando reúne los requisitos para tal mención:

1. Cuenta con los informes favorables de dos doctores pertenecientes a instituciones de Enseñanza Superior de países distintos a España.
 - Prof. José González Rodríguez, School of Chemistry, University of Lincoln, Lincoln, Reino Unido.
 - Prof. Constantine Stalikas, Department of Chemistry-Laboratory of Analytical Chemistry, University of Ioannina, Ioannina, Grecia.
2. Uno de los miembros del tribunal que ha de evaluar la Tesis pertenece a un centro de Enseñanza Superior de otro país distinto a España.
 - Prof Axel Dürkop, Institute of Analytical Chemistry, Chemo and Biosensors, University of Regensburg, Regensburg, Alemania.
3. Parte de la defensa de la Tesis Doctoral se realizará en una lengua distinta de las lenguas oficiales en España.
4. La doctoranda ha realizado una estancia de tres meses en el Institute of Analytical Chemistry, Chemo and Biosensors de la University of Regensburg (Alemania), bajo la supervisión del profesor Thomas Hirsch, que ha contribuido a su formación y permitido desarrollar parte del trabajo experimental de esta Memoria.



INFORME DEL FACTOR DE IMPACTO DE LAS PUBLICACIONES DE LA TESIS

La tabla siguiente contiene los factores de impacto y el cuartil, obtenidos del Journal Citation Reports, en el que se encuentran las publicaciones derivadas de la presente Tesis Doctoral correspondiente al año de su publicación o al último disponible.

Publicaciones	Factor de impacto	Decil/ Cuartil
Separation and purification of hydrophobic magnetite-gold hybrid nanoparticles by multiphase density gradient centrifugation. Microchimica Acta 183 (2016) 2005-2012	4,580	D1 8/76 Química Analítica
Luminescence continuous flow system for monitoring the efficiency of hybrid liposomes separation using multiphase density gradient centrifugation. Talanta 222 (2021) 121-532	5,339	Q1 11/86 Química Analítica
Integration of a microfluidic system into a conventional luminescence detector using a 3D printed alignment device. Microchimica Acta 187 (2020) 187:620	6,232	D1 9/86 Química Analítica

Separation and characterization of liposomes using asymmetric flow field-flow fractionation with online multi-angle light scattering detection. Journal of Chromatography A 1636 (2021) 461798	4,049	Q1 14/86 Química Analítica
Development of an aptamer-based SPR-biosensor for the determination of kanamycin residues in foods Analytica Chimica Acta 1169 (2021) 338631	5,977	Q1 10/86 Química Analítica
Usefulness of hybrid magnetoliposomes for the determination of aminoglycoside residues in food using an integrated microfluidic system with fluorometric detection Journal of Agricultural and Food Chemistry (2021) (aceptado para su publicación)	4,192	Q1 15/71 Química Aplicada

RESUMEN

1. Introducción o motivación de la tesis

Esta Tesis Doctoral ha tenido como objetivo el desarrollo de plataformas analíticas de respuesta rápida para su aplicación en análisis agroalimentario con el uso de nanoestructuras incorporadas como herramientas analíticas con diferente finalidad utilizando sistemas dinámicos convencionales o implementados a escala micrométrica.

Para ello, se han incluido innovaciones en los métodos de síntesis de dichas nanoestructuras, así como en el empleo de plataformas analíticas separativas con diferente fundamento para su separación y caracterización. Entre las nanoestructuras desarrolladas se encuentran diversos tipos de nanopartículas (NPs) y bicapas lipídicas (liposomas), así como de nanomateriales de carbono bidimensional, como grafeno. Entre las NPs sintetizadas, cabe destacar las NPs híbridas, principalmente tipo *core-shell* de NPs metálicas de oro con un núcleo magnético de NPs de óxidos de hierro, cuya superficie se ha modificado para conferirles carácter hidrofóbico ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs-C12SH}$). Los liposomas son estructuras autoensambladas cuya utilidad como contenedores analíticos favorece diferentes funcionalidades a lo largo del proceso analítico. Por una parte, la incorporación de las NPs, formando magnetoliposomas (MLs), los dotan de capacidad de retención magnética en la zona de reacción/detección de las plataformas analíticas determinativas desarrolladas. Por otra parte, el encapsulamiento de diferentes ingredientes involucrados en las reacciones analíticas o indicadoras, ejercen una importante función protectora y/o amplificadora respecto al desarrollo de la reacción analítica y la monitorización de la señal instrumental. Los nanomateriales de carbono bidimensional, en especial el grafeno, son buenos candidatos para

proporcionar una fina capa receptora. Como este material tiene un átomo de espesor y posee grandes áreas de hibridación sp^2 , se ha usado para la inmovilización de reactivos y así originar superficies activas en el desarrollo de plataformas analíticas biosensoras.

Uno de los retos a conseguir respecto a la seguridad alimentaria se orienta hacia el desarrollo de metodologías que posibiliten la determinación de residuos de sustancias químicas tipificadas como xenobióticos en el área del análisis de alimentos. Se evidencia una demanda tecnológica para desarrollar metodologías analíticas más rápidas, sensibles, selectivas y precisas para la monitorización de residuos de xenobióticos. La aplicabilidad de las investigaciones desarrolladas se ha orientado hacia la determinación de residuos de antibióticos aminoglucósidos en alimentos. Se han propuesto diferentes opciones de plataformas analíticas determinativas basadas en el uso de sistemas dinámicos a escala microfluídica en las que se han integrado diferentes sistemas instrumentales para el seguimiento de las reacciones analíticas estudiadas.

2. Contenido de la investigación

El *objetivo genérico* de las investigaciones propuestas en esta Tesis Doctoral ha sido implementar diferentes innovaciones nanotecnológicas para su incorporación en las nuevas plataformas analíticas diseñadas que permitan aportar información para la evaluación de la calidad agroalimentaria. Este objetivo genérico se ha subdividido en tres *objetivos específicos* que quedan reflejados en los tres apartados en que se ha estructurado el desarrollo transversal de las investigaciones realizadas:

- (a) Síntesis, separación y caracterización de los materiales y/o nanoestructuras a incorporar en las diferentes partes de los sistemas dinámicos, ya sea como dispositivos de anclaje e integración instrumental, como elementos que

favorezcan la retención de nanoestructuras o reactivos, o como reactivos propios que participan en las reacciones analíticas involucradas.

- (b) Propuesta de plataformas analíticas con carácter separativo y/o determinativo basadas en el acoplamiento en sistemas continuos convencionales o a escala microfluídica, que aporten información sobre el resultado de la separación de los nanomateriales posterior a su síntesis.
- (c) Demostración del potencial analítico de las plataformas desarrolladas para la evaluación de la seguridad agroalimentaria.

Esta Memoria se ha estructurado en tres bloques, precedidos por una Introducción, en la que se comentan algunos aspectos básicos relacionados con los contenidos estudiados y una sección en la que se muestran las principales Herramientas instrumentales y metodológicas para el desarrollo de las plataformas analíticas y su aplicación en análisis agroalimentario. En este contexto, en la Parte Experimental se han incluido las siguientes investigaciones:

El Bloque I se centra en la síntesis, separación y caracterización de diferentes nanomateriales utilizados a lo largo de las investigaciones desarrolladas. Para ello, se han desarrollado diferentes plataformas analíticas en las que el resultado de la separación de los nanomateriales, basada en diferentes fundamentos, se ha acoplado a sistemas de detección para su monitorización y caracterización de los nanomateriales separados. Este bloque ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

- Desarrollo de un método de separación de NPs híbridas tipo *core-shell* con núcleo de magnetita recubiertas con NPs de oro y una superficie hidrofóbica ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs-C12SH}$) mediante centrifugación en gradiente multifase de densidad (MDGC). La separación se ha monitorizado mediante el acoplamiento del vial de separación a un sistema de flujo continuo de análisis con detección de dispersión de la radiación [1].

- Monitorización mediante un sistema de flujo continuo con detección luminiscente del resultado de la separación de poblaciones de liposomas mediante MDGC posterior a la síntesis de MLs híbridos en los que han encapsulado $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs-C12SH}$ y distintos fluoróforos [2].
- Separación y caracterización de las distintas poblaciones obtenidas después de la síntesis de varios tipos de liposomas utilizando la técnica AF4-MALS y la comparación de los resultados obtenidos con otras técnicas, como TEM y DLS [3].

En el Bloque II se ha desarrollado una plataforma analítica para monitorizar el resultado de la separación MDGC de los liposomas híbridos sintetizados por acoplamiento a un sistema microfluídico que se ha integrado en el sistema de detección, un espectrofluorímetro convencional, mediante el uso de un dispositivo de anclaje y focalización fabricado mediante tecnología de impresión 3D. Este bloque a dado lugar a una publicación:

- Integración de un sistema microfluídico en un detector luminiscente convencional usando un dispositivo de alineamiento diseñado y obtenido por impresión 3D. En el sistema también se integra el dispositivo de retención magnética y los elementos de focalización de la radiación incidente [4].

Finalmente, en el Bloque III se han propuesto dos metodologías analíticas (bio)sensoras para la determinación de residuos de antibióticos aminoglucósidos en alimentos. Se ha descrito dos plataformas analíticas en dos publicaciones:

- Desarrollo de un biosensor aptamérico basado en la unión covalente del aptámero a grafeno depositado sobre una superficie de oro para la determinación de residuos de kanamicina en alimentos mediante monitorización de la dispersión basada en la técnica de resonancia del plasmón superficial (SPR) [5].

- Desarrollo de una plataforma analítica sensora a escala micrométrica para la determinación de residuos de antibióticos aminoglucósidos basada en la integración de la zona de reacción/detección en un dispositivo microfluídico con retención electromagnética de parte de los ingredientes de la reacción analítica por encapsulación en MLs híbridos y detección fluorimétrica. La integración del sistema microfluídico en el compartimento de muestra de un espectrofluorímetro convencional se realiza mediante el sistema de anclaje construido mediante tecnología de impresión 3D [6].

3. Conclusiones

En la presente Memoria se han desarrollado diferentes plataformas analíticas separativas y/o determinativas con diferente grado de integración con sistemas dinámicos de flujo convencional o desarrollados a escala microfluídica, para la monitorización de la eficacia en la separación de los nanomateriales híbridos sintetizados, así como para la determinación de residuos de antibióticos aminoglucósidos en alimentos. A continuación, se resumen las conclusiones más relevantes de las investigaciones realizadas:

1. Se han sintetizado y caracterizado diferentes tipos de nanomateriales híbridos, mediante modificaciones innovadoras de métodos clásicos. Cabe destacar los siguientes nanomateriales:
 - NPs híbridas con estructura *core-shell* con un núcleo de magnetita recubiertas con NPs de oro y haciendo su superficie hidrofóbica ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs-C12SH}$), que se han utilizado para su incorporación en la bicapa lipídica para formar MLs.
 - Liposomas híbridos sintetizados mediante la metodología de evaporación rápida de disolvente (RSE), permitiendo la incorporación de materiales con diferente funcionalidad a lo largo del proceso analítico. El encapsulamiento de estos materiales diversos dentro de los liposomas

- ha aportado aspectos innovadores en las metodologías desarrolladas, aportando una gran utilidad como contenedores analíticos: a) como dispositivos de transporte y de protección del material encapsulado a lo largo del proceso analítico, especialmente de compuestos involucrados en las reacciones analíticas, b) como dispositivos con capacidad magnética que facilita su retención en zonas claves de reacción/detección del proceso (bio)analítico, y c) como dispositivo con funciones de amplificación de la señal instrumental, ya que permiten el atrapamiento/liberación de reactivos preconcentrados en el interior de la vesícula lipídica.
- Nanomateriales de carbono bidimensional (grafeno) utilizados como estructura base para la inmovilización de aptámeros selectivos en el diseño de un sensor aptamérico en continuo con detección mediante SPR.
2. Se han desarrollado diferentes plataformas analíticas separativas que permiten monitorizar el rendimiento de la eficacia en la separación de los nanomateriales sintetizados y de los residuos originados después de los procesos de síntesis. El proceso de separación se ha llevado a cabo mediante el uso de la metodología MDGC. Se ha estudiado el empleo de diferentes materiales con capacidad separativa en base a su efecto sobre la velocidad de sedimentación, así como el establecimiento de diferentes perfiles en el gradiente de centrifugación. Se han desarrollado dos tipos de plataformas separativas basadas en el empleo de sistemas dinámicos de flujo continuo a escala convencional y a escala micrométrica. Se han empleado diferentes sistemas de monitorización de la señal instrumental con diferente fundamento en función del tipo de nanomaterial separado, ya sea mediante medida de la dispersión de la radiación o mediante medida de la emisión luminiscente de los fluoróforos involucrados.

3. Se han separado diferentes poblaciones de liposomas híbridos mediante el uso de la técnica AF4-MALS.
4. Se ha establecido por primera vez una plataforma analítica integrada mediante el acoplamiento de un sistema microfluídico en el compartimento de muestra de un espectrofluorímetro convencional mediante el uso de un dispositivo de anclaje y focalización fabricado mediante tecnología de impresión 3D. Esta plataforma analítica se ha utilizado para la monitorización del resultado de la separación mediante MDGC de diferentes tipos de liposomas híbridos sintetizados.
5. Se ha desarrollado una plataforma analítica fundamentada en un biosensor aptamérico para la determinación de kanamicina en leche mediante la integración de nanomateriales de carbono bidimensional de grafeno depositado en la monocapa de oro situada en la superficie sensora del sistema de flujo acoplado en un detector de plasmón de resonancia superficial.
6. Se ha demostrado la utilidad de una plataforma analítica microfluídica integrada mediante tecnología 3D dentro de detectores luminiscentes convencionales en la que se han incorporado MLs híbridos (que contienen Fe_3O_4 @AuNPs-C12SH y N-acetilcisteína) para la determinación de residuos de antibióticos aminoglucósidos en muestras de alimentos, utilizando a su vez o-ftalaldehído como reactivo derivatizante.

Referencias

- [1] Á. Écija-Arenas, V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Separation and purification of hydrophobic magnetite-gold hybrid nanoparticles by multiphase density gradient centrifugation, *Microchim. Acta.* 183 (2016) 2005–2012. <https://doi.org/10.1007/s00604-016-1838-z>.

- [2] Á. Écija-Arenas, V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero, Luminescence continuous flow system for monitoring the efficiency of hybrid liposomes separation using multiphase density gradient centrifugation, *Talanta*. (2020). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135577>.
- [3] Á. Écija-Arenas, V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero, Separation and characterization of liposomes using asymmetric flow field-flow fractionation with online multi-angle light scattering detection, *J. Chromatogr. A*. 1636 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461798>.
- [4] Á. Écija-Arenas, V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero, Integration of a microfluidic system into a conventional luminescence detector using a 3D printed alignment device, *Microchim. Acta*. 187 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00604-020-04597-w>.
- [5] Á. Écija-Arenas, E.-M. Kirchner, T. Hirsch, J.M. Fernández-Romero, Analytica Chimica Acta Development of an aptamer-based SPR-biosensor for the determination of kanamycin residues in foods, *Anal. Chim. Acta*. 1169 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338631>.
- [6] Á. Écija-Arenas, V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero, Usefulness of hybrid magnetoliposomes for the determination of aminoglycoside residues in food using an integrated microfluidic system with fluorometric detection, Aceptado para su publicación en la revista *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021.

ABSTRACT

1. Introduction or motivation of the Thesis

The aim of this Doctoral Thesis has been developing analytical platforms with a rapid response for their application in agri-food analysis with the use of incorporated nanostructures as analytical tools with different purposes using conventional dynamic systems or implemented at a micrometric scale.

For this, some innovations in the synthesis methods of mentioned nanostructures and separative analytical platforms with a different basis for their separation and characterization have been developed. Among the developed nanostructures are various types of nanoparticles (NPs) and lipid bilayers (liposomes), and two-dimensional carbon nanomaterials, like graphene. Among the NPs synthesized the hybrid NPs must be highlighted, mainly core-shell type composed of metallic gold NPs with a magnetic core of iron oxides NPs, whose surface has been modified to provide them hydrophobic character ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs-C12SH}$). Liposomes are self-assembled structures whose usefulness as analytical containers favors different functionalities throughout the analytical process. On the one hand, the NPs incorporation, forming magnetoliposomes (MLs), endow them with magnetic retention capability in the reaction/detection zone of the developed determinative analytical platforms. On the other hand, the encapsulation of different ingredients involved in analytical or indicator reactions plays an important protective and/or amplifying function concerning the reaction development and instrumental signal monitoring. Two-dimensional carbon nanomaterials, especially graphene, are good candidates for providing a thin receptor layer. As this material is one atom thick and has large sp^2 hybridization areas, it has been used to immobilize reagents and originate active surfaces in the development of biosensor analytical platforms.

One of the challenges concerning food safety is oriented towards developing methodologies that determine chemical substance residues classified as xenobiotics in the food analysis area. There is a technological demand to develop faster, more sensitive, selective, and precise analytical methodologies for monitoring xenobiotic residues. The applicability of the developed investigations has been oriented to determine aminoglycoside antibiotic residues in food. Different options of determinative analytical platforms based on conventional dynamic systems and on a microfluidic scale in which the integration of different instrumental systems for monitoring developed analytical reactions have been proposed.

2. Research content

The *generic objective* of the research proposed in this Doctoral Thesis has been to implement different nanotechnological innovations for their incorporation into the new analytical platforms designed to provide information for the agri-food quality evaluation. This generic objective has been subdivided into three *specific objectives* according to the three sections in which the transversal development of the research has been structured:

- (a) Synthesis, separation, and characterization of the materials and/or nanostructures to be incorporated in the different parts of dynamic systems, either as anchoring and instrumental integration devices, as elements that favor the nanostructures or reagents retention, or as reagents that participate in the involved chemical reactions.
- (b) Proposal of analytical platforms with a separative and/or determinative character based on the coupling in a conventional continuous system or on a microfluidic scale provides information about the result of the nanomaterials separation after their synthesis.

- (c) Demonstration of the analytical potential of the platforms developed for the evaluation of agri-food safety.

This Thesis Book has been structured in three blocks, preceded by an Introduction. Then, some fundamental aspects related to the studied contents have been discussed, and a section with the main instrumental and methodological Tools for developing analytical platforms and their application in agri-food analysis. In this context, the following research has been included in the Experimental Part:

Block I is focused on the synthesis, separation, and characterization of different nanomaterials used throughout the developed research. For that, two methodologies in which the result of the nanomaterials separation, based on a different fundament, has been coupled to detection systems for its monitoring and the characterization of the separated nanomaterials. As a result, this block has resulted in the following publications:

- Development of a separation method using multiphase density gradient centrifugation (MDGC) for core-shell hybrid NPs with a magnetite core coated with gold NPs and a hydrophobic surface ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs-C12SH}$). The separation has been monitored by coupling the separation vial to a continuous flow analysis system with resonance light scattering detection [1].
- Monitoring by a continuous flow system with luminescent detection of the separation result of liposome populations by MDGC after the synthesis of hybrid MLs in which $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs-C12SH}$ and different fluorophores have been encapsulated [2].
- Separation and characterization of the different populations obtained after synthesizing various types of liposomes using the AF4-MALS technique and the comparison of the acquired results with other techniques, such as TEM and DLS [3].

In Block II, an analytical platform has been developed to monitor the result of the MDGC separation of the synthesized hybrid liposomes by coupling to a microfluidic system integrated into the detection system, a conventional spectrofluorimeter, using anchoring and focusing device manufactured using 3D printing technology. This block has led to a publication:

- Integration of a microfluidic system in a conventional luminescent detector using an alignment device designed and obtained by 3D printing. The magnetic retention device and elements for focusing the incident radiation have also been integrated into the system [4].

Finally, in Block III, two (bio)sensor analytical methodologies have been proposed to determine aminoglycoside antibiotic residues in food. Two analytical platforms have been described in two publications:

- Development of an aptameric biosensor based on the aptamer covalent binding to graphene deposited on a gold surface to determine kanamycin residues in food by monitoring the dispersion based on the surface plasmon resonance (SPR) technique [5].
- Development of a micrometric-scale sensor analytical platform to determine aminoglycoside antibiotic residues based on integrating the reaction/detection zone in a microfluidic device with electromagnetic retention of part of analytical reaction ingredients by their encapsulation in hybrid MLs and fluorimetric detection. The integration of the microfluidic system in the sample compartment of a conventional spectrofluorimeter is performed by the anchoring system built by 3D printing technology [6].

3. Conclusions

In this Thesis Book, different separative and/or determinative analytical platforms have been developed with different degrees of integration with a

conventional dynamic flow or microfluidic systems to monitor the efficiency of the synthesized hybrid nanomaterials separation and for determining aminoglycoside antibiotic residues in food. The most relevant conclusions of the research carried out are summarized below:

1. Different types of hybrid nanomaterials have been synthesized and characterized through innovative modifications of classical methods. The following nanomaterials should be highlighted:
 - Core-shell hybrid NPs with a magnetite core coated with gold NPs and a hydrophobic surface ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@AuNPs-C12SH}$) have been used to incorporate them into the lipid bilayer to form MLs.
 - Hybrid liposomes synthesized using the rapid solvent evaporation (RSE) methodology, allowing the incorporation of materials with different functions throughout the analytical process. Furthermore, the encapsulation of these different materials within liposomes has provided innovative aspects in the developed methodologies, giving great usefulness as analytical containers: a) as transport and protection devices for encapsulated material through the analytical process, especially of compounds involved in the analytical reactions, b) as containers with magnetic properties that allow their retention in key reaction/detection areas of the (bio)analytical process, and c) as devices with amplification of the instrumental signal functions, since they allow the entrapment/release of pre-concentrated reagents inside the lipid vesicle.
 - Two-dimensional carbon nanomaterials (graphene) are used as a base structure for the immobilization of selective aptamers to design a continuous aptameric sensor with SPR detection.
2. Different separative analytical platforms to monitor the efficiency of the synthesized nanomaterials separation and the residues originated after the

synthesis process have been developed. The separation process has been carried out by the MDGC method. Different materials with separative capacity related to their effect in the sedimentation rate and the different separation profiles establishment in the centrifugation gradient have been studied. Two types of separative platforms based on dynamic continuous flow systems at conventional and microfluidic scales have been developed. Different instrumental signal monitoring systems with different bases depending on the separated nanomaterial have been used, either by measuring the resonance light scattering or the luminescent emission of the involved fluorophores.

3. Different liposome populations by using the AF4-MALS technique have been separated.
4. An integrated analytical platform has been established for the first time by coupling a microfluidic system in the sample compartment of a conventional spectrofluorimeter using an anchoring and targeting device manufactured by 3D printing technology. This analytical platform has been applied to monitor the MDGC separation result of different synthesized hybrid liposomes.
5. An analytical platform based on an aptameric biosensor to determine kanamycin in milk has been developed by integrating graphene two-dimensional carbon nanomaterials deposited in the gold monolayer of the sensor surface of the flow system coupled in a surface plasmon resonance detector.
6. The usefulness of a microfluidic analytical platform integrated by 3D technology into conventional luminescent detectors in which hybrid MLs (containing Fe_3O_4 @AuNPs-C12SH and N-acetylcysteine) have been incorporated for the determination of aminoglycoside antibiotic residues in

food samples has been demonstrated, using o-phthalaldehyde as derivatization reagent.

4. References

- [1] Á. Écija-Arenas, V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Separation and purification of hydrophobic magnetite-gold hybrid nanoparticles by multiphase density gradient centrifugation, *Microchim. Acta.* 183 (2016) 2005–2012. <https://doi.org/10.1007/s00604-016-1838-z>.
- [2] Á. Écija-Arenas, V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero, Luminescence continuous flow system for monitoring the efficiency of hybrid liposomes separation using multiphase density gradient centrifugation, *Talanta.* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135577>.
- [3] Á. Écija-Arenas, V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero, Separation and characterization of liposomes using asymmetric flow field-flow fractionation with online multi-angle light scattering detection, *J. Chromatogr. A.* 1636 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461798>.
- [4] Á. Écija-Arenas, V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero, Integration of a microfluidic system into a conventional luminescence detector using a 3D printed alignment device, *Microchim. Acta.* 187 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00604-020-04597-w>.
- [5] Á. Écija-Arenas, E.-M. Kirchner, T. Hirsch, J.M. Fernández-Romero, Analytica Chimica Acta Development of an aptamer-based SPR-biosensor for the determination of kanamycin residues in foods, *Anal. Chim. Acta.* 1169 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338631>.

- [6] Á. Écija-Arenas, V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero, Microfluidic platform based on magnetically retained hybrid magnetoliposomes for aminoglycoside antibiotics determination in foods with fluorimetric determination, Accepted for its publication in Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021.

MI AGRADECIMIENTO...

A mi director de Tesis, el profesor D. Juan Manuel Fernández Romero, por ofrecerme la posibilidad de realizar esta Tesis Doctoral bajo su tutela y por enseñarme todos los conocimientos que he adquirido para ser investigadora. También a las profesoras D^a. M^a Paz Aguilar Caballos y D^a Agustina Gómez Hens, por sus consejos y ayudarme cuando lo he necesitado.

A la concesión de la Ayuda de Movilidad Internacional por parte de la Universidad de Córdoba, gracias a la cual he podido concluir esta Tesis con Mención Internacional. También al proyecto UCO/FEDER-Andalucía financiado por el Programa Marco de Fondos Operativos FEDER-Andalucía 2014-2020 (ref. UCO-1263679). gracias al que he obtenido un contrato que ha hecho posible mi dedicación a este trabajo durante los últimos meses del año 2020.

A mis compañeras de laboratorio, Vanesa y Valle. Por toda la ayuda que me han prestado y por hacer estos años más llevaderos. A mi compañero Franci que, aunque no pertenezca a este grupo, es más que evidente su presencia en él, porque son muchos años ya los que estamos uno al lado del otro. Por supuesto quiero también expresar mi gratitud al resto de las personas que forman parte del Departamento de Química Analítica.

Sobre todo, quiero hacer una mención especial a Vanesa, la persona que me ha guiado en el laboratorio, que tanto me ha enseñado y tanto me ha ayudado, en lo profesional y en lo personal. Porque siempre he sabido que ha estado ahí para todo lo que he necesitado. Me llevo una gran amiga de este trayecto.

A mis cordobeses geniales (Almudena, Álvaro, Carlos y Javi) por intentar entender lo que hago, interesarse siempre y escuchar mis quejas sin saber bien de lo que hablaba. En especial a Javi, por la ayuda para hacer que esta Memoria sea mucho más bonita.

A mi familia, que tanto me ha apoyado durante estos años. A mis padres. A mis tíos, que son como otros padres para mi. A mi abuela, que tanto le cuesta entender lo que hago y aún así se siente orgullosa de su nieta.

Y, sobre todo, a los que faltan, pero que siempre estarán, mis abuelos Ascensión, Juan Antonio y Francisco. Porque pensar en ellos me da fuerza.

I would like to thank Professor Thomas Hirsch for offering me the opportunity to work with his research group for three months at the Institute of Analytical Chemistry, Chemo, and Biosensors (University of Regensburg), in which I have learned new techniques and procedures that have provided me more knowledge to carry out this Doctoral Thesis. Also, all the members of the group helped me and made my stay easier.

A mis padres, por todo lo que han hecho por mi. Porque los sacrificios siempre tienen su recompensa. Gracias por hacerme la persona que soy hoy en día, por enseñarme los valores que tengo, por apoyarme en todo momento y no dudar nunca de mi.

A Rafa, esa persona que siempre está ahí para mí, que me apoya y me alienta a ser yo misma. Gracias por escucharme siempre y ayudarme, por intentar entender lo que hago e incluso darme respuestas a veces a problemas que ni siquiera entiendes. No ha sido un camino fácil, pero todo lo superamos.

Acrónimos/Abbreviations	1
Objeto/Aim	11
Introducción	17
Herramientas analíticas	121
Parte experimental	143
Bloque I: Síntesis, separación y caracterización de nanomateriales	145
Introducción	147
Capítulo I.1. Separation and purification of hydrophobic magnetite-gold hybrid nanoparticles by multiphase density gradient centrifugation	151
Capítulo I.2. Luminescence continuous flow system for monitoring the efficiency of hybrid liposomes separation using multiphase density gradient centrifugation	173
Capítulo I.3. Separation and characterization of liposomes using asymmetric flow field-flow fractionation with online multi-angle light scattering detection	201
Bloque II: Desarrollo de plataformas analíticas con integración entre sistemas microfluídicos y detectores convencionales	231
Introducción	233
Capítulo II. 1. Integration of a microfluidic system into a conventional luminescence detector using a 3D printed alignment device	237

Bloque III: Plataformas (bio)sensores microfluídicas aplicadas al análisis agroalimentario	261
Introducción.....	263
Capítulo III.1. Development of an aptamer-based SPR-biosensor for the determination of kanamycin residues in foods	267
Capítulo III.2. Microfluidic platform based on magnetically retained hybrid magnetoliposomes for aminoglycoside antibiotics determination in foods with fluorimetric determination.....	295
Discusión de los resultados	323
Conclusiones/Conclusions	415
Anexos. Producción científica.....	425
Anexo A. Publicaciones científicas derivadas de la Tesis Doctoral ..	427
Anexo B. Presentación de comunicaciones a congresos.....	437
Anexo C. Pósteres	455
Anexo D. Actividades de divulgación científica	461



ACRÓNIMOS



ABBREVIATIONS

3-WSV	Válvula de selección de tres vías – Three ways switching valve
AAG	Antibiótico aminoglucósido – Aminoglycoside antibiotic
AB	Burbuja de aire – Air bubble
ADI	Dosis diaria aceptable – Acceptable daily intake
AF4	Fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico – Asymmetric flow field-flow fractionation
AFM	Microscopía de fuerza atómica – Atomic force microscopy
AgNPs	Nanopartículas de plata – Silver nanoparticles
AuNPs	Nanopartículas de oro – Gold nanoparticles
AuNPs-C12SH	Nanopartículas de oro recubiertas de 1-dodeciltiol – Gold nanoparticles coated with 1-dodecylthiol
C12SH	1-dodeciltiol – 1-dodecylthiol
CAD	Diseño asistido por ordenador – Computer-aided design
CE	Electroforesis capilar – Capillary electrophoresis
CFA	Análisis de flujo continuo – Continuous flow analysis
CFFF	Fraccionamiento en flujo por campo centrífugo – Centrifugal field flow fractionation
CFS	Sistema de flujo continuo – Continuous flow system
CH	Colesterol - Cholesterol
COC	Copolímero de olefina cíclico – Cyclic olefin copolymer
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio – Cetyltrimethylammonium bromide
CV	Violeta de cresilo – Cresyl violet
CVD	Deposición química de vapor – Chemical vapor deposition

CZE	Electroforesis capilar de zona – Capillary zone electrophoresis
DDSA	Anhídrido 2-dodecenilsuccínico – 2-Dodecenylsuccinic anhydride
DLS	Dispersión de la radiación dinámica – Dynamic light scattering
DMP-30	2,4,6-Tris(dimetilaminometil)fenol – 2,4,6-Tris(dimethyl aminomethyl)phenol
DOPE	3-sn-fosfatidiletanolamina – 3-sn-phosphatidylethanolamine
DSPC	1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina – 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
e-Ls / e-LPs	Liposomas vacíos – Empty liposomes
EDC	1-etil-3-(3-(dimetilamino)propil)carbodiimida – 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
EDX	Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X/ Energy dispersive X-ray spectroscopy
EE	Eficacia de encapsulamiento – Encapsulation efficiency
ElFFF	Fraccionamiento en flujo por campo eléctrico – Electrical field flow fractionation
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas – Enzyme-linked immunosorbent assay
ELSD	Detector de dispersión de luz tras evaporación – Evaporative light scattering detector
EPR	Espectroscopía de paramagnética electrónica – Electron paramagnetic resonance spectroscopy
ESR	Espectroscopía de resonancia de espín electrónico (ESR) – Electronic spin resonance spectroscopy

F4	Fraccionamiento en flujo por campo de flujo – Flow field flow fractionation
Fe₃O₄@AuNPs	Nanopartículas de oro magnéticas – Magnetic-gold nanoparticles
Fe₃O₄@AuNPs-C12SH	Nanopartículas de oro magnéticas recubiertas de 1-dodeciltiol – Magnetic-gold nanoparticles coated with 1-dodecylthiol
Fe₃O₄NPs	Nanopartículas magnéticas – Magnetic nanoparticles
FFF	Fraccionamiento en flujo por campo – Field-flow fractionation
FIA	Análisis por inyección en flujo – Flow injection system
FLD	Detector fluorimétrico – Fluorimetric detector
FTIR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier – Fourier transform infrared spectroscopy
GE	Electroforesis en gel – Gel electrophoresis
GEMMA	Análisis molecular de movilidad electroforética en fase gaseosa – Gas-phase electrophoretic mobility molecular analysis
GFFF	Fraccionamiento en flujo por campo gravitacional – Graviational field flow fractionation
GO	Óxido de grafeno – Graphene oxide
GUV	Vesícula unilamelar gigante – Giant unillamelar vesicle
h-Ls / h-LPs	Liposomas híbridos – Hybrid liposomes
h-MLs / h-MLPs	Magnetoliposomas híbridos – Hybrid magnetoliposomes
HDC	Cromatografía hidrodinámica – Hydrodynamic chromatography
HEPES	N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[ácido 2-etanosulfónico] – N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]

HF5	Fraccionamiento en flujo por campo de flujo de fibra hueca – Hollow fiber flow field flow fractionation
HGMS	Separación magnética de alto gradiente – High gradient magnetic separation
HPTS	Sal trisódica del ácido 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfónico – 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt
HTS	Discriminación de alto rendimiento – High throughput analysis
I_{2D}	Intensidad del pico 2D de grafeno – Intensity of 2D-peak of graphene
I_D	Intensidad del pico D de grafeno – Intensity of D-peak of graphene
I_G	Intensidad del pico G de grafeno – Intensity of G-peak of graphene
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada/ International Union of Pure and Applied Chemistry
IV	Válvula de inyección – Injection valve
K_D	Constante de disociación – Dissociation constant
LC	Cromatografía líquida – Liquid chromatography
LALS	Dispersión de la radiación de ángulo bajo – Low-angle light scattering
LOC	Laboratorio en un chip – Lab-On-A-Chip
LOD	Límite de detección – Limit of detection
LOQ	Límite de cuantificación – Limit of quantification
LS	Dispersión de la radiación – Light scattering

Ls / LPs	Liposomas – Liposomes
LUV	Vesícula unilamelar grande – Large unilamellar vesicle
LWF	Fluoróforo de larga longitud de onda – Long-wavelength fluorophore
MA	Multiálcali – Multialkali
MALS	Dispersión de la radiación multiángulo – Multi-angle light scattering
MDGC	Centrifugación en gradiente multifase de densidad – Multidensity gradient centrifugation system
MEMS	Sistemas microelectromecánicos – Microelectromechanical systems
MFS	Sistema microfluídico – Microfluidic system
MgFFF	Fraccionamiento en flujo por campo magnético – Magnetic field flow fractionation
MHA	Ácido 16-mercaptohexadecanoico – 16-mercaptohexadecanoic acid
MIP	Polímero de impresión molecular – Molecularly imprinted polymer
MLs / MLPs	Magnetoliposomas – Magnetoliposomes
MLV	Vesícula multilamelar – Multilamellar vesicle
MNA	Anhídrido metilnádico – Methylnadic anhydride
MRL	Límite máximo de residuo – Maximum residue limit
MS/MS	Espectroscopía de masas en tándem – Tandem mass spectroscopy
MVV	Vesícula multivesicular – Multivesicular vesicle

NAC	N-acetilcisteína – N-acetylcysteine
nES	Nanoelectrospray – Nanoelectrospray
NF	Naftofluoresceína - Naphtofluorescein
NHS	N-hidroxisuccinimida – N-hydroxysuccinimide
NIR	Infrarrojo cercano – Near infrared
NLCs	Transportadores lipídicos nanoestructurados – Nanostructured lipid carriers
NMR	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear – Nuclear magnetic resonance spectroscopy
NMs	Nanomateriales – Nanomaterials
NPs	Nanopartículas – Nanoparticles
NTA	Análisis por conteo de nanopartículas – Nanoparticles tracking analysis
O/W	Orgánico/Acuoso – Oil/Water
OPA	o-ptalaldehído – o-phthalaldehyde
PBA	Ácido 1-pirenobutírico – 1-pyrenebutiric acid
PBS	Disolución reguladora de fosfato salina – Phosphate buffer saline
PCS	Espectroscopía de correlación de fotones – Photon correlation spectroscopy
PdI	Índice de polidispersidad – Polydispersity index
PDMS	Polidimetilsiloxano – Polydimethylsiloxane
PMMA	Polimetilmetacrilato – Polymethyl methacrylate
PMT	Tubo fotomultiplicador – Photomultiplier tube

PP	Bomba peristáltica – Peristaltic pump
PTFE	Politetrafluoroetileno (Teflón) – Polytetrafluoroethylene
PVP	Polivinilpirrolidona – Polyvinylpyrrolidone
QDs	Puntos cuánticos – Quantum dots
R	Reactor – Reactor
RALS	Dispersión de la radiación de ángulo recto – Right-angle light scattering
RB	Rodamina B – Rhodamine B
RCF	Fuerza centrífuga relativa – Relative centrifugal force
R_G	Radio geométrico – Geometric radius
rGO	Óxido de grafeno reducido – Reduced graphene oxide
R_H	Radio hidrodinámico – Hydrodynamic radius
RIU	Unidades de índice de refracción – Refractive index units
RLS	Dispersión resonante de la radiación – Resonance light scattering
ROS	Especies reactivas de oxígeno – Reactive oxygen species
R_{RMS}	Radio cuadrático medio – Root mean square radius
RRS	Dispersión Rayleigh por resonancia – Resonance Rayleigh scattering
RSD	Desviación estándar relativa – Relative standard deviation
RSE	Evaporación rápida de disolvente – Rapid solvent evaporation
RSE	Espectroscopía de resonancia de spin electrónico – Electronic
SAM	Monocapa autoensamblada – Self-assembled monolayer
SDS	Dodecilsulfato sódico – Sodium dodecyl sulphate

SDS	Sistema de impusión de jeringas – Syringe driven system
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaños – Size exclusion chromatography
SELEX	Evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial – Systematic evolution of ligands by exponential enrichment
SEM	Microscopía electrónica de barrido – Scanning electron microscopy
SERS	Dispersión Raman aumentada en superficie – Surface enhanced Raman scattering
SF4	Fraccionamiento en flujo por campo de flujo simétrico – Symmetric flow field flow fractionation
SFA	Análisis de flujo segmentado – Segmented flow analysis
SIA	Análisis de inyección secuencial – Sequential injection system
SLNs	Nanopartículas lipídicas sólidas – Solid lipid nanoparticles
SLS	Dispersión de luz estática – Static light scatterings
SPE	Extracción en fase sólida – Solid phase extraction
SPR	Resonancia del plasmón superficial – Surface plasmon resonance
SUV	Vesícula unilamelar pequeña – Small unilamellar vesicle
TAAB	Resina Epon 812 – Epon 812 resin
TEM	Microscopía electrónica de transmisión – Transmission electron microscopy
ThFFF	Fraccionamiento en flujo por campo térmico – Thermal field flow fractionation

Tris-HCl	Disolución reguladora de hidrocloreuro de Tris(hidroximetil)aminometano – Tris(hydroxymethyl)amino methane hydrochloride buffer
UV-vis	Ultravioleta/visible – Ultraviolet/visible
v/v	volumen/volumen – volume/volume
w	Desecho – Waste
w/v	peso/volumen – weight/volume
XPS	Espectroscopía de rayos X – X-ray spectroscopy
ϵ	Absortividad molar – Molar absorptivity
μTAS	Sistema de microanálisis total – Total microanalysis system
Φ_f	Rendimiento cuántico – Quantum yield

OBJETO



AIM



El *objetivo genérico* de las investigaciones que se recogen en esta Memoria ha sido la innovación nanotecnológica en el desarrollo de nuevas plataformas analíticas separativas y/o determinativas para la evaluación de la seguridad agroalimentaria. Los estudios realizados se han centrado en la síntesis, separación y caracterización de los nanomateriales utilizados en el desarrollo de plataformas analíticas separativas y/o determinativas con aplicación de determinación de residuos de antibióticos aminoglucósidos en alimentos. Para alcanzar este *objetivo genérico*, se han desarrollado los siguientes *objetivos específicos*:

- Síntesis, separación y caracterización de los materiales usados en el diseño de los sistemas dinámicos de análisis, así como de las nanoestructuras usadas con distinta funcionalidad dentro de los procesos analíticos llevados a cabo.
- Desarrollo de plataformas analíticas separativas y/o determinativas con el uso de nanomateriales híbridos y acoplamiento de dispositivos electrónicos miniaturizados con sistemas dinámicos convencionales o con integración de dispositivos microfluídicos en el propio instrumento de medida.
- Aplicación de plataformas analíticas macro/microfluídicas para la determinación de antibióticos aminoglucósidos como modelo de compuestos tipificados como xenobióticos en alimentos para la evaluación de la seguridad agroalimentaria.

También se persigue la realización de un *objetivo final* en el desarrollo de la Tesis Doctoral, que supone la formación de la doctoranda en diversos ámbitos transversales. Por tanto, se ha incidido en la realización de actividades complementarias a la labor investigadora, tales como la asistencia a cursos

formativos, la presentación de comunicaciones a congresos y la participación en actividades de divulgación científica.

The *generic objective* of the research included in this Thesis Book has been the nanotechnological innovation in the development of new separative and/or determinative analytical platforms for evaluating agri-food safety. Therefore, the studies carried out have been focused on the synthesis, separation, and characterization of the nanomaterials used in the development of separative and/or determinative analytical platforms applied to the determination of aminoglycoside antibiotic residues in food. The following *specific objectives* have been developed to achieve this *generic objective*:

- Synthesis, separation, and characterization of the materials used in the analytical dynamic system design and the nanostructures used with different functions within the analytical processes carried out.
- Development of separative and/or analytical platforms using hybrid nanomaterials and coupling miniaturized electronic devices with conventional dynamic systems or microfluidic devices into the detector itself.
- Application of the macro/microfluidic analytical platforms to determine aminoglycoside antibiotic residues as xenobiotic compounds models in food for the evaluation of agri-food safety.

The achievement of a *final objective* is also pursued in developing a Doctoral Thesis, supposing the doctoral student training in diverse transversal fields. Therefore, the formation of the Ph.D. student by carrying out complementary activities to the research work, such as attending training courses, presenting communications to conferences, and participating in scientific dissemination activities, has also impacted.

INTRODUCCIÓN



Como introducción a las investigaciones que se presentan en esta Memoria, se comentan algunos aspectos básicos relacionados con los materiales y las herramientas metodológicas e instrumentales utilizadas, así como los analitos estudiados. En esta Memoria se ha abordado el desarrollo de plataformas analíticas separativas y/o determinativas basadas en el uso de nanomateriales (NMs) y la integración de sistemas dinámicos, ya sean convencionales o aquellos que operan a escala microfluídica. Para ello se han implementado diferentes estrategias para separación y monitorización de nanomateriales que han sido previamente sintetizados. Finalmente se proponen plataformas analíticas determinativas con aplicación en el ámbito de la seguridad agroalimentaria, orientadas a la determinación de residuos de antibióticos aminoglucósidos en alimentos, los cuales están catalogados como compuestos xenobióticos en la legislación europea [1]. Las investigaciones realizadas han incidido en tres líneas principales que, a su vez, tienen una relación transversal y en las que se ha seguido de forma simultánea. Estas líneas son: (a) Desarrollo de diferentes procedimientos de síntesis de NMs y empleo de plataformas analíticas separativas de estos materiales; (b) Propuesta de plataformas analíticas determinativas desarrolladas de forma continua a escala micrométrica; y (c) Aplicación de sistemas (bio)sensores basados en las plataformas determinativas con uso de NMs para la determinación de residuos de antibióticos aminoglucósidos en alimentos. Una de ellas se fundamenta en el uso de un aptámero inmovilizado en grafeno y así obtener un biosensor selectivo para la determinación de kanamicina en alimentos. La segunda aplicación se fundamenta en el empleo de un sistema de amplificación basado en el uso de magnetoliposomas (MLs) como contenedores analíticos en sistemas microfluídicos integrados.

Debido a la preocupación por la salud pública y el bienestar de los consumidores, ha sido necesario incorporar un control analítico de los niveles de xenobióticos (aditivos, residuos y contaminantes) en productos alimentarios en el ámbito legislativo. En ese sentido, es necesario tener en cuenta que ciertos residuos son procedentes de fármacos de uso veterinarios suministrados a animales dedicados al consumo humano y, por tanto, es conveniente conocer la cadena de transmisión que sufren estos medicamentos de uso veterinario hasta su potencial aparición en forma de residuos en alimentos de origen animal y subproductos preparados. Tal es el caso del grupo de los antibióticos aminoglucósidos, cuyo uso es habitual en sanidad animal, pero la forma de uso y los niveles de concentración permitidos para el consumo de estos alimentos está regulado en la legislación europea. Esta regulación condiciona que la propuesta de nuevos métodos de análisis esté obligada a presentar unas características analíticas acordes con los niveles de concentración con que estos residuos pueden aparecer en los alimentos. Deben ser metodologías con una capacidad de respuesta lo suficientemente baja y fiable como para alcanzar las bajas concentraciones con las que se pueden encontrar estos residuos en las muestras analizadas y obviar la complejidad de estas muestras.

En esta introducción se describen diversos aspectos relacionados con las herramientas metodológicas e instrumentales utilizadas en el desarrollo de los métodos propuestos, así como con las especies químicas que se han empleado como analitos. Teniendo en cuenta el contenido de la Memoria, esta introducción se ha dividido en los siguientes apartados: 1) nanomateriales en Química Analítica, 2) sistemas de separación de nanomateriales, 3) sistemas de flujo convencionales y microfluídicos, 4) técnicas instrumentales ópticas y 5) antecedentes bibliográficos de la determinación de los analitos seleccionados.

1. Nanomateriales en Química Analítica

La ciencia ha experimentado en los últimos 40 años una enorme revolución motivada en parte por la incorporación del prefijo “nano” delante de las palabras “ciencia” y “tecnología”, de forma que dan lugar a los términos Nanociencia y Nanotecnología. La característica común de ambas es el tamaño de los objetos, que están comprendidos en la llamada "escala nanométrica" con tamaños inferiores a los 100 nm. La Nanociencia tiene múltiples connotaciones relacionadas con la síntesis, análisis y manipulación de materiales a nivel atómico o molecular, donde las propiedades físicas y químicas son sustancialmente diferentes a las mostradas por el mismo material a una escala mayor (ya sea micro o macrométrica). Por otra parte, la Nanotecnología se orienta al diseño, caracterización y uso de estructuras, dispositivos y sistemas, cuya forma y tamaño se controlan a escala nanométrica. Un aspecto sustancial de la Nanociencia y la Nanotecnología es su carácter transversal y multidisciplinario, donde científicos y profesionales de diferentes áreas están directamente involucrados, por ejemplo, vinculados con la tecnología de la información y la comunicación, la biotecnología, la ciencia de los materiales, la medicina, la farmacia, la toxicología y las ciencias forenses, agroalimentarias y ambientales, así como diversos ámbitos industriales como por ejemplo textil o energético.

El asentamiento de los pilares en los que se sustenta el desarrollo de la Nanociencia y la Nanotecnología por parte de Feynman y Drexler, junto con el poderoso impulso que supuso la inclusión de los sistemas microelectromecánicos (MEMS) en la década de los 80, supusieron un desarrollo exponencial común de ambas que se convirtió en un amplio campo de investigación [2,3]. La incorporación de materiales a escala nanométrica ha introducido un nuevo escenario donde se observan cambios impresionantes en los principios, leyes y las propiedades fisicoquímicas con respecto al comportamiento de materiales a escala micro o macrométrica. Estos materiales presentan una elevada relación

superficie/volumen entre sus componentes y una diferente reactividad química en comparación con la materia a otra escala mayor. A escala nanométrica se produce una potenciación de los efectos cuánticos de la configuración orbital molecular en consonancia con los orbitales atómicos, lo que conlleva que presenten un sinfín de propiedades químicas, ópticas, eléctricas, térmicas, magnéticas, etc., únicas a esta escala nanométrica. Tales cambios han moldeado el impacto de la Nanociencia y la Nanotecnología, aportando los llamados nanomateriales (NMs), muy versátiles para uso en los diferentes campos científicos, técnicos e industriales ya comentados.

La Química Analítica también se ha visto integrada activamente en este desarrollo científico-tecnológico, y lo ha hecho desde dos puntos de vista bien diferenciados. Por un lado, considerando a los NMs como analitos, convirtiéndose en el objeto de estudio y caracterización químico-analítica. Por otro, considerando a los NMs como herramientas en el desarrollo del proceso analítico para la mejora de características analíticas, especialmente de la sensibilidad y la selectividad de los procesos de análisis [4]. Es importante conocer la información física, química y fisicoquímica de los NMs, por tanto, se deben caracterizar usando diferentes metodologías analíticas. En este caso, los NMs son contemplados como analitos. Por otro lado, las propiedades de los NMs se pueden aprovechar en cualquier etapa del proceso analítico en el desarrollo de nuevas metodologías o para mejorar las ya existentes. Este es el caso de su utilización como herramientas analíticas.

Los NMs se pueden encontrar formando diversas estructuras, tales como partículas, materiales porosos, fibras, tubos, etc., pudiendo tener un origen natural o artificial. Los NMs de origen natural pueden aparecer en el medio ambiente de forma natural como coloides, aerosoles, óxidos de metales, materiales magnéticos, etc. La síntesis artificial de nanomateriales de diferente composición, forma y utilidad siempre se ha realizado buscando la mimetización de estructuras y materiales existentes en la naturaleza y cuyos potenciales usos

y aplicaciones ya existen en la naturaleza [5]. Los procedimientos habituales para la síntesis de nanomateriales siguen dos estrategias, las conocidas como *top-down* y como *bottom-up* [6,7], esquematizadas en la **Figura 1**. La estrategia descendiente (*top-down*) persigue alcanzar un tamaño de estructura nanométrico a partir de materiales a escala macrométrica por reducción progresiva mediante el empleo, generalmente, de procesos físicos (trituración, anodización, grabado mediante bombeo de plasma o de iones o fotolitografía). Estos métodos ejercen un fuerte impacto sobre las características fisicoquímicas de la superficie de los nanomateriales formados. Por el contrario, la estrategia ascendiente (*bottom-up*) persigue la síntesis de materiales nanoestructurados a partir de átomos, moléculas o, en general, estructuras más simples usadas como precursoras. Siguiendo esta estrategia se consiguen NMs de menor tamaño, con una distribución más uniforme de tamaños y formas. Ejemplos de metodologías de síntesis *bottom-up* son la formación de moléculas autoensambladas, la precipitación química o electroquímica, los procesos de tecnología sol-gel, los métodos de síntesis hidrotermales, la pirolisis o la deposición de vapor química (CVD). Durante el desarrollo experimental de esta Memoria se han aplicado ambas estrategias para la síntesis de los NMs utilizados, entre los que cabe destacar diferentes tipos de nanopartículas (NPs), grafeno y liposomas.

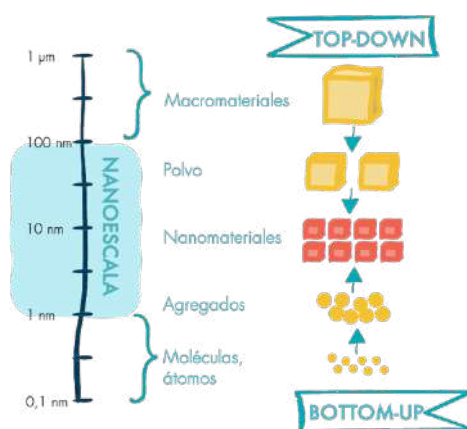


Figura 1. Esquema de las dos estrategias de síntesis empleadas en la fabricación de nanomateriales: *top-down* y *bottom-up*

La proliferación de NMs con diferente composición y características ha obligado a la comunidad científica a establecer criterios de clasificación que permitan conocer los tipos de nanomateriales, sus usos y aplicaciones, conocer sus potenciales efectos tóxicos y contaminantes así como para regular su almacenamiento y eliminación [6–8]. En la **Figura 2** se muestra un resumen esquemático de la clasificación de los nanomateriales en base a varios criterios, tales como son: su dimensionalidad, su origen, su estructura química y su homogeneidad. Teniendo en cuenta las dimensiones que estos NMs presentan dentro de la escala nanométrica se clasifican en tres tipos: a) nanoescala en una dimensión, como las superficies con un espesor nanométrico de grafeno; b) nanoescala en dos dimensiones, como los materiales en forma de nanotubos; y c) nanoescala en tres dimensiones, que incluye nanopartículas, puntos cuánticos, liposomas, etc. También según su origen, ya que los NMs se pueden originar de forma natural, a veces se puede considerar que se originan de forma incidental, o bien que hayan sido sintetizados siguiendo diferentes métodos físicos (por ejemplo, mediante la utilización de técnicas de deposición o pirolisis), químicos (mediante formación de microemulsiones o por procedimientos hidrotermales) o biológicos (mediante biogénesis con un origen vegetal o a partir de microorganismos con poder reductor). Además, también es importante poder clasificar a los NMs si estos están constituidos por un solo tipo de material o por ser una combinación de diferentes materiales. Otro criterio de clasificación se fundamenta en el estado del material, es decir, la distribución de homogeneidad y el estado de agregación. La uniformidad se relaciona con la distribución de tamaños entre NMs de la misma clase y el estado de agregación, a si el NM se encuentra disperso o formando agregados. Según la morfología, los NMs se diferencian respecto a su aspecto en las tres dimensiones, si son NMs con baja relación (esféricos, ovalados, cúbicos, etc.) y NMs con alta relación (tubulares, helicoidales, laminares, etc.).



Figura 2. Clasificación de los nanomateriales en función a diversos aspectos.

Por último, el criterio de clasificación más general se fundamenta en la naturaleza de los componentes químicos que constituyen los NMs [6], pudiéndose clasificar en:

- NMs inorgánicos, generalmente formados por metales u óxidos de metales. Los más utilizados han sido las NPs de oro (AuNPs) y de plata (AgNPs), o las NPs derivadas de los óxidos de hierro, de sílice, de zinc o el dióxido de titanio.
- NMs orgánicos, entre los que se encuentran los NMs de carbono, con diferentes tipos de estructuras: esferas (puntos de carbono), fibras (nanotubos de carbono), láminas (grafeno) o tridimensionales (fullerenos). También se deben incorporar en este apartado otros NMs orgánicos, como los liposomas, los dendrímeros, las micelas y los materiales poliméricos.
- NMs híbridos, constituidos por combinaciones de los anteriores grupos de NMs. Se pueden obtener materiales híbridos con estructuras del mismo tipo o de distinto tipo, por ejemplo, aquellos que muestran

estructuras tipo *core-shell*. Estas nanoestructuras (NEs) están formadas por distintas capas, como las NPs con núcleo magnético de hierro, rodeadas de agregaciones de AuNPs, para formar NPs híbridas $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ AuNPs de naturaleza hidrofílica o protegidas con grupos tiólicos que le confieren naturaleza hidrofóbica ($\text{Fe}_3\text{O}_4@$ AuNPs-C12SH). Estos NMs híbridos pueden también estar constituidos por estructuras heterogéneas más complejas (vesículas, liposomas, microzonas con actividad (bio)química, materiales poliméricos, etc.) en las que se pueden encapsular o incorporar diferentes grupos químicos que dotan a las NEs de diferente funcionalidad. Un ejemplo característico de estos NMs heterogéneos son los MLs.

Este criterio de clasificación es el que se va a seguir en esta introducción para comentar brevemente los NMs utilizados en el desarrollo experimental de esta Tesis Doctoral.

1.1. Nanomateriales inorgánicos

Los NMs inorgánicos forman parte del grupo más extenso utilizado en el ámbito analítico, debido principalmente a sus características intrínsecas de alta superficie específica, peso ligero, elevada fuerza mecánica y, en algunos casos, magnetismo. Las NPs de origen inorgánico cubren un amplio grupo, en las que se incluyen elementos metálicos, óxidos y sales de metales.

1.1.1. Nanopartículas metálicas

Los metales a escala nanométrica exhiben un amplio abanico de propiedades físicas, químicas, ópticas y eléctricas que difieren de las que presentan en la micro/macroescala. Dentro de las NPs metálicas, las AgNPs y las AuNPs son las que presentan una mayor aplicabilidad, en diferentes áreas. Las AgNPs suelen utilizarse en numerosos productos por su poder bactericida

[9]. Desde el punto de vista analítico, suelen aprovecharse como sustratos activos para mejorar las prestaciones de la espectroscopía Raman de superficie mejorada (SERS) [10]. También se han usado en la etapa de tratamiento de muestra como adsorbentes en extracción en fase sólida (SPE) [11].

Las AuNPs presentan una elevada área superficial, alta estabilidad y una gran biocompatibilidad, incluyendo además que son estructuras fáciles de sintetizar. Se emplean diferentes procedimientos de síntesis con diferente fundamento físico, químico o biológico. Siendo uno de los procedimientos más conocidos el método desarrollado por Turkevich y mejorado por Frens, a partir de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) en el que se sintetizan en disolución acuosa reduciendo HAuCl_4 en presencia de citrato de sodio. Otros procedimientos frecuentes utilizan otros medios reductores, con ascorbato de sodio, borohidruro de sodio, hidracina o N,N-dimetilformamida, incluso existen métodos basados en la actividad reductora de ciertos microorganismos como bacterias y hongos [7,12,13].

Dependiendo de las condiciones experimentales en las que se desarrolla el proceso de reducción (concentración de la especie reductora, tiempo y temperatura), se forman AuNPs de diferente tamaño, lo que condiciona una variación en el color de la suspensión y esto ha dado lugar al desarrollo de un gran número de aplicaciones fotométricas [14]. Esta característica de las AuNPs se debe a su banda plasmón superficial, originada por la oscilación colectiva de los electrones conductores de las NPs cuando su frecuencia coincide con la de la radiación electromagnética incidente. Este proceso origina una intensa banda de absorción, así como un aumento en la intensidad de la radiación dispersada. Esta banda plasmón depende del tamaño de las NPs, de la forma, de la distancia entre ellas y de la constante dieléctrica del medio. La agregación de las NPs provoca un aumento del tamaño y, por tanto, desplazamiento batocrómico con un cambio de color, del rojo al azul. Esta característica es útil para medidas fotométricas o de dispersión de la radiación [15]. Las AuNPs también se han

utilizado en técnicas luminiscentes y sistemas quimioluminiscentes en los que actúan como catalizadores aceptores de energía. Las excelentes propiedades mecánicas y eléctricas de estas NPs justifican su amplio uso en técnicas electroquímicas [16]. Las AuNPs, al igual que las AgNPs, también se usan como sustratos en SERS [17] o como catalizadores [18].

Por otra parte, la aplicabilidad de las AuNPs se puede extender mediante su funcionalización, aprovechando la interacción específica de los átomos de Au con el azufre de los compuesto organotiólicos, originando nanopartículas metálicas de oro con actividad superficial de carácter hidrofóbico. Ejemplo, de estas AuNPs con carácter hidrofóbico debido a su funcionalización con grupos 1-dodeciltiol [19] son las denominadas AuNPs-C12SH, que no solo cambian su capacidad de interacción polar a apolar, sino que también se facilita su dispersión en disolventes orgánicos modificando su agregación. Estas nanopartículas también se pueden funcionalizar con diferentes grupos que facilitan la unión a moléculas de alta capacidad de reconocimiento biomolecular lo que propicia la expansión de su aplicabilidad en el desarrollo de biosensores [20,21].

1.1.2. Nanopartículas de óxidos metálicos

Las NPs derivadas de óxidos metálicos son fácilmente sintetizables, presentan alta estabilidad química, térmica y mecánica, lo que ha permitido su amplio uso en áreas tales como la biomédica, la electrónica y en catálisis química, entre otras. Su capacidad catalítica también se ha aprovechado en el desarrollo de nuevos materiales semiconductores y sensores químicos. La importancia de su aplicabilidad en biomedicina se pone de manifiesto por su alta biocompatibilidad. Entre ellas cabe destacar las NPs de TiO_2 , Al_2O_3 , ZnO , ZrO_2 y de diferentes óxidos de hierro, de gran interés por sus propiedades magnéticas [22,23].

Como ya se ha comentado, las NPs de óxidos de hierro son ampliamente utilizadas en diferentes áreas, pero presentan una especial aplicación en el ámbito de la Química Analítica, por el aprovechamiento de sus propiedades magnéticas como herramientas estratégicas en diferentes partes de proceso analítico debido a que están formadas por mezclas de óxidos de hierro (II) y (III), que constituyen los componentes principales del mineral magnetita. El carácter superparamagnético de las Fe_3O_4 NPs se pone de manifiesto al aplicar un campo magnético externo, facilitando la retención magnética del material funcionalizado con estas NPs. Existen diversas variaciones de los métodos más clásicos de síntesis de Fe_3O_4 NPs. Por ejemplo, el método físico basado en la molienda de bolas de hierro a alta energía, y entre los químicos, caben destacar los procedimientos de coprecipitación de sales de hierro, el método hidrotermal, la descomposición química y la formación coloidal. Cada uno de estos métodos condicionan los tamaños obtenidos de las Fe_3O_4 NPs sintetizadas [7,12]. A parte de las aplicaciones analíticas del uso de las NPs derivadas de los óxidos de hierro ya comentadas, también es significativo su uso como sistemas de extracción y preconcentración de analitos [24]. Por último, cabe destacar también su aplicabilidad como agentes de contraste en resonancia magnética en biomedicina [25].

1.1.3. Otros nanomateriales inorgánicos

Dentro de los NMs inorgánicos ampliamente utilizados con fines analíticos, también es preciso señalar los puntos cuánticos (QDs), que son nanocristales semiconductores con una alta relación superficie-volumen con estructura 3D y tamaños comprendidos entre 1 a 10 nm. Se trata de nanocristales luminiscentes cuyos núcleos están constituidos por elementos con una distribución en la tabla periódica entre los grupos II – VI (CdSe, CdTe, CdS, ZnSe), grupo III – V (InP, InAs) o IV – VI (PbSe). Sus excepcionales propiedades ópticas, electrónicas, electroquímicas, fotofísicas, catalíticas y redox

han propiciado un extenso campo de aplicación en diferentes áreas como la biomedicina, la electrónica y la química analítica, en la que, por ejemplo, es significativa su extensa aplicabilidad en el desarrollo de (bio)sensores luminiscentes [26].

Las NPs de sílice (SiO_2NPs) son estructuras mesoporosas con un área superficial elevada y gran tamaño de poro, que le confieren una alta capacidad de adsorción, lo que las hace muy útiles como agentes extractantes en SPE, además de tener buena estabilidad química y térmica. Estas nanopartículas también son fáciles de funcionalizar, mejorando claramente su reactividad química así como su interacción hidrofóbica [4].

1.2. Nanomateriales orgánicos

Dentro de los NMs orgánicos se establecen dos grupos bien diferenciados entre estructuras cuya base es el átomo de carbono y aquellos agregados supramoleculares con contenido diverso y que podemos diferenciar en estructuras tales como micelas, vesículas y liposomas, dendrímeros y polímeros.

1.2.1. *Nanomateriales de carbono*

Los NMs de carbono presentan propiedades únicas y juegan un papel muy importante en diferentes campos interdisciplinarios. La interacción de la estructura se establece por hibridación sp^2 entre carbonos distribuidos en varias dimensiones. El carbono es un alótropo en estado sólido con varias formas, como grafito, carbono amorfo o diamante. En la escala nanométrica, las estructuras basadas en carbono muestran propiedades físicas y químicas desiguales, incluyendo conductividad, propiedades mecánicas, estabilidad térmica y química. Dentro de las estructuras de carbono se pueden encontrar los fullerenos, que presentan todas sus dimensiones en la escala nanométrica, los

nanotubos y nanocuernos de carbono, que presentan dos dimensiones dentro de la escala nanométrica, y las láminas de grafeno, con solo una dimensión a escala nanométrica.

Los fullerenos son estructuras huecas de carbono que forman agrupaciones de átomos de carbono en anillos pentagonales y hexagonales. Los más utilizados son los C_{60} . Se encuentran de forma natural en rocas de meteoritos y actualmente existen numerosos procesos de síntesis en el laboratorio. Presentan una alta afinidad electrónica, tienen una superficie hidrofóbica y tienen una alta relación superficie/volumen. Se han utilizado en diferentes aplicaciones biomédicas y químicas [27].

Las nanofibras, nanotubos y nanoconos de carbono presentan una estructura lineal, cilíndrica o cónica hueca con diámetros entre 1 y 100 nm, aunque su longitud puede alcanzar los milímetros. Estas estructuras son rígidas y resistentes, además de presentar propiedades ópticas, eléctricas y térmicas y una gran área superficial [28].

El grafeno constituye un material sólido laminar de un átomo de espesor formado por átomos de carbono que originan estructuras hexagonales. Tiene gran interés debido a sus múltiples propiedades eléctricas, mecánicas, químicas, electroquímicas, ópticas y térmicas. Se ha usado extensamente en el desarrollo de superficies receptoras de microzonas específicas y en el uso de transductores fisicoquímicos con diferente fundamento [28]. Se pueden distinguir distintos tipos de grafeno, como el grafeno laminar, el óxido de grafeno (GO) y el óxido de grafeno reducido (rGO). Para la síntesis de grafeno se pueden seguir las dos estrategias generales. Si se sigue la estrategia *top-down*, existen métodos de exfoliación mecánica [29] o aquellos basados en la síntesis de rGO a partir de GO, obtenido previamente por el método de Hummers a partir de grafito [30], y reducción posterior con hidracina [31]. Sin embargo, si se sigue la estrategia *bottom-up*, se puede obtener láminas de grafeno mediante procesos CVD, basado

en la introducción gaseosa de los precursores en la cámara de crecimiento donde, mediante aplicación de gradientes térmicos, se produce la descomposición de carbono formando radicales libres que se depositan sobre un sustrato metálico (cobre o níquel) [29]. La ventaja del grafeno obtenido por CVD es la creación de monocapas uniformes, que son más difíciles de conseguir a partir de rGO. Las estructuras de grafeno son ampliamente usadas en Química Analítica tanto como material extractante en técnicas de extracción como para desarrollar sensores, de naturaleza electroquímica u óptica [32].

1.2.2. Nanomateriales poliméricos

Los NMs poliméricos son estructuras sólidas de procedencia natural o sintetizadas en el laboratorio. Entre ellos se pueden considerar los polímeros micelares, formados por estructuras autoensambladas de monómeros con carácter anfifílico, siendo un ejemplo significativo los polímeros micelares de quitosano, usados como dispositivos para la administración controlada de fármacos. También se encuentran entre estos NMs los dendrímeros, que son NMs poliméricos contruidos mediante reacciones de adición sucesiva de capas de grupos ramificados, denominados dendrómeros. Su principal uso también ha estado en el ámbito de la disposición controlada de fármacos, gracias a las particularidades de sus estructuras, tamaños y multivalencia [8]. Finalmente, también se pueden considerar los polímeros de impresión molecular (MIPs) que son un tipo especial de adsorbentes específicamente funcionalizados para lograr el reconocimiento molecular de un compuesto químico [33].

1.2.3. Nanomateriales lipídicos

Los lípidos son compuestos cuya estructura se forma por la unión de un alcohol, como glicerol, con distintas cadenas hidrocarbonadas, por lo que presentan una parte polar y otra apolar. Entre los NMs de estructura lipídica se

distinguen tres tipos: liposomas, NPs lipídicas sólidas (SLNs) y nanoestructuras transportadoras de base lipídica (NLCs).

○ Liposomas

Los liposomas son estructuras autoensambladas formadas por bicapas de fosfolípidos, que son moléculas en las que a la molécula de glicerol se une un grupo ortofosfórico, al que se unen otras moléculas como colina o etanolamina, y dos cadenas hidrocarbonadas que pueden tener diferente longitud [34]. Los fosfolípidos se ordenan en bicapas lipídicas incluyendo una cavidad acuosa en su interior, quedando los grupos polares ordenados hacia la fase acuosa y los grupos hidrofóbicos hacia el interior de la bicapa. Se forman vesículas en las que, gracias a la diferente hidrofobicidad que presentan sus diferentes zonas, se pueden encapsular diferentes especies. En la **Figura 3** se muestra la estructura de bicapa lipídica de un liposoma.

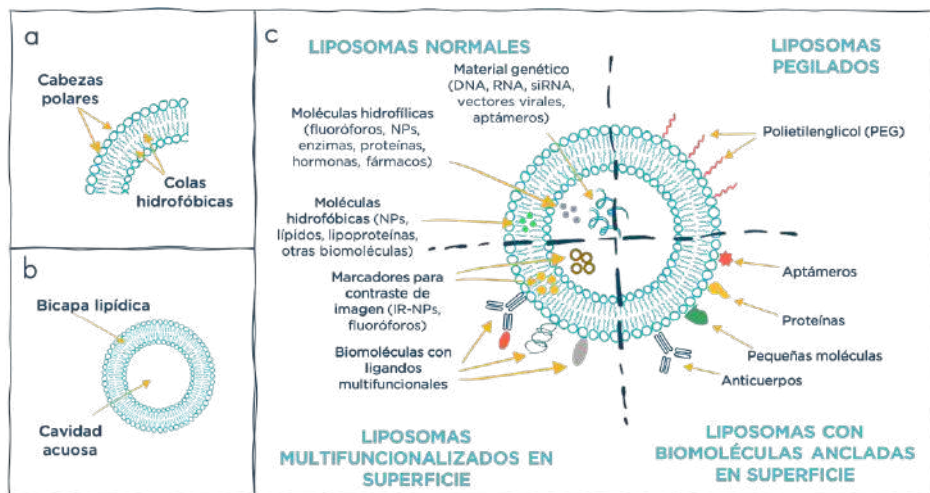


Figura 3. Estructura química de los liposomas. **a** Estructura fosfolipídica de un liposoma, **b** Naturaleza anfifílica de los liposomas y **c** Tipos de liposomas en función de las moléculas ancladas en superficie o encapsuladas. Adaptada de la referencia [36]

En esta representación también se muestran diferentes tipos de materiales a incluir en un liposoma. Se pueden atrapar compuestos liposolubles

dentro de la bicapa lipídica o encapsular en la cavidad acuosa compuestos solubles en agua. Esto les confiere una gran habilidad para encapsular compuestos o NPs de naturaleza hidrofóbica, hidrófila o anfifílica. Los liposomas ofrecen una gran utilidad como reactivos analíticos debido a su gran área superficial, su gran volumen interno y su habilidad de conjugar bicapas lipídicas con una gran variedad de elementos de biorreconocimiento. Por ello, los liposomas se han utilizado en sistemas de administración de fármacos o reactivos y en sensores, ya que favorecen la protección y el transporte de sustancias hasta la zona necesaria, ya sea el órgano diana o la zona de reacción de un sistema de flujo. Además, también pueden mejorar propiedades analíticas, ya que permiten amplificación de la señal, mejorando la sensibilidad de métodos determinativos [35].

Los liposomas pueden ser de distintos tipos, incluyendo una o más bicapas, como se observa en la **Figura 4**. Según su estructura se pueden clasificar en vesículas con una sola bicapa como vesículas unilamelares pequeñas (SUVs) de 25 a 50 nm, grandes (LUVs) de 0,1 a 1 μm y gigantes (GUVs) de 1 a 200 μm , vesículas multilamelares (MLVs) son vesículas con más de una bicapa con un tamaño de 0,1 a 15 μm , además de vesículas formadas por vesículas más pequeñas, que son vesículas multivesiculares (MVVs), de 1,6 a 10,5 μm [36].

Además de fosfolípidos, en la bicapa lipídica se pueden anclar otras moléculas, como colesterol, que les confieren más estabilidad. Los liposomas pueden sintetizarse con diversos métodos, como el método de hidratación de capa fina, el método de evaporación de fase inversa, el método de inyección de disolvente, la eliminación de detergente, etc. La mayoría conllevan disolver los fosfolípidos en un disolvente orgánico volátil, el cual hay que retirar al finalizar la síntesis, sometiendo el resultado obtenido a un proceso de separación y purificación. Con este tipo de síntesis, lo común es encontrar MLVs, por lo que si se quieren obtener otras estructuras se deben someter a procesos de modificación de su tamaño, como sonicación, extrusión u homogeneización

[36,37]. El tipo de liposoma obtenido depende del tratamiento mecánico y la temperatura de formación.

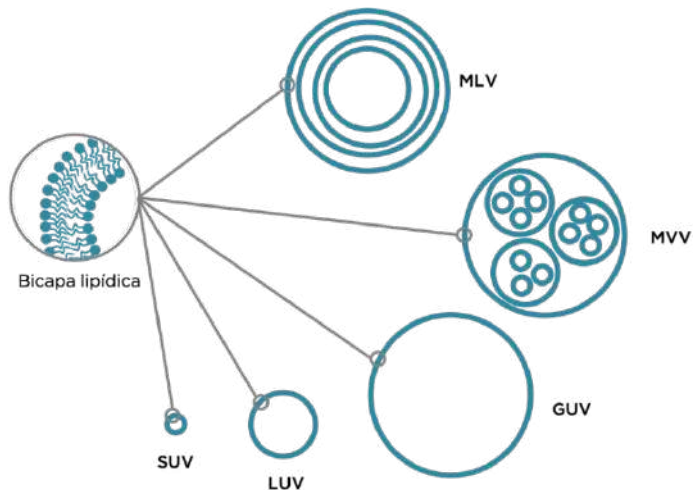


Figura 4. Estructura de la bicapa lipídica y tipos de liposomas: MLV, vesícula multilaminar; MVV, vesícula multivesicular; GUV, vesícula unilamellar gigante; LUV, vesícula unilamellar grande; SUV, vesícula unilamellar pequeña. Adaptada de la referencia [36]

En las distintas partes del liposoma se pueden retener diferentes moléculas. Estas moléculas pueden anclarse en la superficie de la bicapa o quedar retenidas en el interior de ellos, ya sea dentro de la bicapa lipídica o dentro de la cavidad acuosa, según su naturaleza. Por ello, en los métodos analíticos en los que se usan los liposomas, pueden quedar intactos, ya que las moléculas quedan en su superficie, o puede que sea necesario romper el liposoma para liberar el contenido encapsulado y así favorecer la interacción entre reactivos [38,39]. La rotura de los liposomas puede llevarse a cabo de diversas maneras, como puede ser la adición de sustancias o un cambio en las condiciones del medio, como puede ser el pH, la temperatura, el campo magnético, la luz o someter a ultrasonidos [40]. Las sustancias que se pueden añadir son disolventes o surfactantes, enzimas como fosfolipasa C o tripsina, o agentes de lisis celular naturales [38].

○ Otros NMs de base lipídica

Los otros dos tipos de NMs de base lipídica que se comentan en esta sección (SLNs y NLCs), surgieron como alternativa en la síntesis a mayor escala de los liposomas. Ambos tipos de NMs han recibido una especial atención como sistemas de liberación controlada de fármacos por su mayor efectividad en el proceso de distribución y liberación, en comparación con la actividad de los liposomas. Por el contrario, estas NMs alternativas presentan menor capacidad de carga como vehículos de distribución de fármacos, y además presentan problemas derivados de la cristalización de los materiales encapsulados durante los procesos de almacenamiento.

Las NPs lipídicas sólidas (SLNs) son emulsiones en fase acuosa de lípidos con la particularidad de que se diferencian de otras emulsiones acuosas de lípidos porque en ellas los componentes lipídicos se encuentran en estado sólido, en vez de mantenerse en estado líquido. Generalmente son NPs lipídicas en estado sólido formadas por triglicéridos, ácidos grasos y ceras [8,41].

Las nanoestructuras de base lipídica transportadoras (NLCs) surgieron a partir de mezclas en las que se unen lípidos en ambos estados líquido/sólido formando dispositivos tridimensionales que mejoran la eficacia de encapsulamiento [8,41].

1.3. Nanomateriales híbridos

Los NMs híbridos resultan de la combinación de dos o más tipos de nanocomponentes individuales, pudiendo unirse NMs inorgánicos y orgánicos indistintamente. Mediante esta hibridación, se persigue aunar en un mismo NM las propiedades de cada uno de los materiales por separado. Incluso, en determinadas situaciones, se pueden conseguir nuevos NMs en los que los efectos de las propiedades individuales se puedan ver potenciadas. Por ejemplo, en sistemas de liberación controlada de fármacos, el efecto protector que ejerce

el NM híbrido es significativo respecto a posibles fenómenos de descomposición química o agregación de NPs inorgánicas cuando estas se recubren con materiales poliméricos, proporcionando estabilidad, incremento de su biocompatibilidad y disminución de su potencial toxicidad, así como un mayor tiempo de distribución del NM en un entorno más protegido [42].

Una de las formas más habituales de generar NMs híbridos consiste en la adsorción física de diferentes materiales a escala nanométrica unos sobre otros. Sin embargo el procedimiento que ofrece un mayor control sobre la síntesis de NMs híbridos es mediante unión covalente, incidiendo sobre posibles modificaciones químicas y estructurales [42]. Se han descrito diferentes procedimientos para la síntesis covalente de NMs híbridos [43]:

- Mediante síntesis secuencial a partir de un material precursor que mantiene unida la estructura del NM.
- Mediante procesos de síntesis paralela y unión posterior para formar NMs híbridos compuestos por diferentes fases, que a su vez pueden unirse de forma aleatoria o en capas bien diferenciadas.

1.3.1. Nanopartículas híbridas

Según sea el proceso de síntesis de las NPs híbridas se diferencian tres tipos de estructuras [44]:

- NPs obtenidas por mezclas aleatorias en toda su estructura y que se originan por síntesis paralela en varias fases, en las que los componentes se mezclan aleatoriamente en toda la estructura. El ejemplo más característico de este tipo constituye la síntesis de NPs metálicas de Au/Ag recubiertas con NPs magnéticas. Este tipo de NPs se han utilizado en la mejora de la técnica SERS [45].

- NPs sintetizadas por capas de forma paralela, comúnmente denominadas NPs Janus (con forma de mancuerna), en las que dos unidades de NPs comparten una interfase común. Esta estructura de heterounión facilita su separación de fases.
- NPs tipo *core-shell*, que consisten en la formación de las estructuras en capas concéntricas de materiales diferenciados, formadas mediante síntesis secuencial. Las NPs presentan un núcleo, generalmente metálico, en el que alrededor se ordenan capas de diferentes materiales, que pueden ser otros nanomateriales u otros reactivos químicamente unidos. Un ejemplo, común de este tipo de NPs híbridas lo constituyen las estructuras *core-shell* formadas por la unión de NPs de magnetita sobre la que se forman capas de AuNPs y que a su vez se modifican químicamente, por ejemplo, con derivados tiólicos con cadenas hidrocarbonadas para originar nanoestructuras híbridas con carácter hidrofóbico. Estas NEs aúnan en una misma partícula a escala nanométrica las características ópticas, magnéticas e hidrofóbicas, que presentan los NMs por separado [46].

Una demanda creciente en este tipo de NPs multifuncionalizadas ha dado lugar a la formación de nuevas estructuras complejas formadas a su vez por la unión de varios de estos tipos. Por ejemplo, estructuras *multicore-shell* en las que los núcleos se forman a partir de NPs Janus y se rodean en capas “de cebolla”.

1.3.2. *Liposomas híbridos*

Los liposomas constituyen el grupo de NMs híbridos con mayor capacidad de retención de otros materiales y esto dota a estas estructuras supramoleculares de capacidades multifuncionales. Como ya se ha comentado, su naturaleza vesicular constituida por bicapas lipídicas posibilita el encapsulamiento de compuestos de naturaleza hidrofílica, hidrofóbica y

anfílica, lo que permite un alojamiento orientado en sus diferentes zonas estructurales. Así, por ejemplo, se pueden encapsular compuestos hidrofílicos en su cavidad acuosa, actuando como contenedores que facilitan su transporte y conservación en diferentes medios en los que se usan. Igual ocurre con compuestos hidrofóbicos, que se localizan entre las bicapas lipídicas y que facilitan una localización más selectiva de estas estructuras. Desde de la síntesis de liposomas híbridos, la incorporación de nanopartículas, especialmente de origen metálico, dentro de liposomas supone dotar a estas NEs híbridas de una mayor funcionalidad. Tal es el caso de incluir AuNPs (hidrofílicas o funcionalizadas para conferirles hidrofobicidad), y así utilizar los liposomas como dispositivos de almacenamiento y preconcentración, para después ser usados como sistemas de amplificación de la señal del plasmón de resonancia superficial de las NPs [19]. También, la inclusión de NPs magnéticas dentro de los liposomas originando MLs facilita una potencial retención magnética del liposoma en la zona adecuada, por lo que son de gran utilidad en biomedicina para el diagnóstico, tratamiento y teragnosis de enfermedades, como agentes de contraste, de magnetoterapia y para la administración selectiva de fármacos [47,48].

Desde el punto de vista analítico, los MLs híbridos formados a partir de vesículas lipídicas con inclusión de Fe_3O_4 @AuNPs-C12SH y el encapsulamiento de diversos materiales (cromóforos, fluoróforos, enzimas y otras moléculas) permiten expandir el ámbito de aplicación dentro de las diferentes etapas del proceso analítico, ya que su versatilidad permite su uso como contenedores de reactivos capaces de proteger y trasladar su contenido hasta la zona de reacción/detección facilitando el desarrollo de las reacciones analíticas y actuar como amplificador de la señal instrumental [49–51].

2. Sistemas de separación de nanomateriales

Los diferentes nanomateriales sintetizados presentan características comunes, entre las que caben destacar su polidispersidad en las formas y los tamaños de sus estructuras. Debido a esto, después del proceso de síntesis es habitual implementar metodologías de separación y purificación de los NMs que se utilizan en diferentes etapas del proceso analítico. La obtención final de suspensiones de NMs homogéneas es necesaria, ya que, tanto sus propiedades físicas y químicas, como su potencial aplicabilidad analítica dependen en gran medida de la homogeneidad en su composición, sus dimensiones y su forma. El desarrollo de metodologías de separación y purificación post-síntesis de NMs constituyen etapas adicionales que contribuyen a mejorar su potencial aplicabilidad analítica. En general, todo procedimiento de separación de NMs debe ser económico, rápido y de fácil obtención de los NMs al tamaño adecuado para su uso [52].

Las metodologías desarrolladas para la separación de NMs hasta la fecha se han fundamentado en la aplicación de diferentes tipos de fuerzas separativas con distinto fundamento físico y mecánico (tamaño molecular, densidad de partícula, comportamiento frente a la aplicación de campos eléctricos, o magnéticos, etc.). Dentro de ellos se diferencian técnicas entre las que incluyen metodologías cromatográficas y no cromatográficas. Aunque se presentarán aspectos básicos de algunas de ellas, al final de esta sección se comentan las dos técnicas utilizadas: centrifugación en gradiente de densidad y fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF4), dada la importancia que tienen en el desarrollo de esta Memoria. Ambas técnicas aúnan la doble característica de posibilitar la separación de NMs según su tamaño y según sus propiedades derivadas de su composición química y/o estructural.

2.1. Métodos de separación cromatográficos

Dentro de las técnicas de separación cromatográficas aplicadas a la separación de NMs se encuentran la cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) y la cromatografía hidrodinámica (HDC). La técnica SEC se ha aplicado a la separación de diferentes materiales según su tamaño, su forma y, por tanto, su volumen hidrodinámico. La capacidad de separación de estos NMs está condicionada por la naturaleza del gel poroso que constituye la fase estacionaria y su habilidad de fraccionamiento, diferenciada entre los volúmenes de exclusión y de permeación. De esta forma, los NMs más pequeños sufren una mayor permeación por la estructura porosa de la fase estacionaria, estableciéndose un orden de separación en función de su tamaño, hasta alcanzar la exclusión de los NMs más grandes [53]. Sin embargo, esta técnica presenta algunas limitaciones debidas a la posible retención irreversible de NMs de muy pequeño tamaño o de residuos derivados del proceso de síntesis, o a la potencial degradación de ciertos materiales [54]. La técnica SEC también se ha utilizado para la separación de liposomas en base a sus tamaños relativos y/o polidispersidad. Otra aplicación de este tipo de cromatografía se ha utilizado para evaluar la capacidad de encapsulamiento durante la síntesis y para realizar estudios de estabilidad respecto a los procesos de agregación o interacción entre liposomas, así como estudios de permeabilización de la bicapa lipídica [55,56].

La separación de NMs mediante HDC se ha llevado a cabo tanto en sistemas con columnas abiertas y estrechas (capilares) como en columnas cerradas con fases estacionarias no porosas donde se crean rutas o caminos capilares tortuosos, cuyo efecto resultante es similar al mecanismo de exclusión molecular. En HDC los analitos también se eluyen en razón a la diferentes velocidad de desplazamiento a través de la columna cromatográfica [57,58].

2.2. Métodos de separación electroforéticos

La separación electroforética de NMs se fundamenta en la distinta velocidad de desplazamiento de estos cuando se aplica un campo eléctrico establecido a tal efecto y ocurre en razón a su carga, tamaño y forma. Obviamente, las posibilidades de separación electroforética mejoran con la modificación de su superficie, ya sea por fenómenos de adsorción de especies iónicas o por hibridación de NMs. Las dos modalidades más usadas de electroforesis capilar han sido la electroforesis en gel (GE) y el enfoque isoeléctrico (IEF). Por ejemplo, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) se han separado complejos de AgNPs con glutatión [59], o también se han separado AgNPs de diferentes formas y tamaños (esferas, triángulos y cilindros) mediante GE con gel de agarosa en las que el tamaño de poro del gel ha facilitado una adecuada separación de las NPs en función de su tamaño y forma [60]. También la diferente movilidad electroforética de NMs en base a su distinta carga superficial permite la separación de NPs de igual tamaño [61] e incluso se ha usado para realizar estudios de la eficacia de encapsulamiento posterior a la síntesis de liposomas [62]. En 2010, Pyell muestra diferentes aplicaciones de la CE para la separación de NPs y NPs híbridas según diferencias de tamaño y/o potencial Z, así como para la determinación de parámetros fisicoquímicos característicos de esas poblaciones de NPs [63].

2.3. Métodos de separación magnetoforéticos

En el caso de NMs con propiedades magnéticas, se han descrito dos metodologías de separación con fundamento magnetoforético, que suponen la separación del material en base a la diferente velocidad de desplazamiento que alcanzan estos NMs cuando se establece un campo magnético en el sistema hidrodinámico que contiene a estos materiales. La separación magnética de alto gradiente (HGMS), que se utiliza para separar NMs magnéticos en fluidos no magnéticos [64], o la cromatografía magnética [65,66]. Ambas son técnicas

hidrodinámicas, en las que la muestra se hace pasar por una columna. Los sistemas HGMS consisten en una columna empaquetada por un lecho de hilos con alta susceptibilidad magnética colocados dentro de un electroimán. Al aplicar un campo eléctrico, el electroimán genera un gradiente magnético homogéneo en la columna, atrayendo a los compuestos magnéticos hacia su superficie y condicionando la velocidad de desplazamiento de estos. En la segunda metodología, la cromatografía magnética, se rellena una columna con perlas de acero inoxidable magnetizable y se rodea con una bobina electromagnética, por lo que la separación se consigue por aplicación de un campo magnético externo. Ambas modalidades presentan limitaciones debidas a posibles pérdidas por retenciones de tipo mecánico de materiales presentes en las muestras, además de ser útiles solo para la separación de NMs magnéticos.

2.4. Separación de NMs por métodos físicos

También se han aplicado otras técnicas basadas en fundamentos físicos para separar NMs, más económicas y de fácil manejo. Ejemplo de ellas son la filtración a través de membranas, la ultrafiltración, la diálisis y la centrifugación directa. Estas técnicas de separación más inespecíficas se han utilizado para llevar a cabo una primera separación de los residuos resultantes de la síntesis de estos NMs recién preparados.

- La diálisis es una técnica en la que componentes de menor peso molecular son capaces de atravesar una membrana semipermeable en razón al gradiente de difusión, con la única restricción del tamaño de poro de la membrana. Es una técnica que necesita un tiempo de ejecución elevado (12–48 h) y además no es útil para la discriminación por tamaño de NMs, solo se separan conjuntamente todos aquellos que son capaces de atravesar la membrana [61].

- La ultrafiltración es un método clásico que se aplica a la separación de NMs. También está basada en la separación por tamaños, en la que la muestra se hace pasar por un material con tamaños de poro definidos y el proceso se desarrolla en un tiempo mucho menor que la diálisis [67]. Al igual que otras metodologías basadas en la separación a través de un filtro o membrana, no se consigue una separación eficiente de los NMs de diferentes tamaños.

Debido a que se tratan de procedimientos simples y que no necesitan adición de otros agentes separadores, la filtración por membrana y la ultrafiltración han sido utilizadas como primera herramienta en la separación de NMs. Por otra parte, ambas son metodologías que conllevan etapas de limpieza y regeneración como consecuencia de posibles obturaciones de los dispositivos que contienen los materiales porosos. Como ya se ha comentado, son de gran utilidad para la eliminación previas de exceso de reactivos utilizados en los procesos de síntesis, que la propia separación de los NMs. [61,68].

2.5. Métodos de centrifugación en gradiente de densidad

La centrifugación en gradiente de densidad está ampliamente empleada como método de separación de biomoléculas y, en la actualidad, también presenta un gran potencial para la separación de diferentes tipos de NMs. Brevemente, se basa en la creación de un gradiente de densidad en un tubo de centrifugación por colocación secuencial en capas de disoluciones de densidad creciente, en las que las muestras que contienen los materiales a separar se adicionan al principio del medio en el que se ha creado el gradiente de densidad y se someten a centrifugación. Debido a que los NMs a separar difieren en tamaño, forma y densidad, una vez desarrollado el proceso de centrifugación, los materiales se distribuyen a lo largo de las capas del gradiente de densidad en función a sus desigual coeficiente de sedimentación o de su velocidad de sedimentación [61]. Los diferentes NMs se desplazan a lo largo del medio de centrifugación hasta que el coeficiente de sedimentación o la velocidad de

sedimentación, de cada NM se iguala con los valores de coeficiente de sedimentación, o de velocidad de sedimentación, correspondientes de cada capa preformada del gradiente en el tubo. La clave de la separación es la capacidad de igualar alguno de los dos parámetros, coeficiente de sedimentación o velocidad de sedimentación entre el NM y la capa de gradiente de sedimentación donde quede tras la separación. Este equilibrio de centrifugación entre las fuerzas de flotación y de sedimentación siempre se establece en igualdad de condiciones de viscosidad del medio o de fuerza gravitacional aplicada. En general, si los NMs tienen un tamaño superior a 5 μm sedimentan únicamente debido a la fuerza de la gravedad y se pueden separar por técnicas de filtración simples, pero si el tamaño es menor, están sometidas a un movimiento Browniano, por lo que necesitan la aplicación de una fuerza gravitatoria mayor y se necesita aplicar una fuerza centrífuga adicional.

Dentro de la centrifugación en gradiente existen dos variantes, la centrifugación isopícnica y la centrifugación zonal [69]. En la **Figura 5** se puede observar un esquema del fundamento de cada modalidad. En la centrifugación isopícnica, también llamada separación flotante o de equilibrio, la separación de los NMs se produce solo cuando se alcanza el equilibrio de densidad entre las capas del gradiente, por lo que esta debe estar comprendida entre la zona de densidad inferior y superior del gradiente. Cada uno de los NMs sedimentan en la zona del tubo de centrifugación en el que su densidad iguala a la de esa zona del gradiente (posición de equilibrio) y tiempos de centrifugación elevados no afectan a la posición de los materiales separados. La densidad de las biomoléculas varía con la presión osmótica, lo que supone que la separación isopícnica depende del medio usado para crear el gradiente. El uso de un gradiente continuo podría ser más apropiado con fines analíticos, pero las técnicas preparativas comúnmente usan un gradiente discontinuo en el que las partículas se agrupan en la interfaz entre las capas del gradiente.

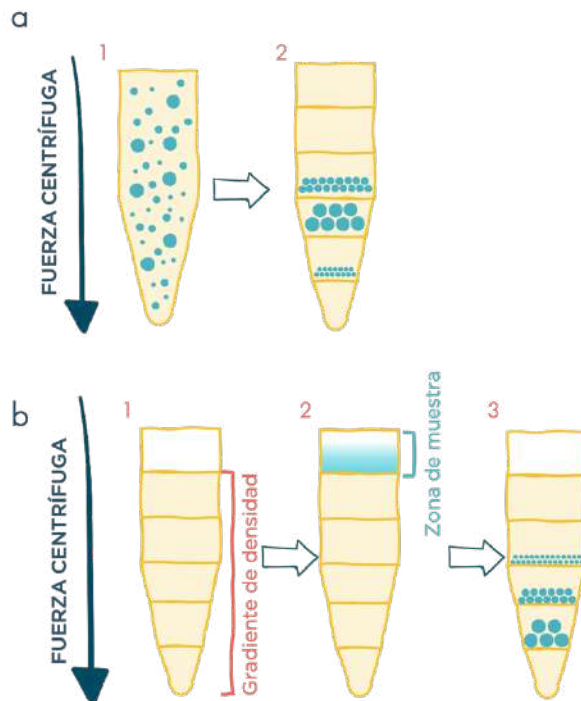


Figura 5. Esquema del fundamento de las dos modalidades de centrifugación en gradiente de densidad. **a** Centrifugación isopícnica y **b** centrifugación zonal

Con la centrifugación zonal, la muestra tiene una densidad mayor a la del gradiente y los materiales se separan debido a su tamaño, su forma y su densidad. En contraste con la centrifugación isopícnica, la centrifugación zonal se completa en un menor tiempo y debe acabar antes de que los materiales alcancen el fondo del tubo de separación. Por otra parte, los problemas derivados de sedimentación conjunta de NMs que provocan una contaminación cruzada entre partículas que tienen distintas velocidades de sedimentación puede minimizarse disminuyendo el volumen de muestra añadida sobre el gradiente. La velocidad a la cual las partículas sedimentan depende de su tamaño y masa, más que de su densidad. Independientemente de la metodología utilizada, las fracciones con los materiales deben ser recolectadas mediante aspiración de la zona de densidad correspondiente al gradiente donde se encuentran los NMs separados. A su vez, estas fracciones pueden ser purificadas

usando varios ciclos de centrifugación-redispersión con los disolventes adecuados.

La composición y del perfil del gradiente de separación adecuado es una designación importante que condiciona el resultado de la separación de los NMs mediante centrifugación en gradiente de densidad. Se puede optar por establecer adicionalmente un gradiente de viscosidad como alternativa, como por ejemplo con disoluciones de polivinilpirrolidona (PVP) con diferente viscosidad pero con densidades parecidas en todas las capas del gradiente para la separación de AuNPs [70]. Sin embargo, lo más habitual es utilizar un medio en el que se define un gradiente de densidad. Este gradiente debe tener un intervalo de densidad acorde con los NMs a separar, en el que se ajusten parámetros como la viscosidad, el pH y la fuerza iónica del medio, para que sea compatibles con los materiales que se quieren separar. Además, una vez realizada la separación mediante centrifugación, se deben poder separar fácilmente las fracciones para recolectar los NMs de forma adecuada.

Dentro de los materiales utilizados para la formación de gradientes de densidad, se han usado compuestos de diferente naturaleza, como por ejemplo sales de metales alcalinos (CsCl, CsSO₄, LiBr), de óxidos metálicos (TiO₂), polisacáridos (sacarosa, glucógeno, dextrano, ficoll), polialcoholes (sorbitol, glicerol), coloides derivados de la sílice (percoll) o compuestos yodados (metrizamida). Estos compuestos se han añadido individualmente o formando mezclas originando en este segundo caso las modalidades de centrifugación en gradiente multifase de densidad. Como ejemplos de centrifugación con gradientes monofase se han descrito separaciones usando un gradiente de sacarosa para la separación de AuNPs [71], de TiO₂ [72], diferentes NPs de carbono [61] y liposomas [37]. Para la separación de AuNPs también se han usado gradientes de glicerol [73] o de polietilenglicol [74]. El problema de la separación con glicerol es que en disoluciones que tengan la misma densidad que la sacarosa presentan mayor viscosidad. También se ha desarrollado un

gradiente formado por polímeros orgánicos no hidroxílicos, como el formado por ciclohexano y tetraclorometano aplicado a la separación de AuNPs, AgNPs y CdSeNPs, y que favorece su dispersión debido a la película de recubrimiento de los NMs separados [75]. Otros ejemplos separaciones de NMs mediante centrifugación en gradiente de densidad monofase formados por ficoll, CsCl o percoll [69]. El ficoll es un polímero de sacarosa de alto peso molecular sintético y el percoll consiste en una suspensión de partículas de sílice coloidal de diámetro 15-30 nm recubiertas de PVP. Tanto ficoll como percoll se han usado para la separación de células, virus y otras partículas subcelulares [76].

Como ya se ha comentado, los gradientes de separación también se pueden conformar usando más de un componente, dando lugar a la modalidad de centrifugación en gradiente multifase de densidad (MDGC). Por ejemplo, la separación con un gradiente de ficoll con el surfactante Brij 35 y poli(2-etil-2-oxazolina) para separar nanorods, nanoesferas y partículas grandes al realizar una síntesis de nanorods de oro [77].

2.6. Métodos de fraccionamiento en flujo mediante campo

El fraccionamiento en flujo mediante campo (FFF) es una técnica de separación hidrodinámica asistida por un flujo que puede ser considerada como una combinación de una técnica de campo y una cromatografía líquida, con la excepción de no necesitar fase estacionaria. Este hecho minimiza las posibles interacciones no deseadas entre las especies a separar y la fase estacionaria. Tampoco se producen modificaciones estructurales y de tamaño de los NMs separados, permitiendo además un uso menos restringido de diferentes disolventes orgánicos e inorgánicos. La columna se sustituye por un canal de fraccionamiento con forma de cinta delgada con una relación de aspecto de alta dimensión con unas dimensiones típicas de 120–350 μm de ancho, 1–2 cm de ancho y 10–90 cm de largo.

Se trata de una técnica de separación hidrodinámica aplicada fundamentalmente a la separación de macromoléculas complejas, materiales poliméricos, coloides y materiales particulados. La separación se consigue al aplicar un campo perpendicular al eje del canal de fraccionamiento. Al introducir la muestra en el canal y antes de comenzar la separación, los analitos se retienen gracias a un flujo de enfoque que retiene a los analitos en la llamada pared de acumulación y que se para cuando comienza la separación. Los materiales poseen distintos coeficientes de difusión debido a la amplia distribución de tamaños y sus propiedades fisicoquímicas, por lo que tendrán distintos tiempos de retención dentro del canal. En el interior del canal, los materiales viajan con un flujo laminar parabólico, en el que los materiales más rápidos fluyen en el centro del canal y salen antes, mientras los más lentos quedan junto a las paredes del canal y eluyen más tarde. Cuando los materiales separados salen del canal y alcanzan el detector se obtiene información sobre la distribución de tamaños u otras propiedades. Este es el modo normal de uso de esta técnica y ocurre con partículas más pequeñas de 1 μm [78].

Las separaciones realizadas con FFF dependen del tipo de campo aplicado, lo que da lugar a una variedad de técnicas de fraccionamiento en flujo, con diferente fundamento según el gradiente aplicado: térmico (ThFFF), centrífugo (CFFF), gravitacional (GFFF), eléctrico (ElFFF), magnético (MgFFF) o en flujo (F4). Dentro de esta última modalidad, también existen distintos tipos según el modo en que se aplique el flujo perpendicular, así existe la modalidad de fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo simétrico (SF4), asimétrico (AF4) y de fibra hueca (HF5).

El uso de estas técnicas de fraccionamiento de flujo también presenta algunas limitaciones en comparación con otras técnicas de separación, como que necesitan tiempos de separación mayores, no permiten distinguir partículas solas de agregados multiparticulados y el rendimiento de recuperación de los

materiales es menor. Sin embargo, se trata de una técnica con alta selectividad y gran poder de separación por tamaños.

En la **Figura 6** se muestra un esquema del sistema AF4. En la técnica de fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF4), el campo externo es una segunda fase móvil aplicada transversalmente al flujo laminar longitudinal. Este flujo perpendicular se denomina flujo cruzado (*cross-flow*) e impulsa hidrodinámicamente los componentes de la muestra hacia la pared de acumulación del canal de separación, que presenta una parte superior sólida y una parte inferior porosa cubierta por una membrana con los poros lo suficientemente pequeños como para que la muestra no salga, pero sí el *cross-flow*. La forma trapezoidal del canal permite enfocar la muestra después de la inyección, reduciendo el ensanchamiento de la banda mejorando la resolución.

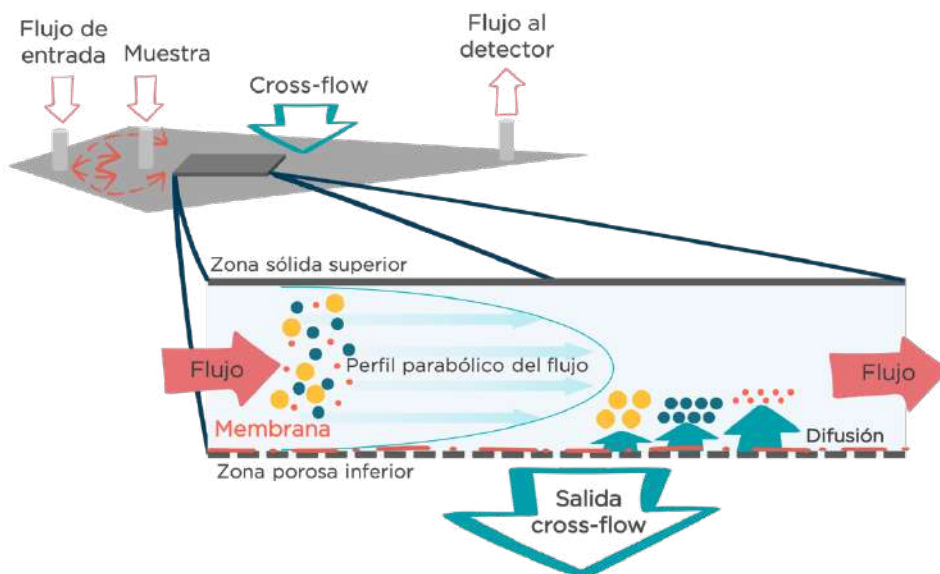


Figura 6. Esquema del canal de separación usado en la técnica AF4

En AF4, debido al perfil parabólico del flujo formado dentro del canal por la confluencia de los diferentes flujos aplicados, las partículas de diferente tamaño experimentan desiguales velocidades de desplazamiento y por tanto se

separan según sus coeficientes de difusión. El tiempo que quedan retenidas en la cámara de separación es inversamente proporcional al coeficiente de difusión hidrodinámico y , en consecuencia, directamente proporcional al tamaño hidrodinámico. Las partículas pequeñas, con un alto coeficiente de difusión, forman una nube con un perfil de concentración que se extiende hacia atrás en el canal, seguidas de las partículas más grandes, con un coeficiente de difusión más bajo.

Los factores que afectan en mayor medida a la separación son la membrana usada, el tiempo de aplicación del *cross-flow* y la composición de la fase móvil seleccionada [79]. La membrana previene que la muestra salga del canal cuando es focalizada, por lo que el valor de corte del tamaño de poro (*cut-off*), debe ser el adecuado. Además, debe estar fabricada por componentes que no provoquen retenciones o interacciones físicas con los analitos. El tiempo que el *cross-flow* está actuando es el factor principal que controla la retención de los materiales, siendo el responsable de que se obtenga una buena separación, con picos delgados sin que se solapen con el pico del disolvente (*void peak*) ni que las partículas más grandes eluyan antes de tiempo. Si el tiempo no es suficiente, la muestra no queda retenida y por tanto hay una pérdida de muestra; sin embargo, si es elevado, los materiales pueden adherirse a la membrana provocando una pérdida de muestra. La fase móvil, además de llevar la muestra a través del canal, debe asegurar la estabilidad de las partículas, por lo que su composición química y sus propiedades fisicoquímicas, como el pH y la fuerza iónica, son importantes. La técnica AF4 se ha utilizado para separar una gran variedad de NPs [79–81], pero en la actualidad se está expandiendo su uso para la separación de otros nanomateriales [82], como liposomas [83].

3. Sistemas de flujo

Las metodologías desarrolladas en esta Memoria, ya sean separativas o determinativas, tienen en común la utilización de diferentes sistemas automáticos de análisis, en su modalidad de flujo convencional o a escala microfluídica. A continuación, se realiza una breve descripción de estos sistemas y de su aplicabilidad analítica.

3.1. Sistemas de flujo convencionales

Existen diferentes modalidades de sistemas automáticos continuos de análisis según su flujo esté segmentado (SFA) o no segmentado, como el análisis en flujo continuo (CFA), de inyección en flujo (FIA) o de inyección secuencial (SIA).

Los sistemas CFA forman parte de las técnicas automáticas de análisis con flujo no segmentado, en las que las determinaciones se realizan de forma continua sin separación de las distintas zonas transportadas a lo largo del sistema. La **Figura 7** muestra una configuración general de un sistema CFA, en el que normalmente, se utilizan muestras líquidas que se introducen directamente en el sistema dinámico a través del cual son transportadas, pudiendo incluir reacciones químicas o bioquímicas y sistemas de separación y/o preconcentración. Normalmente, se utiliza un detector en continuo, provisto de una célula de flujo, para la obtención de señales transitorias con el tiempo características de la técnica [84,85].

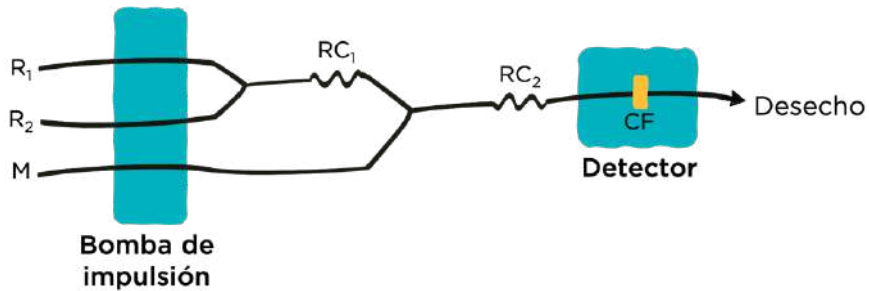


Figura 7. Esquema general de un sistema continuo de análisis (CFA). R_1 y R_2 : reactivos, M : muestra, RC_1 y RC_2 : zonas de reacción, CF : célula de flujo.

Las características más destacables de los sistemas CFA son:

- Versatilidad. El sistema debe ser modular para crear una variedad de sistemas. Por ejemplo, como una interfaz entre la toma de muestra y el detector, con intercalación de otras etapas de separación y/o reacción, con implantación de sensores químicos o de bioafinidad en flujo, o con acoplamiento con otros sistemas de separación (cromatográficos) o de detección con mayor capacidad de información (ICP-AES, ICP-MS, FTIR, MS). En todos los casos, proporcionan información analítica para el seguimiento de distintos procesos de análisis.
- Rapidez. La implementación de un sistema continuo de flujo y sus características geométricas favorecen un modo de dispersión radial en detrimento de la axial con lo que proporcionan alta capacidad de respuesta y una adecuada frecuencia de muestreo.
- Bajo coste. Suelen ser sistemas que trabajan a baja presión, lo que permite prescindir de unidades (bombas de impulsión, válvulas, etc.) de alta presión que son más costosas.
- Facilidad de automatización. Esta faceta permite una mejora sustancial de la calidad de los resultados y un aumento de la versatilidad de las metodologías analíticas a desarrollar.

Los sistemas CFA presenta esquemas simples y permiten la introducción de grandes volúmenes de muestras, presentando como ventaja adicional que el propio bolo de muestra actúa como disolución de arrastre y lavado. Tal vez, la limitación más destacada es la dificultad de introducción de las disoluciones con una mayor densidad a lo largo del sistema de flujo, que también esta condicionado por el diámetro de los tubos utilizados.

Además, los sistemas CFA desarrollados incluyen algunas particularidades que les hacen diferentes respecto a otros sistemas clásicos de flujo continuo. Es importante conocer el sistema químico y la naturaleza de las disoluciones empleadas para establecer el modo de introducción de la muestra. Por ejemplo, discernir entre la utilización de un dispositivo para la aspiración u otro para el desplazamiento de la muestra para ser conducida al detector. En este segundo caso se emplean sistemas constituidos por disolventes inmiscibles orgánico/acuoso (O/W). En la **Figura 8** se muestra un esquema de ambos modos de introducción de la muestra.

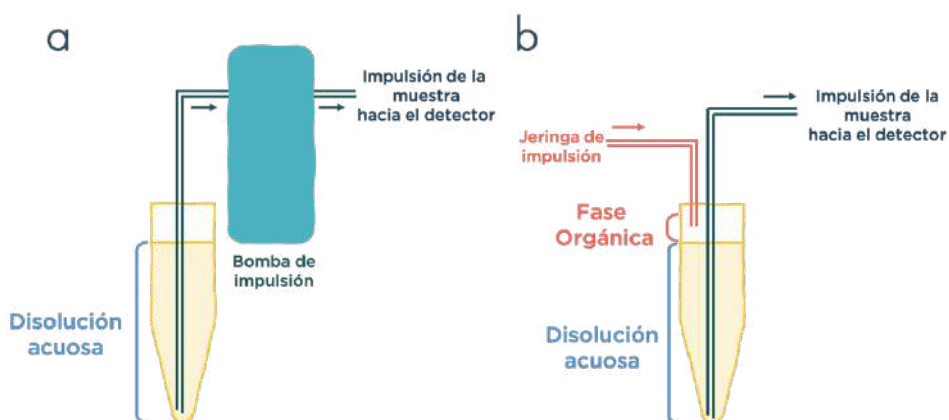


Figura 8. Modos de introducción de las muestras a un sistema CFA. **a** Dispositivo de aspiración continua mediante una bomba de impulsión. **b** Dispositivo de desplazamiento mediante un sistema bifásico O/W (las fases orgánicas y acuosas son inmiscibles). La fase orgánica de desplazamiento se inserta mediante jeringa de impulsión a alta presión.

Al igual que otras técnicas analíticas en flujo, como la cromatografía de líquidos y de gases y la electroforesis capilar, el desarrollo de los sistemas de flujo convencionales a escala macroscópica también ha evolucionado hacia la miniaturización, lo que aporta una mayor aplicabilidad en el desarrollo de nuevos métodos determinativos. Se han desarrollado sistemas de análisis de flujo continuo acoplados a detectores fotométricos para la determinación de fármacos [86] o contaminantes en núcleos de hielo de la Antártida [87], y a detectores fluorimétricos para la evaluación de la separación de poblaciones de liposomas posterior a la separación con centrifugación en gradiente de sacarosa [37].

3.2. Sistemas de flujo a escala microfluídica

Los sistemas de flujo a escala microfluídica constituyen un campo de investigación multidisciplinar basado en un cambio de paradigma, en el que se cambia la utilización de sistemas de flujo a escala macro para evolucionar a sistemas dinámicos en los que los fluidos se desplazan bajo un régimen de flujo laminar en contenedores fabricados a escala micrométrica. Todo el fundamento de la física de fluidos se ve influenciado por el desplazamiento de los fluidos y las interacciones fisicoquímicas entre reactivos y el entorno. El profesor Whitesides [88] explica que en la microfluídica se combinan los principios de la mecánica de fluidos y la electrostática para estudiar el comportamiento de pequeños volúmenes de líquidos (del orden de 10^{-9} a 10^{-18} L) que circulan por redes de microcanales (10 – 100 μm de diámetro). Para ello se aprovechan las posibilidades que ofrecen la ingeniería de microsistemas y la biotecnología para el desarrollo de estos sistemas. Todo esto conlleva que a nivel microscópico actúe la denominada “ley de la escala”, que postula que las magnitudes físicas varían con el tamaño del sistema. De esta forma, no cabe esperar un comportamiento igual en cuanto a las propiedades físicas, fisicoquímicas y químicas entre en comparación de sistemas fluídicos que funcionan a escala macrométrica con aquellos que lo hacen a escala micrométrica [88,89]. Por ejemplo, cuando dos

fuerzas están presentes en un sistema a escala micrométrica, siempre es la fuerza asociada con el exponente más débil la que llega a ser dominante en estos sistemas miniaturizados. Todos los fenómenos fisicoquímicos que tienen lugar en un sistema dinámico a escala micrométrica condicionan la viabilidad del proceso, por eso siempre es importante conocer el comportamiento fisicoquímico y de reactividad química en estos sistemas.

En microfluídica existe una serie de números adimensionales que definen el comportamiento de una mezcla de fluidos monofásicos o bifásicos (gas/líquido, líquido/líquido inmiscibles) cuando se desplazan a través de un sistema microfluídico. Son números de importancia en microfluídica por su influencia sobre las fuerzas electrodinámicas (gravedad, conductividad, electricidad y magnetismo) que condicionan el desplazamiento a escala micro. Así, por ejemplo, el número de Reynolds define el régimen de fluido. Otros ejemplos son el número capilaridad, que establece una relación directa entre la viscosidad y la tensión superficial en sistemas bifásicos; el número de Péclet, que relaciona fenómenos de convección y la difusión de los fluidos involucrados; los números de Weissenberg y Deborah, que predicen el comportamiento elástico de polímeros y macromoléculas afectando su difusión a lo largo del contenedor microfluídico; y, finalmente, los números de Grashof y Raleigh, que se relacionan con el tamaño de las macromolécula y su densidad, así como con el efecto gravitatorio microfluídico.

Todos estos números hacen que se definan las propiedades especiales de los sistemas a escala microfluídica, en los que los flujos son de tipo laminar, que minimizan los procesos de difusión y provocan una dificultad adicional de la mezcla de reactantes, las fuerzas de superficie como la capilaridad o la adhesión dominan en los equilibrios al tener una gran área superficial en relación con su volumen, y, además, la difusión y el transporte térmico se produce de forma más rápida. El flujo en los sistemas microfluídicos tiene un comportamiento laminar, lo que supone que el caudal de trabajo en estos sistemas debe ser relativamente

lento debido a que el impulso, el calor y la masa tienen que ser transportados principalmente por difusión.

Sin embargo, el interés creciente por estos sistemas es el resultado de las principales ventajas que presentan, como el bajo consumo de muestra y reactivos, la simple manipulación, la reducción del tiempo de análisis y la portabilidad. Los sistemas microfluídicos han evolucionado desde que se desarrollaron en los años 70, impulsados por el desarrollo espectacular de los MEMS, siendo el primer sistema instrumental desarrollado un cromatógrafo de gases miniaturizado microfabricado en una oblea de silicio [90]. Desde entonces, el uso de sistemas microfluídicos ha crecido considerablemente, con un mayor o menor grado de integración y se ha diversificado en diferentes áreas [88,91]. En los sistemas microfluídicos se pueden integrar en un solo chip varias etapas del proceso analítico, como la separación, reacción y detección. Gradualmente, se tiende a la integración de todos los elementos necesarios para la realización de los métodos determinativos, para así hacerlos portátiles y automáticos. La integración puede ser de pocas etapas o puede llegar a la integración total, que constituyen los conocidos como sistemas de microanálisis total (μ TAS) o los laboratorios en un chip (LOC). A veces, alcanzar la máxima integración no es fácil, por lo que se puede optar por un modelo híbrido con dispositivos interconectados.

La miniaturización de los sistemas microfluídicos no tiene por qué conllevar una reducción de la escala de los componentes que lo forman, sino la integración de una o varias etapas del proceso analítico, ya sea toma y tratamiento de muestra, inyección, separación, reacción o detección. Los elementos esenciales que debe disponer un sistema microfluídico son tres: a) dispositivos de impulsión de los microfluidos (con fundamento hidrodinámico, electrocinético o electromagnético), b) dispositivos de microcanales con diferente diseño y diferente material, según el proceso a desarrollar en su interior, y c) dispositivos instrumentales para la visualización, detección y

cuantificación que proporcionen la información necesaria sobre el proceso de análisis [92,93].

El enorme desarrollo que han alcanzado los sistemas microfluídicos en diferentes áreas de aplicación científico-técnica se debe vincular con el valor añadido que aporta el uso de la microfluídica en las áreas en las que se implanta, por las ventajas que ofrece el modo de operación a dicha escala. Entre esas ventajas se encuentran la alta relación superficial, la alta eficacia, la flexibilidad en el diseño, el ahorro en el consumo de muestras y reactivos, las facilidades inherentes a la miniaturización/automatización del proceso, el aumento en la posibilidad de procesos paralelos en concordancia con las técnicas de discriminación de alto rendimiento (HTS), la portabilidad, la alta frecuencia de muestreo y la biocompatibilidad.

Pero, también presenta inconvenientes tales como su baja sensibilidad analítica, su escasa disponibilidad comercial y su alta dependencia comercial. Su escasa sensibilidad de los métodos analíticos basados en estos sistemas se debe especialmente a los detectores ópticos utilizados. Esto es debido a que la implementación de los detectores en el chip se consigue llegando a una situación de compromiso, en la que hay que sacrificar características técnicas del detector para que se pueda incrustar en el chip microfluídico. Además, el desarrollo de estas implementaciones necesitan un proceso de fabricación con un alto nivel de desarrollo, lo que resulta en dispositivos costosos [94,95]. Por ello, se han buscado opciones en las que se puedan utilizar detectores ópticos convencionales, cuyas características técnicas sean mejores. Para ello, se ha explorado el uso de adaptaciones fuera del chip, como fibras ópticas bifurcadas que conducen la radiación desde la zona de reacción del sistema microfluídico al detector o dispositivos de alineamiento x-y-z en los que se emplaza el chip microfluídico para focalizarlo con la radiación incidente del detector [96,97]. Sin embargo, estas opciones resultan ser infraestructuras grandes, costosas y

necesitan el estudio de un gran número de variables involucradas en el correcto alineamiento de la zona de reacción con la radiación incidente del detector.

Para fabricar los dispositivos microfluídicos se han descrito distintas técnicas, la mayoría haciendo uso de la tecnología derivada de la microelectrónica. Todas las técnicas de obtención de sistemas microfluídicos tienen que resultar en procesos simples, económicos, reproducibles y que generen tamaños pequeños [98]. Muchos de los sistemas microfluídicos han sido realizados usando polidimetilsiloxano (PDMS) y litografía blanda para fabricarlos [99]. Esta técnica se basa en curar un elastómero en una superficie moldeadora con una topografía definida previamente. Sin embargo, para fabricar los sistemas con esta técnica se necesita una sala blanca, lo que conlleva que sea costoso y requiera mucho tiempo. Para superar esta limitación se han desarrollado sistemas microfluídicos con otras técnicas de fabricación, lo que ha favorecido el uso de otros materiales y formas, permitiendo así la obtención de sistemas con nuevas y ventajosas cualidades.

El uso de materiales metálicos para la fabricación de dispositivos microfluídicos es útil cuando se necesitan unas presiones o temperaturas muy elevadas, a pesar de los inconvenientes que presenta debido a su alto coste de fabricación. Muchos chips microfluídicos comerciales están hechos de materiales poliméricos, como policarbonato, polimetilmetacrilato (PMMA) o copolímero de olefina cíclica (COC). Para realizar estos chips se puede usar la fabricación por laminados poliméricos, en el que el chip se forma por apilamiento de capas de polímeros cortadas y unidas entre sí mediante diferentes técnicas para formar canales [100]. También se pueden utilizar tecnologías de moldeo de polímeros [101], como el moldeo por inyección, en el que el plástico se calienta y se introduce en un molde o el estampado en caliente, en el que el plástico se presiona sobre un molde y se aplica calor y vacío.

La tecnología de impresión 3D, con la que el resultado final ha sido modelado digitalmente para posteriormente imprimir capa a capa el polímero, ha sido muy utilizada para obtener dispositivos microfluídicos [102]. Recientemente, se han desarrollado sistemas de fabricación por el uso de nanoestructuras [103], así como construidos en tóner y en papel [104]. Mención especial merecen los sistemas microfluídicos de sílice y vidrio. La técnica de moldeado o la tecnología de impresión 3D también pueden aplicarse para la obtención de estos sistemas [105,106]. Sin embargo, los polímeros son los materiales más adecuados para la fabricación de sistemas microfluídicos a una escala industrial, debido a que no se necesitan procesos químicos adicionales para obtenerse [89]. También se ha indagado en el uso de esta tecnología de impresión 3D para obtener adaptaciones de sistemas microfluídicos con distintas etapas del proceso integradas.

Una primera aproximación supone la incorporación de dispositivos de impulsión, válvulas, y otros dispositivos con conexiones a baja presión, utilizados en los sistemas de flujo continuo con los dispositivos microfluídicos comerciales, y adaptación también a los sistemas de detección. Un esquema de una configuración básica de estos modelos de integración se muestra en la **Figura 9**. Los sistemas de impulsión utilizados deben adecuarse al bajo caudal necesario, por lo que se emplean sistemas de impulsión de jeringa que presentan caudales de impulsión más adecuados. No obstante, a veces se originan mayores presiones que los sistemas de flujo convencional y es necesario utilizar válvulas de inserción de muestra de alta presión, como las comunes en la cromatografía de líquidos.

La capacidad de integración de distintas etapas del proceso analítico ha facilitado el desarrollo de plataformas analíticas basadas en la incorporación de sensores químicos/bioquímicos en el propio sistema microfluídico. La integración de zonas de reconocimiento molecular dentro de los propios chip microfluídicos comerciales representa una tarea con dificultades de adaptación

en el desarrollo de sistemas con integración de etapas de reacción/detección dentro del proceso de análisis. Los elementos de reconocimiento que se suelen emplear en (bio)sensores microfluídicos son NMs, enzimas, anticuerpos y aptámeros que han sido inmovilizados en la microzona sensora [89]. Esta integración conlleva ventajas como son el bajo consumo de muestra y reactivos, una mayor portabilidad, la facilitación de la detección en tiempo real y la paralelización en la multideterminación de analitos.

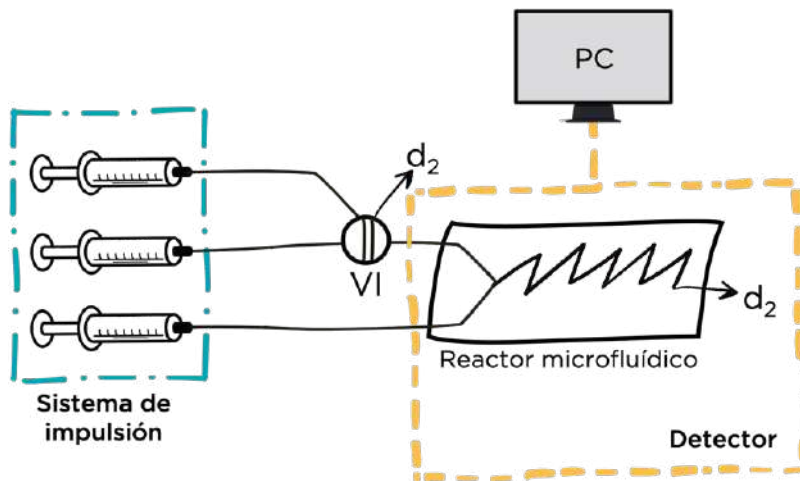


Figura 9. Esquema de la configuración utilizada en un sistema de inyección microfluídico. VI: válvula de inyección, d_1 y d_2 : desechos.

El uso de NMs como herramientas de utilidad para la inmovilización de elementos de reconocimiento es hoy en día habitual, aunque también por si solos presentan actividad para constituir elementos sensores dentro de sistemas de análisis a escala microfluídica. NMs tales como el grafeno o diferentes tipos de NPs pueden funcionalizarse con biomoléculas (enzimas, anticuerpos, aptámeros, oligonucleótidos, etc.) u otros reactivos de forma que constituyen NEs híbridas que mejoran las características analíticas de los sistemas microfluídicos. El grafeno se ha utilizado en el desarrollo de sensores electroquímicos [107] o sistemas biosensores basados en la retención específica

de aptámeros al grafeno depositado en la superficie del sistema microfluídico [108].

El desarrollo de la tecnología de evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX) de ácidos nucleicos sintéticos constituye una herramienta muy eficaz para la producción de aptámeros basados en estructuras seriadas de oligonucleótidos para su utilización como elementos biospecíficos en la fabricación de aptasensores microfluídicos. El empleo de aptámeros como elementos sensores como alternativa a desarrollo de inmunosensores presenta importantes ventajas que justifican su enorme aplicabilidad. En la **Tabla 1**, se recogen algunas de estas características en comparación con el uso de anticuerpo como material biospecífico.

Tabla 1. Comparación de las características de aptámeros frente a anticuerpos

Características	Aptámeros	Anticuerpos
Base molecular de la interacción	Ácidos nucleicos, oligonucleótidos	Proteínas
Modificaciones estructurales	Muy amplias	Pequeñas, solo debidas a la selectividad antigénica
Tamaño molecular	Bajo	Alto
Estabilidad	Alta estabilidad térmica	Fácil desnaturalización
Vías de inmovilización	Adsorción, unión covalente	Unión covalente, otras más específicas
Tecnología de síntesis	SELEX	Producción de anticuerpos mono y policlonales
Coste de producción	Bajo	Alto

Al igual que los anticuerpos, los aptámeros presenta alta selectividad a un gran número de moléculas objeto (fármacos, iones metálicos, péptidos, proteínas y células). También cuentan con ventajas que los anticuerpos no poseen, como son la estabilidad a largo plazo, su síntesis fácil, rápida y económica, su capacidad de ser modificados sin que se altere sus características de unión y estabilidad, así como su alta resistencia a la desnaturalización. Se citan a continuación dos ejemplos del uso de aptámeros inmovilizados en

sistemas microfluídicos para su aplicación en química analítica es la determinación de patógenos con aptámeros inmovilizados en GO o la determinación de kanamicina por inmovilización de aptámeros en AuNPs [109,110].

Por otra parte, también se han utilizado NMs con el fin de mejorar algunas de las prestaciones de los sistemas microfluídicos mediante el uso de NPs, ya que inciden directamente sobre la mejora de la sensibilidad y selectividad analítica, pues intervienen en las etapas de preconcentración separación, reacción y detección [89,111]. Se han aprovechado las propiedades magnéticas de las Fe_3O_4 NPs para su uso en etapas de preconcentración o reacción/detección fundamentadas en la retención magnética de estas NPs magnética híbridas con otras biomoléculas. Las NPs magnéticas son retenidas en la zona adecuada del sistema microfluídico gracias a la incorporación de dispositivos electromagnéticos, lo que propicia además una fácil regeneración de la zona activa por anulación de campo magnético externo aplicado. Por otra parte, también se han utilizado NMs con características ópticas y electroquímicas aplicados a la mejora de la detección instrumental. Además, también pueden utilizarse, solos o en conjunción con otros NMs, como herramientas analíticas para mejorar la señal instrumental. Diferentes tipos de NMs magnéticos pueden también utilizarse como soportes de diferentes biomoléculas y otros reactivos para formar zonas activas en el diseño de sensores químicos y bioquímicos [112] o también ser encapsulados en magnetoliposomas para ser retenidos en la zona de reacción/detección del sistema microfluídico y servir como sistemas de amplificación de señal, ocasionando un aumento en la sensibilidad analítica [113,114].

4. Técnicas instrumentales ópticas

Se describen a continuación algunos aspectos básicos de las técnicas ópticas instrumentales utilizadas en esta Memoria. El empleo de estas técnicas va a permitir obtener información analítica desde dos puntos de vista: separativa y determinativa. Por una parte, en las metodologías analíticas separativas propuestas se pretende extraer información que permita evaluar la eficacia en la separación de los diferentes tipos de NMs desarrollados. Por otra parte, en el desarrollo de metodologías analíticas determinativas, utilizar los posibles fenómenos de interacción de la radiación electromagnética con la materia para originar señales instrumentales que permitan la cuantificación de los analitos estudiados.

Estas técnicas se encargan de medir la radiación electromagnética que emana de la materia o que interacciona con ella. El espectro de radiación electromagnética se extiende en función de la frecuencia de la radiación desde la zona de los rayos gamma, de altas frecuencia (muy energéticas), hasta la zona de la radiofrecuencia y de ondas de radio. En todas las zonas de espectro se cumple que se trata de energía radiante que se propaga por el espacio y que cualquier radiación electromagnética se representa por una onda constituida por un campo eléctrico y un campo magnético, ambos alternantes que oscilan perpendicularmente entre sí y a la dirección de propagación del haz. Así, la radiación puede ser considerada como un haz de ondas electromagnéticas distribuidos en distintos planos centrados a lo largo de la trayectoria del haz. Cuando las ondas se propagan en un solo plano se dice que las ondas están polarizadas en un plano. Puesto que es el campo eléctrico el que interacciona con los electrones de la materia, es el parámetro se utiliza para representar a dicha radiación electromagnética. Las propiedades ondulatorias se indican a través de sus parámetros, que son frecuencia (ν), longitud de onda (λ), periodo

(T) y número de onda ($\bar{\nu}$). En el espectro también se cumple que la velocidad de la radiación electromagnética en el vacío es invariable ($v = \lambda/T = \lambda \cdot \nu$). La frecuencia está determinada exclusivamente por la fuente de radiación y, por tanto, es invariable cualquiera que sea el medio material por el que se transmite la radiación. Por el contrario, la velocidad de propagación de la onda depende del medio por el que se propaga y de la frecuencia. En el vacío, esta velocidad siempre es igual, independiente de la frecuencia. Sin embargo, en cualquier medio material, la velocidad de la radiación disminuye al ser frenada por la interacción con la materia y, en consecuencia, la longitud de onda también disminuirá al atravesar un medio material.

La naturaleza ondulatoria de la radiación permite explicar fenómenos de interacción con la materia tales como la refracción, reflexión, reflexión interna total, interferencia, difracción, dispersión y polarización. Esta interacción, a veces denominada superficial, da como resultado un cambio de la dirección del plano de vibración de la radiación al atravesar la materia. Otros fenómenos de interacción de la radiación con la materia, sin embargo, requieren considerar la radiación como constituida por corpúsculos discretos de energía (fotones o cuantos de energía) capaces de interactuar de forma profunda con la materia. Este fenómeno corpuscular de la radiación puede explicarse a través de la expresión de Planck ($E = h \cdot \nu$). La energía del cuanto de radiación está condicionada por un parámetro ondulatorio, como es la longitud de onda. El uso del carácter corpuscular de la radiación permite explicar el efecto fotoeléctrico. Al igual que el efecto fotoeléctrico, existen otros fenómenos de absorción selectiva de la radiación por la materia cuya explicación exige considerar al haz de radiación electromagnética como un tren de partículas discretas o fotones que poseen energías bien definidas y proporcionales a la frecuencia de la radiación. Por tanto, el comportamiento de la radiación electromagnética se puede explicar en determinadas manifestaciones por la teoría ondulatoria y en otras, por la teoría corpuscular. La ecuación de Planck constituye la idea unificadora de

ambas concepciones al relacionar la energía de un cuanto de radiación (el fotón) con la frecuencia de tal radiación, que es un parámetro ondulatorio.

Incluyendo diferentes tipos de fenómenos de interacción más profunda, puede ocurrir que la radiación pueda originar fenómenos de absorción selectiva con la materia, o bien que la propia materia emita radiación electromagnética [115,116]. Las técnicas instrumentales ópticas miden la radiación electromagnética que emana de la materia o que interacciona con ella. Por tanto, incluye a todas las regiones del espectro electromagnético, desde los rayos gamma hasta las ondas de radio. Según el tipo de interacción, las técnicas ópticas se pueden dividir en dos grupos: espectroscópicas y no espectroscópicas.

Las técnicas ópticas no espectroscópicas tienen su fundamento en las propiedades ondulatorias de la radiación electromagnética. Sus características se basan en las propiedades de ésta, sus parámetros dimensionales y la relación entre ellos. Como ya se ha comentado, se basan en interacciones poco profundas entre la materia y la energía. A diferencia de las técnicas espectroscópicas, las no espectroscópicas no están relacionadas con transiciones entre los estados de energía interna de la materia. Por tanto, como característica general se puede indicar que no hay cambios energéticos. En función del tipo de medida que se lleva a cabo, estas se pueden clasificar como se resumen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Técnicas ópticas no espectroscópicas (adaptado de [116])

Tipo de interacción de radiación-materia	Naturaleza de la interacción	Nombre de la técnica	Fundamento de la medida	Aplicaciones analíticas
Cambio en la dirección de la radiación	Reflexión	Resonancia de plasmón superficial (SPR)	Cambios en el índice de refracción en una superficie metálica provocados por la interacción de los analitos	Desarrollo de sensores de bioafinidad (inmunosensores, aptasensores, genesensores, etc.)
		Espectroscopía de reflexión	Reflexión de la radiación	Diseño de dispositivos ópticos para espectroscopía de absorción IR
	Refracción	Refractometría	Cambios en el índice de refracción en función de la concentración o composición	Identificación de compuestos orgánicos puros y de índices globales (grados Brix)
		Interferometría	Diferencia entre el índice de refracción de la muestra respecto a un patrón	
	Dispersión (<i>scattering</i>)	Turbidimetría	Disminución de intensidad de un haz luminoso dispersado en una suspensión	Volumetrías de precipitación. Determinación de tamaño de partículas. Determinación de proteínas en inmunoprecipitación
		Nefelometría	Luz dispersada por un sistema de partículas finamente divididas y medidas con un ángulo de 90	
		Dispersión de radiación resonante (RLS)	Medida de la máxima intensidad de señal emitida al realizar un barrido sincrónico de excitación/emisión ($\Delta\lambda = 0$)	Información sobre tamaños de partículas y pesos moleculares.
		Detección de luz dispersada tras evaporación (ELSD)	Dispersión en la radiación en fase gaseosa	Respuesta universal a todos los solutos no volátiles, por dispersión Rayleigh

<p>Modificación de la intensidad de la radiación</p>	<p>Difracción (superposición de ondas que originan interferencias)</p>	<p>Dispersión de luz estática (SLS)</p>	<p>Detección de dispersión de luz de ángulo bajo (LALS) Detección de dispersión de luz de ángulo recto (RALS) Detección de dispersión de luz multiángulo (MALS) Difracción de rayos X por átomos en planos cristalinos</p>	<p>Determinación de radios moleculares y pesos moleculares de macromoléculas y polímeros</p> <p>Estudios estructurales de isómeros y materiales polimorfos. Identificación de cambio de fases y sólidos cristalinos</p>
<p>Cambios en la amplitud de los vectores electromagnéticos de la radiación</p>	<p>Otras técnicas de difracción electrónica</p>	<p>Polarimetría y espectropolarimetría</p>	<p>Difracción producida por un haz de electrones (también de neutrones)</p>	<p>Usos en microscopía electrónica de transmisión (TEM) y electrónica de barrido (SEM)</p>
<p></p>	<p>Polarización de la radiación</p>	<p>Dispersión óptica rotatoria</p>	<p>Rotación del plano de la luz polarizada por diferentes sustancias</p> <p>Origen de planos de polarización de la radiación a un ángulo de rotación que depende del compuesto, de la longitud de onda y de la temperatura</p> <p>Absorción desigual por un medio ópticamente activo de los componentes circulares de un haz de luz polarizada en un plano</p>	<p>Determinación cuantitativa de azúcares (sacarosa, azúcares invertidos, glucosa) y almidón</p> <p>Se utiliza la luz polarizada para obtener información estructural de la materia</p>
<p></p>	<p>Dicroísmo circular</p>	<p></p>	<p>Identificación y determinación de la pureza de compuestos ópticamente activos</p>	<p></p>

Las técnicas espectroscópicas son aquellas en las que la muestra sufre procesos en los que se altera el estado de los niveles energéticos de sus electrones al interactuar con ella la radiación incidente. Estas interacciones pueden llevarse a cabo por procesos de absorción, emisión o luminiscencia. Las técnicas espectroscópicas pueden diferenciarse según el estado en el que está la muestra al recibir la radiación, observando técnicas espectroscópicas moleculares y atómicas. También existen diferentes técnicas según la energía de la radiación electromagnética utilizada. En la **Tabla 3** y **4** se resumen las técnicas ópticas espectroscópicas básicas usada en Química Analítica para especies moleculares y atómicas. Más adelante se comentarán sucintamente aquellas técnicas usadas en el desarrollo de las investigaciones incluidas en esta Memoria. Además, en la **Figura 10** se muestra un diagrama de niveles de energía y principales procesos que pueden ocurrir y que dan origen a diferentes técnicas espectroscópicas [115].

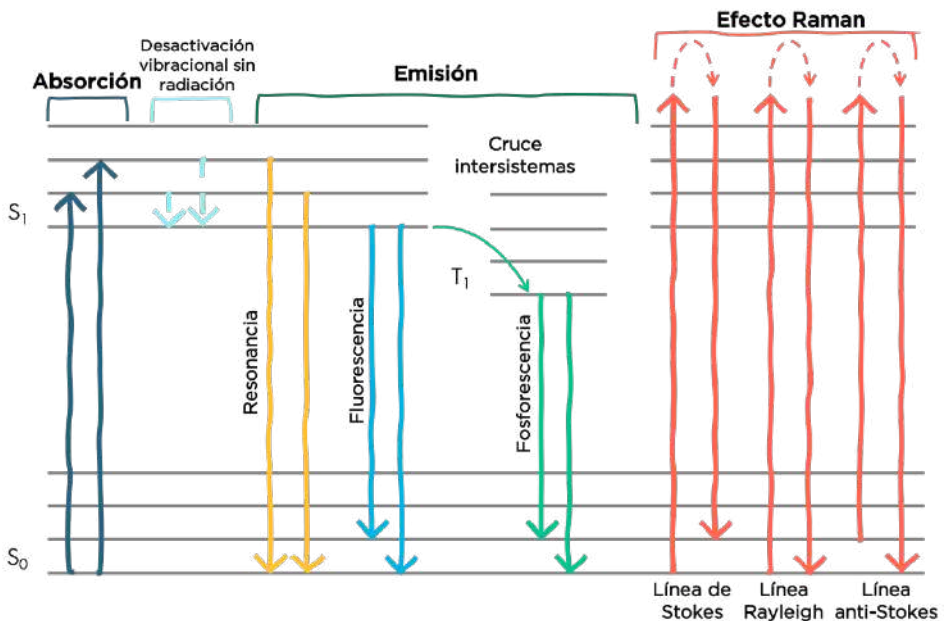


Figura 10. Esquema de los niveles energéticos y principales procesos de que pueden ocurrir y que dan origen a algunas de las técnicas espectroscópicas [115,116].

Tabla 3. Técnicas Ópticas Espectroscópicas moleculares (adaptado de [116])

Técnica	Fundamento de la medida	Aplicaciones analíticas
Espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-VIS)	Excitación de electrones de valencia por absorción de la radiación UV-VIS	Análisis cuantitativo de compuestos orgánicos e inorgánicos
Espectrofotometría infrarroja (IR)	Excitación de vibraciones moleculares por absorción de la radiación IR	Determinación de estructuras e identificación de compuestos orgánicos e inorgánicos (Análisis cualitativo y cuantitativo)
Espectrofluorimetría	Emisión de la radiación UV-VIS desde el nivel vibracional más bajo del primer singlete excitado al fundamental. Excitación por absorción de la radiación UV-VIS	Análisis cuantitativo de compuestos orgánicos e inorgánicos con más sensibilidad y selectividad que la técnica de absorción
Espectrofosforimetría	Emisión de la radiación UV-VIS desde el nivel más bajo del primer estado triplete. Excitación por absorción de la radiación UV-VIS y cruce entre sistemas	Determinación de compuestos orgánicos. Escasas aplicaciones prácticas
Quimio y bioluminimetría	Emisión de la radiación UV-VIS desde el nivel vibracional más bajo del primer singlete excitado al fundamental. Excitación a través de una reacción química o bioquímica	Análisis cuantitativo de compuestos orgánicos de origen biológico. Análisis de compuestos inorgánicos por catálisis de reacciones quimioluminiscentes
Espectroscopía Raman	Dispersión de la radiación a longitudes de onda ligeramente diferentes a la de la radiación incidente. Información sobre vibraciones moleculares en estado fundamental.	Determinación de estructuras e identificación de compuestos orgánicos e inorgánicos. Complemento de la espectroscopía IR
Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR)	Aplicación de radiación de radiofrecuencias de energía variable sobre una muestra sometida a un campo magnético intenso	Elucidación de estructuras de compuestos orgánicos e inorgánicos
Espectroscopía de resonancia de espín electrónico (ESR) o paramagnética electrónica (EPR)	Aplicación de radiación microondas de energía variable sobre una muestra sometida a un campo magnético intenso	Estudios estructurales y mecanismos de reacción
Espectroscopía Mössbauer	Absorción de la radiación gamma procedente de un isótopo radiactivo colocado en una red cristalina del analito	Técnica complementaria de NMR y EPR

Tabla 4. Técnicas Ópticas Espectroscópicas atómicas (adaptado de [116])

Técnica	Fundamento de la medida	Aplicaciones analíticas
Espectroscopía de absorción atómica	Absorción de la radiación UV-VIS por átomos en estado fundamental. Transición de electrones de valencia	Determinación elemental de elementos no metálicos con alta sensibilidad y selectividad
Espectroscopía de emisión atómica	Emisión espontánea de la radiación UV-VIS por átomos o iones excitados. Excitación térmica y/o por choque de electrones o partículas energéticas (plasmas)	Determinación elemental mediante arcos, chispas, llamas y plasmas. Detección multielemental
Espectroscopía de fluorescencia atómica	Emisión espontánea de la radiación UV-VIS por átomos o iones excitados al pasar al nivel fundamental. Excitación radiacional	Técnica muy sensible y selectiva
Espectroscopía de absorción de rayos X	Expulsión de electrones internos por absorción de rayos X	Análisis de metales en sólidos. Medidas del espesor de capas en materiales metálicos
Espectroscopía de fluorescencia de rayos X	Expulsión de electrones internos por absorción de rayos X primarios	Análisis cualitativo y semicuantitativo. Microanálisis superficial de materiales
Activación neutrónica	Activación de la muestra por bombardeo con neutrones térmicos en un reactor	Determinación de elementos trazas en materiales sólidos, líquidos y gaseosos
Dilución isotópica radioquímica	Dilución de la muestra con un isótopo radiactivo con peso atómico conocido del elemento químico a determinar	Determinación de trazadores bioquímicos, datación geológica y arqueológica. Medidas de rendimientos en procesos químicos

La absorción de la radiación es el fenómeno en el cual hay una interacción entre el campo eléctrico de la radiación y alguna carga eléctrica de la materia, que produce una transición del nivel electrónico fundamental (S_0) al primer nivel singlete excitado (S_1). Cuando se trata de moléculas, nos encontramos que la radiación absorbida puede ser utilizada para producir distintas transiciones (rotacionales, vibracionales y electrónicas), originando espectros con diferentes características y diferentes grados de utilidad.

En muchas ocasiones, la molécula en estado excitado no es estable y vuelve a su estado fundamental, originando diferentes procesos de desactivación (relajación vibracional, desactivación sin emisión radiante, proceso de

luminiscencia, emisión resonante, emisión a partir de una excitación no radiante). En los procesos de emisión la materia pasa de un nivel de mayor energía a otro de menor energía, emitiendo radiación. Pueden identificarse tres procesos de emisión:

- La emisión después de una primera etapa de absorción de radiación electromagnética. Entre ellos se encuentran: la resonancia, la fluorescencia y la fosforescencia. La emisión resonante ocurre cuando un átomo o molécula emite radiación de la misma frecuencia que la absorbida. La fluorescencia y la fosforescencia, sin embargo, son emisiones de longitudes de onda superior a la radiación absorbida, ya que parte de esta energía se pierde por otros métodos de desactivación. La diferencia entre fluorescencia y fosforescencia reside en que, en la primera, la transición se origina desde el estado excitado S_1 al fundamental S_0 , para que ocurra la segunda, tiene que haber un cambio en el espín electrónico y una emisión desde el nivel triplete excitado (T_1) al estado S_0 .
- La emisión a partir de una radiación no electromagnética, por ejemplo, la excitación térmica en espectrometría de llama.
- La emisión del núcleo radiactivo en el que se desintegra espontáneamente emitiendo rayos gamma.

El proceso que interviene en la espectroscopía Raman es único. En él interviene un tipo especial de dispersión en el que la molécula es excitada por un fotón a un nivel de energía que no corresponde con ningún estado de la sustancia (nivel energético no permitido), es decir, llega a una altura arbitraria en función de la energía utilizada. Posteriormente la molécula pasa a un nivel energético permitido, emitiendo un fotón con una frecuencia que depende del salto energético realizado por la molécula. Si el fotón dispersado tiene una frecuencia igual que el fotón incidente, se produce un choque elástico y la molécula vuelve al mismo nivel energético que tenía, dando lugar la dispersión Rayleigh ya

comentada. Sin embargo, si el fotón presenta una frecuencia superior o inferior a la del fotón incidente, el choque es inelástico, lo que supone que hay una transferencia energética entre fotón y molécula, dando las líneas de Stokes y anti-Stokes. Al producirse una variación de la frecuencia, y al poder medir esta variación en relación con la dispersión Rayleigh, esta técnica se considera espectroscópica. Esta variación de frecuencia es dependiente de la molécula, lo que puede dar información estructural y química de la molécula.

4.1. Dispersión de la radiación

La dispersión de la radiación es un fenómeno óptico que ha sido ampliamente utilizado como sistema de detección en Química Analítica, aunque recientemente ha aumentado su utilización en la caracterización de los NMs sintetizados, así como uso en el desarrollo de nuevos métodos analíticos.

Este fenómeno se basa en la dispersión de la luz por las partículas en suspensión en el seno de una disolución. Según el diámetro de las partículas que interactúan con la radiación incidente y la longitud de onda de la radiación incidente pueden distinguirse diferentes fenómenos de dispersión. La dispersión Rayleigh se produce en partículas de dimensiones no superiores al 5–10 % de la longitud de onda de la radiación incidente en la que la radiación se dispersa uniformemente en todas direcciones. La dispersión por partículas grandes se produce cuando las dimensiones de la partícula son superiores al 10 % de la longitud de onda, pero no pueden superar valores mayores de $3/2 \lambda$, ya que para estos valores ocurrirían fenómenos de reflexión y la refracción. Dentro de las dispersiones que ocurren para estas partículas grandes se encuentra la dispersión Mie, cuando las partículas tienen dimensiones superiores a $1/3$ de la longitud de onda de la radiación, y la dispersión Tyndall, cuando las dimensiones son superiores a la longitud de onda, por lo que la dispersión no depende de la longitud de onda y las partículas reflejan la luz, en lugar de dispersarse [117]. La distribución de intensidades característica para partículas grandes no es

homogénea por las interferencias constructivas y destructivas entre ondas y se desvía en el mismo sentido que la radiación incidente. Existen otros fenómenos en los que, además de dispersión, se produce un cambio en la frecuencia de vibración de la radiación, como ocurre en la espectroscopía Raman que se comentará más adelante.

Existen dos técnicas, la turbidimetría y la nefelometría, cuya principal diferencia se encuentra en las formas de medir la dispersión. En turbidimetría se mide la diferencia de la intensidad de la radiación emitida y la intensidad de la radiación incidente, es decir, la disminución de intensidad de la luz emitida por una fuente al atravesar la disolución. Sin embargo, la nefelometría mide la luz dispersada según la dirección que forma un ángulo (90°) con la radiación incidente. La turbidimetría es más adecuada para determinar concentraciones relativamente elevadas de partículas en suspensión y la nefelometría cuando se trata de determinar concentraciones más bajas. Estas técnicas se usan en laboratorios analíticos, clínicos y en control de procesos, por ejemplo, para medir la transparencia de agua y bebidas. Estos detectores se pueden acoplar a sistemas FIA en inmunoensayos, para determinación de especies iónicas o proteínas [118].

Los términos turbidimetría y nefelometría se restringen a medidas de concentración de partículas en una disolución, pero hay otras aplicaciones que se basan en los mismos principios y que dan información sobre la forma y el tamaño de las partículas, así como pesos moleculares. Es el caso de la técnica RLS. Esta técnica utiliza un espectrofluorímetro convencional en el que se realiza el barrido simultáneo de los monocromadores de excitación y emisión con una $\Delta\lambda = 0$, recogiendo la señal en un espectro sincrónico y obteniendo una señal intensa en las proximidades de la zona de máxima absorción de una especie que presente propiedades absorbentes [119]. La radiación dispersada en estas condiciones puede considerarse que sigue la teoría Rayleigh, por lo que esta técnica también se llama a menudo dispersión Rayleigh por resonancia (RRS).

No obstante, las señales RLS obtenidas con un espectrofluorímetro pueden incluir, además de la dispersión Rayleigh, otros tipos de dispersión. Esta técnica presenta las siguientes características:

- Buena selectividad y sensibilidad, al concentrarse en las señales de dispersión de radiación en o cerca de las regiones absorbentes de los sistemas de dispersión.
- Las señales RLS pueden medirse satisfactoriamente con un espectrofluorímetro sin necesidad de instrumentación complicada, al contrario de la dispersión Rayleigh convencional que necesita una fuente láser.

Esta técnica es muy simple y en la actualidad ha tomado importancia para estudiar la agregación de NPs debido a la interacción con otras moléculas, como la determinación de cisteína por agregación de AuNPs [120], la determinación de ácido ferúlico por la formación de AgNPs [121] o la determinación de ácido mefenámico por la dispersión creada por un MIP recubierto de Fe_3O_4 NPs [122].

4.2. Espectroscopía de emisión molecular

Algunas de las aplicaciones a desarrollar en esta Tesis Doctoral se basan en el empleo de detectores espectrofluorimétricos con diferente grado de integración en las plataformas analíticas propuestas. La espectroscopía de emisión molecular se fundamenta en el fenómeno de la luminiscencia, que consiste en la emisión de radiación luminosa que se produce cuando la molécula se excita a un nivel electrónico superior y vuelve al estado electrónico fundamental, perdiendo el exceso de energía en forma de fotones, por lo que también se denomina espectroscopía de luminiscencia molecular.

Un aspecto básico del proceso global es que la molécula debe tener una estructura química adecuada para captar la energía necesaria para excitarse y

originar la emisión luminiscente. Como es sabido, gran parte de las moléculas que absorben fotones pierden su exceso de energía en forma de calor, mediante choques con otros átomos o moléculas. Sin embargo, algunas moléculas pierden solamente parte de esta energía en forma de calor y la otra parte la emiten en forma de radiación electromagnética a una longitud de onda más larga que la radiación absorbida. Este proceso de emisión por el que la molécula vuelve del estado excitado al fundamental se conoce como luminiscencia. Atendiendo al origen de la energía de excitación, pueden considerarse distintos tipos de luminiscencia y que se resumen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Tipos de fenómenos luminiscentes (adaptación de [116])

Energía de excitación	Denominación del fenómeno de emisión
Luminosa	Fotoluminiscencia: - Fluorescencia - Fosforescencia
Química	Químico y bioluminiscencia Electroluminiscencia
Térmica	Termoluminiscencia
Mecánica	Triboluminiscencia

- Si una molécula se excita mediante radiación electromagnética, se denomina fotoluminiscencia. Dentro de ella se encuentran los dos fenómenos más característicos, fluorescencia y fosforescencia, que se diferencian en las transiciones responsables de la emisión. Cualquier molécula fluorescente o fosforescente se caracteriza por sus dos longitudes de onda, la de máxima excitación (que se corresponde con la de máxima absorción) y la de máxima emisión. Debido a que parte de la energía absorbida se pierde mediante los procesos de relajación no radiante, la energía emitida es menor que la absorbida, por lo que la longitud de onda de emisión es mayor que la de excitación. En el caso de que una sustancia presente ambos fenómenos luminiscentes, la emisión de fosforescencia se produce a mayor longitud de

onda que la de fluorescencia, debido a la pérdida de energía que implica el proceso de cruce entre sistemas. El fenómeno de la fluorescencia consiste en la emisión de radiación electromagnética sin cambiar su espín electrónico. Sin embargo, en la fosforescencia, la molécula pasa a un estado triplete excitado antes de emitirse la radiación. Al no producirse ese cambio de espín, la fluorescencia es un proceso más rápido que la fosforescencia. La fosforescencia es un proceso menos común que la fluorescencia, ya que existen menos especies químicas que la presentan.

- Si la excitación se produce mediante energía química liberada en una reacción química, al proceso se le denomina quimioluminiscencia. Cuando la reacción es de tipo bioquímico, recibe el nombre de bioluminiscencia, y si es de tipo electroquímico, es decir, reacción generada en un electrodo, se denomina electroluminiscencia. En estos casos, puesto que no se utiliza ninguna radiación para excitar la molécula, esta solo se caracteriza por su longitud de onda de máxima emisión.
- Existen otros tipos de fenómenos luminiscentes que tienen menos interés desde el punto de vista analítico debido a que la intensidad de la radiación emitida es relativamente baja. Así, si la energía de excitación es térmica, se denomina termoluminiscencia. Otro fenómeno luminiscente es la triboluminiscencia, producida mediante la energía mecánica producida al romperse los cristales de ciertos compuestos cristalinos, liberándose la energía almacenada al formarse el cristal.

Según los distintos tipos de fenómenos luminiscentes comentados, la espectroscopía de emisión molecular abarca tres técnicas básicas: espectroscopía de fluorescencia molecular o espectrofluorimetría, espectroscopía de fosforescencia molecular o espectrofosforimetría y espectroscopía quimioluminiscente. La luminiscencia sensibilizada puede considerarse un tipo especial dentro de la fosforescencia o de la quimioluminiscencia.

La intensidad de la radiación fluorescente es directamente proporcional a la concentración de especie absorbente a concentraciones muy bajas y es la característica habitualmente usada para el desarrollo de metodologías analíticas basadas en el fenómeno de la fluorescencia. En general, las técnicas luminiscentes permiten obtener mejores límites de detección, puesto que la radiación emitida se mide directamente, dependiendo de la intensidad de la fuente de excitación, no como en fotometría, que es el resultado de una medida indirecta entre la radiación incidente y la transmitida. También se obtienen intervalos de linealidad que llegan a ser de 6 o 7 órdenes de magnitud, mientras que en fotometría solo se alcanzan no más de 2 o 3 órdenes de magnitud. La selectividad de las técnicas fotoluminiscentes es mejor que en fotometría por dos factores: 1) existen menos compuestos fotoluminiscentes que absorbentes y 2) al trabajar a dos longitudes de onda (excitación y emisión), probablemente diferentes compuestos no presenten longitudes iguales. No obstante, pueden existir problemas de selectividad debido a fenómenos de inhibición, solapamiento espectral, radiación dispersada y señal de fondo de la muestra. Estos factores limitan su potencial aplicabilidad al análisis de muestras. Existen algunas estrategias que permiten mejorar la selectividad como por ejemplo la discriminación espectral (sincrónica, derivada, estrechamiento de banda, larga longitud de onda, transferencia de energía), la discriminación temporal (cinética, tiempo resuelto), la discriminación química (derivatización) o la discriminación matemática (quimiometría).

Las moléculas fotoluminiscentes presentan tres propiedades características que las diferencian de las demás: desplazamiento Stokes, rendimiento cuántico de la luminiscencia y duración del estado excitado. Existe una gran variedad de factores que pueden afectar a la fluorescencia, como la estructura de la especie luminiscente, su concentración, la radiación utilizada para excitarla y la presencia de otras especies en el medio. Además, la señal fluorescente depende de diversas variables experimentales tales como el oxígeno

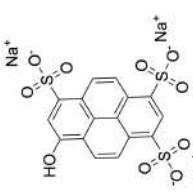
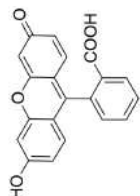
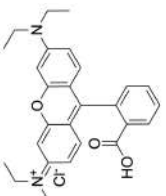
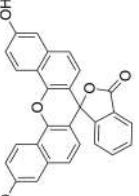
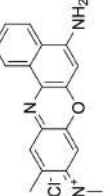
disuelto, disolventes, pH y temperatura, entre otras. En relación con la estructura de las moléculas luminiscentes, estas deben ser capaces de absorber la radiación UV o visible, ya que cuanto más absorbente sea la molécula, mayor será la posibilidad de que emita luminiscencia y que esta sea más intensa. Son moléculas con estructura rígida, plana, con dobles enlaces conjugados y multicíclica. La rigidez evita que la molécula pierda la energía absorbida como energía vibracional o rotacional. Es frecuente que las moléculas que contengan anillos aromáticos con heteroátomos presenten mejor fosforescencia que fluorescencia. La capacidad de emisión luminiscente de las moléculas está influida por los sustituyentes que presente. Por ejemplo, los grupos dadores de electrones, como $-\text{NH}_2$ y $-\text{OH}$, o los átomos pesados generalmente aumentan la fluorescencia. El pH de la disolución también afecta a la fluorescencia de los compuestos, ya que modifica las cargas y formas resonantes del cromóforo.

Los fluoróforos son especies químicas de naturaleza orgánica que presentan diferentes bandas de excitación y emisión características de su estructura química. En general, son estructuras químicas capaces de excitarse a longitudes de onda características y emitir a otras longitudes de onda superiores, en función de su estructura y del mecanismo de desactivación fotoluminiscente. Los compuestos fluoróforos son capaces de emitir en distintas zonas del espectro electromagnético, desde la zona UV hasta el IR cercano. En la **Tabla 6**, se muestran las familias en las que se pueden englobar los fluoróforos nombrados en esta Memoria, la estructuras que presenta cada uno, las longitudes de onda de excitación y emisión que manifiestan, y su rendimiento cuántico [123–126].

Los fluoróforos que emiten a una longitud de onda más corta se suelen denominar fluoróforos convencionales, porque han sido los más utilizados hasta la fecha debido al mayor número de especies que emiten en esa región del espectro. Algunos componentes de la matriz de la muestra presentan también fluorescencia en esta región del espectro y pueden interferir en la señal de fluorescencia de estos fluoróforos. Esta limitación se puede evitar o minimizar

de dos formas: 1) mediante la aplicación de una metodología cinética, ya que normalmente las señales procedentes de la matriz de la muestra tienen una naturaleza estática, y 2) realizando tratamientos previos a la muestra para eliminar la matriz. Dentro de estos fluoróforos se pueden encontrar, por ejemplo, piranina (HPTS), fluoresceína o rodamina B.

Tabla 6. Principales familias de fluoróforos

Familia	Fluoróforos	Estructura	Longitud de onda, nm Excitación	Emisión	Rendimiento cuántico, Φ_f
Derivados del pireno	Piranina (HPTS)		454	511	1,0
Derivados del xanteno	Fluoresceína		490	514	0,95
	Rodamina B		545	570	0,70
	Naftofluoresceína		594	663	0,14
Derivados de la oxacina	Violeta de cresilo		627	585	0,58

Además de los fluoróforos convencionales, existen grupos de compuestos orgánicos cuya emisión ocurre entre el visible lejano y el infrarrojo cercano (>600 nm). En este sentido, la emisión de estos fluoróforos de larga longitud de onda (LWFs) no se ve afectada por la señal de los componentes de la matriz de la muestra, ya que estos compuestos no presentan emisión en esta región del espectro. Esta característica confiere selectividad espectral frente al uso de fluoróforos convencionales [127]. Ejemplos de este tipo de fluoróforos son el violeta de cresilo o la naftofluoresceína.

En el caso de LWFs, como presentan emisiones en la región de baja energía del espectro, implican un bajo riesgo de degradación de la muestra debido a la baja energía que necesitan para excitarse, además de una baja probabilidad de sufrir fenómenos de inhibición, debido a su corto tiempo de vida. Sin embargo, existen factores que modifican las propiedades luminiscentes de estos compuestos. Algunos de estos factores son la presencia de agentes sinérgicos, como los surfactantes, o el pH. Los surfactantes pueden formar micelas que protegen al complejo de procesos de desactivación no radiante proporcionándoles estabilidad y aumentan el rendimiento cuántico de los fluoróforos [128].

El uso de ambos tipos de fluoróforos está muy extendido en el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de diferentes compuestos gracias a las propiedades que presentan. Los métodos se basan en la pérdida de fluorescencia de estos compuestos al verse involucrados en la reacción con el analito. Además, como son compuestos solubles en agua, su encapsulación en liposomas resulta muy útil en dichos métodos analíticos, ya que al encontrarse preconcentrados dentro del liposoma aumentaría la sensibilidad del método. Tal es el caso de la determinación de coenzima Q10 en alimentos por medio de violeta de cresilo o la determinación de especies de oxígeno reactivas gracias a la naftofluoresceína [50,51].

Por último, cabe desatacar la importancia la espectrofluorimetría como técnica de detección acoplada con sistemas de flujo a escala convencional o microfluídica con diferentes modelos de integración en la etapa de reacción/detección.

4.3. Resonancia de plasmón superficial

La técnica de resonancia de plasmón de superficie (SPR) es un método óptico en el que se mide el cambio en el índice de refracción que producen capas muy finas de materiales adsorbidos en la superficie de un metal [129]. El fenómeno físico SPR se observó por primera vez a principios del siglo XX y desde entonces ha sido muy utilizado en Química Analítica como sistema de detección en métodos basados en (bio)sensores que responden a la adsorción de moléculas sobre su superficie. La primera aplicación que se conoce de un sensor para monitorizar interacciones biomoleculares fue demostrada por primera vez en 1983 por Liedberg [130].

Un haz de luz polarizada se hace incidir a través de un prisma sobre un chip sensor recubierto con una delgada película de oro, la cual actúa como un espejo reflejando la radiación. Una fracción de la energía de la radiación incidente a un ángulo definido puede interactuar con los electrones deslocalizados de la superficie metálica (plasmón de superficie). Si se cambia el ángulo de incidencia y se monitoriza la intensidad de la radiación reflejada, se encuentra que esta alcanza un mínimo en el momento en el que la radiación incidente excita el plasmón de la superficie induciendo su resonancia [131]. Los fotones de la luz polarizada pueden interactuar con los electrones libres de la película metálica, produciendo oscilaciones en forma de ola de los electrones libres y reduciendo de este modo la intensidad de la luz reflejada. En la **Figura 11** se muestra un esquema de la configuración de un montaje experimental de medida de SPR.

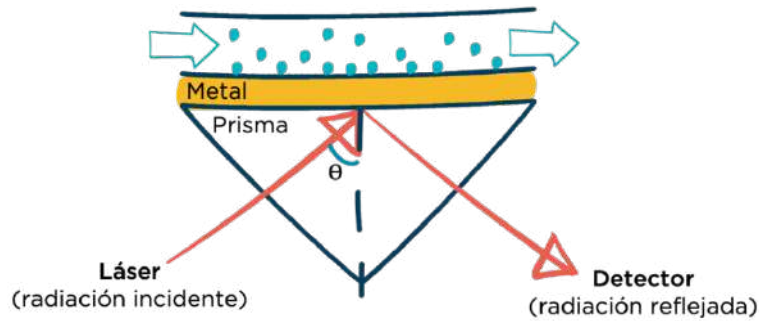


Figura 11. Dispositivo experimental para la monitorización del SPR. Un chip con un recubrimiento de oro se coloca sobre un prisma. La fuente de radiación (láser) emite una radiación que incide sobre la superficie del chip. La intensidad de la radiación reflejada es medida en el detector y se puede relacionar con el ángulo del haz de luz incidente (θ).

El ángulo al cual ocurre la máxima pérdida de intensidad de la radiación reflejada se conoce como ángulo de resonancia o ángulo SPR. Este ángulo depende de las características ópticas del sistema, como los índices de refracción de los medios situados a ambos lados de la película de oro. Si se mantiene constante el índice de refracción en el lado del prisma, el cambio de índice de refracción producido por la unión de moléculas a la superficie del metal implica un desplazamiento del ángulo SPR que puede utilizarse para obtener información cinética del proceso, como se muestra en la **Figura 12.a**.

Los cambios producidos en las inmediaciones de la superficie del metal suponen cambios en el índice de refracción que se pueden monitorizar. La profundidad de la penetración del campo electromagnético (campo evanescente) en la película de oro, normalmente no excede los pocos cientos de nanómetros. La representación de esta variación interpretada por la variación del ángulo SPR en función del tiempo se denomina sensograma, como el que aparece en la **Figura 12.b**. En este ejemplo se muestra cómo al principio de la medida, el ángulo no varía al no producirse ningún cambio en el sistema. Sin embargo, al introducir la muestra y que esta quede adsorbida en la superficie, se produce un cambio en el índice de refracción. Posteriormente se puede realizar la desorción

de las especies de la superficie. La monitorización del proceso de adsorción-desorción puede llevarse a cabo en tiempo real y la cantidad de especie adsorbida puede ser determinada.

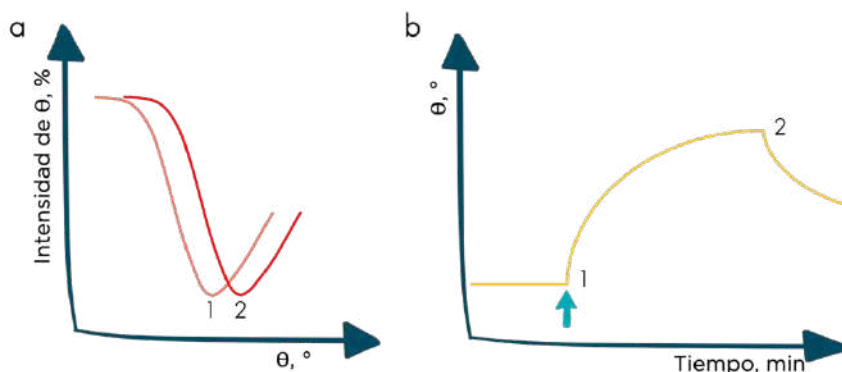


Figura 12. **a** Representación del desplazamiento en el ángulo SPR de 1 a 2 por un cambio en el índice de refracción en la superficie del chip. **b** Esquema de un sensograma en el que se representa el ángulo SPR frente al tiempo. Antes de la inyección de una muestra (flecha) no ocurre ningún cambio en el sensor, pero después de adsorberse moléculas en la superficie se produce un cambio en el ángulo SPR, resultado de un cambio en el índice de refracción.

Los sensores SPR presentan como limitación la falta de selectividad intrínseca, ya que todos los cambios en el índice de refracción en el campo evanescente pueden ser medidos. Debido a esto, pueden observarse cambios debidos a variaciones en la composición o concentración de la disolución reguladora. Para solucionar esta limitación se puede introducir al principio la disolución reguladora y así originar una línea de base a partir de la cual se puedan medir los cambios producidos por la adsorción del analito. Para evitar la adsorción de moléculas que no sean el analito, la superficie debe ser modificada con ligandos adecuados que reaccionen o interaccionen selectivamente con los compuestos de interés y que no faciliten la adsorción de otros compuestos. Un ejemplo de esta modificación por ligandos es la inmovilización de aptámeros en la superficie de oro para la determinación selectiva de compuestos que el aptámero reconozca selectivamente [132]. Para

anclar estos ligandos mejor a la superficie metálica se pueden utilizar nanomateriales depositados como el grafeno al que se inmovilizan especies como anticuerpos [133] o aptámeros [134,135].

En la etapa de disociación, no todo el analito se separa del ligando, ya que esta unión se produce por enlaces covalentes principalmente, siendo difíciles de romper. Para romper la unión selectiva entre analito y ligando se puede incluir en algunos sistemas una etapa de regeneración del sensor, sin afectar a la inmovilización del ligando en la superficie metálica. Esta etapa se lleva a cabo si se quieren realizar múltiples medidas con el mismo chip. Si la regeneración es incompleta, la masa acumulada provocará un aumento en el nivel de referencia.

La técnica SPR ha ganado importancia, debido a que es una técnica que no necesita etiquetas (*label-free*) como moléculas fluorescentes o radiactivas unidas al analito, y únicamente uno de los componentes involucrados en la interacción tiene que estar inmovilizado en la superficie del sensor. Idealmente, el sensograma contiene información cinética, pero también información del equilibrio, como la constante de unión o disociación entre aptámero y analito (K_D), que da información de la concentración a partir de la cual, la concentración de especie disociada es mayor que la concentración de especie asociada. Si se representa el cambio de índice de refracción en función de la concentración de analito, se obtiene una isoterma que tiene por ecuación:

$$s_{eq} = \frac{s_{max}}{1 + K_D/c}$$

donde s_{eq} es la señal del equilibrio a una concentración de analito, s_{max} es la señal máxima que se puede obtener, K_D es la constante de disociación y c es la concentración de analito. Esta ecuación indica que la mitad de la saturación se obtiene cuando la concentración de analito es igual a la K_D [136].

Hay muchos tipos de instrumentación SPR, pero el uso de sistemas microfluídicos de análisis está ganando importancia desde su comercialización a finales del siglo XX. La mayoría de estos sistemas tienen dos o más canales

ópticos en los que llevar a cabo la monitorización, pudiéndose usar independientemente o como una combinación de canales de medida y referencia para medidas diferenciales. Esta instrumentación compacta supone una opción muy rentable y portátil [137].

4.4. Espectroscopía Raman

La información molecular que proporciona la espectroscopía Raman es del mismo tipo que la obtenida con la espectroscopía infrarroja. Cada una de estas técnicas se puede usar como complemento de la otra en el ámbito de caracterización de nanomateriales. El efecto Raman fue descubierto en 1928 por el físico indio C. V. Raman. Durante la época de 1930 se extendió su uso y a partir de 1965, al incorporar el láser como fuente de excitación se dio el impulso definitivo a la técnica. Antes de la utilización del láser, las muestras debían ser disoluciones claras, incoloras y no fluorescentes, bastante concentradas y con un volumen elevado. Sin embargo, estas limitaciones se han eliminado al usar la fuente de láser helio-neón. La espectroscopía Raman es una técnica simple, puede realizarse a temperatura y presión ambiente, rápida, no destructiva y no invasiva.

Raman observó que cuando un haz de luz monocromática incide sobre un conjunto de moléculas, parte de esta radiación es dispersada. La mayor parte (99 %), con la misma frecuencia que la radiación incidente (dispersión Rayleigh o elástica), pero una pequeña parte (menos del 1 %) varía su frecuencia. Esta diferencia entre la frecuencia de la radiación incidente y la dispersada (llamada raya o banda Raman) es característica de cada molécula. La frecuencia de la radiación dispersada puede ser mayor si la radiación incidente excita una molécula a un nivel vibracional o rotacional de mayor energía (línea Stokes) o menor si las moléculas están en un estado excitado cuando la radiación incide sobre ellas y aportan energía extra al fotón (línea anti-Stokes). Las líneas Stokes

y anti-Stokes suministran la misma información, por lo que normalmente se prescinde de la línea anti-Stokes al ser más débil.

Para que un determinado modo de vibración aparezca en el espectro Raman, es preciso que durante la vibración haya un cambio en la polarizabilidad, es decir, un cambio en la capacidad para ser polarizada bajo la acción de un campo eléctrico. Esto supone que, aparte de las magnitudes de frecuencia e intensidad que caracterizan a todas las técnicas espectroscópicas, las líneas del espectro Raman se caracterizan además mediante una tercera magnitud, el grado de polarización o el factor de despolarización.

La espectroscopía Raman permite el estudio de gases, líquidos y sólidos. Puesto que las intensidades de las emisiones Raman no son muy intensas, normalmente no se precisa disolver la muestra. Los disolventes usados, en el caso de necesitar diluirse o disolver un sólido, dependerán del espectro Raman de la sustancia, su capacidad de solvatación y la posibilidad de interacción química con ella.

En el caso de análisis cualitativo, el espectro Raman de un compuesto es único, aunque debe tenerse en cuenta que los espectros de sustancias homólogas son muy parecidos si las moléculas son grandes. El espectro Raman de una mezcla de sustancias que no reaccionan es la suma de todos los espectros Raman de las sustancias por separado. Esto favorece la identificación de sustancias por comparación de espectros si se dispone de los espectros de las sustancias por separado. Si se realiza análisis cuantitativo con la espectroscopía Raman, presenta una ventaja en relación con otras técnicas de absorción, y es que la altura de los picos es linealmente proporcional a la concentración y no sigue una relación logarítmica. Además, los espectros obtenidos son más simples, al no existir armónicos ni tonos de combinación y las bandas de emisión son estrechas y no presentan solapamiento con las bandas de absorción.

La espectroscopía Raman ha resultado ser muy útil en el estudio de las estructuras de carbono, sin importar la forma en la que se encuentren, ya que todas ellas presentan características comunes. El espectro parece simple, al aparecer un par de bandas muy intensas en la región de $1000\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$ y algunas otras modulaciones de segundo orden. Sin embargo, su forma, intensidad y posición permite distinguir carbón amorfo de nanotubos o grafeno. La dispersión peculiar de los electrones π del grafeno es la razón fundamental por la que la espectroscopía Raman del carbono es resonante y, por tanto, una prueba eficiente de sus propiedades electrónicas. Esto explica por qué se ha investigado la interpretación de los espectros Raman de estos materiales durante 40 años [138,139].

Las características principales del espectro Raman del carbono son los llamados picos G y D, que se encuentran sobre 1560 y 1360 cm^{-1} , respectivamente. El pico G aparece por el estiramiento del enlace de los pares de átomos sp^2 en anillos y cadenas. El pico D se debe a los modos de respiración de los átomos sp^2 de los anillos. En el grafeno aparece otro pico característico a 2700 cm^{-1} , llamado 2D porque aparece a una frecuencia parecida al doble del pico D.

Además de las frecuencias de estos picos, sus intensidades también sirven para caracterizar a los distintos tipos de carbono. El grafeno tiene un único pico 2D delgado y cuatro veces más intenso que el pico G. Sin embargo, en el grafito este pico aparece desdoblado en dos, cada uno siendo un cuarto y la mitad del pico G. Esto puede dar una indicación de que cuanto más estrecho es el pico 2D, más se acercará a una monocapa. La relación entre el pico D y G da información sobre la ordenación de los anillos en las capas. Cuanto mayor es el pico D, más desorden y defectos se encuentran en la capa.

5. Antecedentes bibliográficos de la determinación de antibióticos aminoglucósidos

Para el desarrollo de los métodos de evaluación de la seguridad alimentaria que se presentan en esta Memoria se han utilizado antibióticos aminoglucósidos (AAGs) como modelos de compuestos xenobióticos. A continuación, se describen brevemente diversos aspectos relacionados con estos compuestos y se comentan algunos métodos previamente descritos para su determinación.

El concepto de seguridad agroalimentaria presenta dos vertientes. Por una parte, se entiende como seguridad alimentaria la garantía del acceso físico y económico a suficientes alimentos y por otra, a la inocuidad de estos alimentos. En este sentido, las investigaciones realizadas se han centrado en la evaluación de la seguridad de la inocuidad de los alimentos ingeridos y cómo esta puede verse amenazada por elementos de riesgo. La seguridad alimentaria debe corroborarse en toda la cadena del proceso productivo del alimento, desde la siembra en el campo o la crianza de los animales hasta el consumo del producto final. Por tanto, es necesario evaluar la seguridad en todas etapas, necesitándose el desarrollo de metodologías analíticas que hagan posible esta evaluación.

Los agentes que amenazan la inocuidad de los alimentos pueden ser componentes propios del alimento, como factores antinutricionales o alérgenos, pero también pueden ser componentes externos del alimento, los llamados xenobióticos, o también agentes infecciosos, biotoxinas o tóxicos que aparecen durante el procesamiento de los alimentos. Dentro de los xenobióticos se pueden diferenciar aditivos y residuos de diferentes compuestos, como plaguicidas, pesticidas, fertilizantes o fármacos. Entre los residuos de fármacos considerados como xenobióticos, se encuentran los antibióticos y antimicrobianos, los tranquilizantes o las hormonas promotoras del crecimiento. Esta Memoria, como

se ha comentado, se centra en el estudio de algunos de estos xenobióticos, como son los AAGs, un tipo de fármaco que puede aparecer como residuos en muestras alimentarias de origen animal [140].

Los AAGs son agentes antibacterianos usados comúnmente en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram-negativas. Se pueden dividir entre diferentes clases según su estructura y biosíntesis. La estructura general consiste en un derivado inositol unido al menos a un aminoazúcar, conteniendo varios grupos hidroxilo libres y al menos dos grupos amino. Estos dos grupos son la clave para la unión con el ARN del ribosoma y así interfieren en la traducción de proteínas, cuyo resultado final es el daño estructural de la membrana celular.

El primer AAG descubierto fue la estreptomicina, que presenta una estreptamina guanidinilada en la posición 4 de una unidad disacárida. Hay pocos antibióticos que formen parte de esta clase. La clase más común presenta un esqueleto de 2-desoxiestreptamina y son derivados sintéticos de la paromamina. En esta clase se incluye la kanamicina, la neomicina y la gentamicina. La clase de la kanamicina consiste en un derivado sustituido en las posiciones 4 y 6 con una 3-aminoglucosa y 2-amino o 2,6-aminoglucosa. La clase de la neomicina tiene una o dos hexosas y una furanosa unida en la posición 4 y 5, y los grupos amino se presentan únicamente en las hexosas. La clase de la gentamicina presenta sustituciones en la posición 4 y 6 y dos hexosas. La mayoría de los AAGs clínicamente relevantes derivan de estas clases [141]. La **Figura 13** muestra las estructuras químicas de los cuatro AAGs que pertenecen a las cuatro clases más importantes, los cuales han sido estudiados en esta Memoria.

Estos antibióticos se han usado tanto en tratamientos humanos como veterinarios, para tratar infecciones del sistema urinario, tracto respiratorio, huesos, articulaciones y piel. Además, también se usan en suplementación alimentaria de animales de granja como promotores del crecimiento en forma de

aditivos y en control de plagas en jardinería. La administración oral de estos medicamentos para tratamiento de enfermedades no se utiliza, ya que no se absorben bien, y deben suministrarse por vía intramuscular (inyecciones), por la piel (cremas) o por los oídos y los ojos (gotas). Por otro lado, la toxicidad clínica de los AAGs con sus efectos secundarios graves, como nefrotoxicidad, ototoxicidad y toxicidad en el aparato digestivo y sistema nervioso siguen siendo una preocupación. Los antibióticos se acumulan en tejidos parenquimatosos, como la corteza renal, por unión a glicoproteínas. Además, puede causar daño fetal al pasar a través de la placenta [142]. Por ello, al realizar la terapia con estos antibióticos se debe hacer un seguimiento de su concentración en plasma, para saber la cantidad de AAGs que quedan en el cuerpo antes de la siguiente dosis [143].

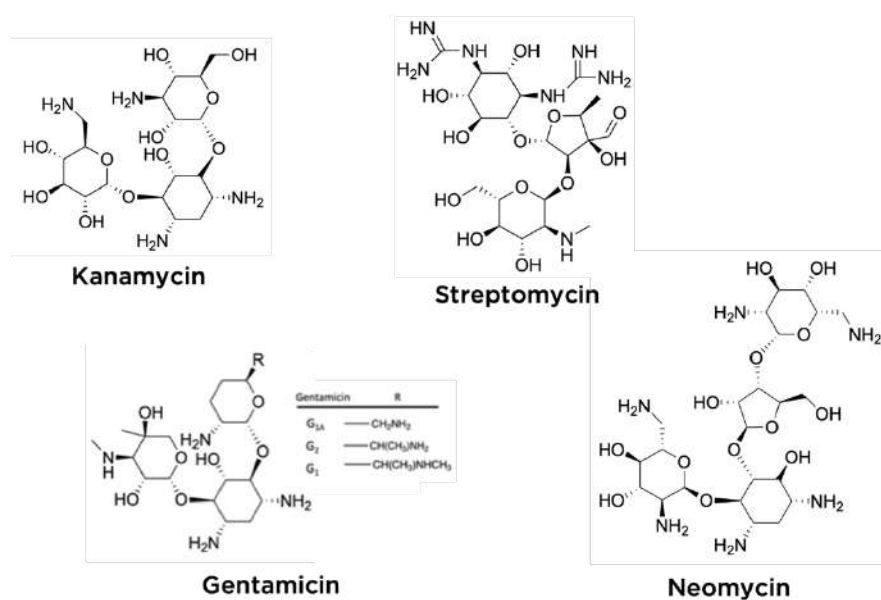


Figura 13. Estructuras químicas de los antibióticos aminoglucósidos estudiados.

Al ser medicamentos que se suministran a animales para tratarlos terapéuticamente, puede haber riesgo de sobredosis en el tratamiento del animal. Asimismo, tras la administración del fármaco a un animal tiene lugar un proceso

de metabolización que favorece su eliminación, por lo que es necesario establecer el intervalo de tiempo que debe transcurrir desde la administración hasta que puedan recogerse sus productos con objeto de que no queden residuos o éstos se encuentren por debajo de los límites máximos fijados para que su comercialización no constituya un riesgo para el consumidor. Si esto no se cumple y ocurre que restos de estos antibióticos lleguen como residuos en alimentos de procedencia animal al consumidor, pueden provocar un aumento de la resistencia bacteriana, además de poder producir alteraciones de la flora intestinal o inducir alergias en individuos sensibles. Además, en la industria alimentaria pueden provocar inhibición de algunos microorganismos de interés tecnológico [140]. Por estas razones, su dosis debe estar bien regulada.

La legislación Comunitaria establece que cualquier sustancia farmacológicamente activa empleada como medicamento en prácticas veterinarias debe ser evaluada antes de su autorización. El fin de esa evaluación es la designación de un parámetro que defina la máxima concentración permitida (MRL) de un residuo de fármaco por el uso de un producto medicinal en alimentos de origen animal. Este valor se basa en la especie animal y la cantidad del residuo considerando que no conlleve un riesgo toxicológico para la salud, teniendo en cuenta la dosis diaria admisible (ADI) o una ADI temporal con un factor de seguridad adicional. También se tiene en cuenta otros riesgos de salud pública relevantes, así como aspectos relacionados con la tecnología de los alimentos [144].

Estos MRL fueron establecidos por primera vez mediante el Reglamento (EEC) núm. 2377/90 del Consejo de Comunidades Europeas del 26 de junio de 1990, el cual fue posteriormente corregido y modificado hasta quedar finalmente derogado por el Reglamento (CE) núm. 470/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea [1]. En esta regulación se incluyen cuatro anexos que clasifican a las sustancias según se haya establecido un MRL de forma definitiva (Anexo I), las que debido a su inocuidad no necesitan que se

establezca un MRL (Anexo II), las sustancias a las que se les ha establecido un MRL provisional (Anexo III) y las sustancias prohibidas que no pueden establecerse MRL y, por ende, no pueden ser utilizadas en animales destinados a consumo humano (Anexo IV). En la **Tabla 7** se muestran los MRL de los antibióticos usados como analitos en el desarrollo experimental de esta Tesis Doctoral.

Tabla 7. Límites máximos de residuo de antibióticos en diversos productos de origen animal

Antibiótico	Origen animal (especies animales)	MRL, $\mu\text{g kg}^{-1}$	Diana
Kanamicina	Todas las especies productoras de alimentos	150	Leche
		100	Músculo
Estreptomicina	Bovino	200	Leche
	Porcino	500	Músculo
Gentamicina	Bovino	100	Leche
	Porcino	50	Músculo
Neomicina	Todas las especies productoras de alimentos	1500	Leche
		500	Músculo

Desde el punto de vista químico, estos compuestos se caracterizan por ser muy polares y solubles en agua. Esto puede tener un efecto negativo en el medio ambiente, ya que al ser excretados sin metabolizarse pueden disolverse en residuos y favorecer un aumento de la resistencia a estos antibióticos. Además, otra característica es que no presentan grupos cromóforos o fluoróforos en sus estructuras, por lo que su determinación fotométrica se debe realizar a longitudes de onda muy cortas en la zona UV con poca sensibilidad. Esto ha propiciado el desarrollado de otros métodos de detección de estos antibióticos.

Al llevar a cabo una reacción, puede que los reactivos no presenten fluorescencia. Sin embargo, al ser irradiados los productos, pasan a un estado excitado que al volver al estado fundamental emiten la energía en forma de radiación. Esta fluorescencia se puede monitorizar y relacionar con la

concentración de producto formado y, por consecuencia, con la concentración de alguno de los reactivos. De esta forma, se pueden hacer medidas de fluorescencia de analitos que por sí mismos no presentan fluorescencia intrínseca y que si no fuese por el uso de esta alternativa no se podrían monitorizar con métodos fluorescentes. Estas determinaciones son de gran interés en el ámbito agroalimentario, como se deduce del número de publicaciones recientes que abordan la determinación de xenobióticos en alimentos, como la determinación de nitratos, nitritos y nitrosaminas en alimentos, pesticidas o residuos de medicamentos veterinarios suministrados a animales destinados a consumo humano [145].

Se han descrito diversas metodologías analíticas para la determinación de AAGs. Como se determinan en muestras de origen biológico y agroalimentario, el tratamiento de muestra es una etapa limitante en estas metodologías. Los pasos generales de tratamiento de muestra implican la homogeneización de la muestra, la precipitación de proteínas usando ácidos o disolventes orgánicos, agitación mecánica o sonicación para liberar los AAGs adsorbidos en disolución, separación del precipitado de la fase líquida, limpieza de extractos mediante SPE, desgrasado con n-hexano y, posiblemente, etapas de preconcentración [143]. No siempre deben realizarse todos los tratamientos, dependerá del método de detección usado. Se han descrito procedimientos de limpieza basados en la precipitación de proteínas en disoluciones acuosa acidificadas, que además favorecen su extracción al ser solubles [146,147].

Los métodos más usados para la determinación de AAGs se basan en cromatografía de líquidos (LC) acoplada con varios detectores. Gracias a esta técnica se consigue la separación de los antibióticos previa a su detección y así analizar gran cantidad de antibióticos al mismo tiempo. Posterior a su separación cromatográfica, la detección de los antibióticos se lleva a cabo acoplando distintos detectores, como UV, de fluorescencia, espectrometría de masas, entre otros [148–150]. Estos métodos se caracterizan por su alta resolución,

selectividad y sensibilidad. Sin embargo, presentan desventajas, como el hecho de necesitar etapas de purificación y enriquecimiento, entre la que destaca SPE. Además, la alta polaridad de los AAGs y su carácter policationico puede causar problemas en la separación. El hecho de que no presenten grupos cromóforos o fluoróforos es un inconveniente cuando se realiza su detección, ya que para efectuar la detección directa con detectores UV o de fluorescencia podría haber muchas interferencias con la matriz de la muestra.

El uso de esta técnica necesita de instrumentación relativamente costosa y personal altamente capacitado. Para poder utilizar estos detectores para la determinación de AAGs se puede llevar a cabo una derivatización. Uno de los agentes derivatizantes más populares es el o-ftalaldehído (OPA). La derivatización con OPA se produce por la unión a grupos amino primarios del antibiótico, dando derivados muy fluorescentes [142,145].

Otra técnica utilizada para la separación de antibióticos aminoglucósidos para su después detección es la CE. Las ventajas que presenta esta técnica son el alto poder de resolución, la asequibilidad de la instrumentación y los tiempos de separación relativamente cortos. Sin embargo, presenta menor sensibilidad y selectividad que la cromatografía, además de la dificultad de acopar diversos detectores, como espectrometría de masas, debido a problemas de compatibilidad y la corta vida media de las columnas utilizadas. También presenta los mismos problemas que la anterior técnica, ya que se necesitaría derivatizar los aminoglucósidos para realizar su detección [142].

Los métodos espectrofotométricos y espectrofluorimétricos son métodos sencillos y no separativos, por lo que sirven en control rutinario. En general, los procesos analíticos incluyen una etapa de derivatización para poder detectar los AAGs. Al igual que en LC, se usa OPA como reactivo derivatizante. La reacción se ve aumentada cuando se encuentra en presencia de tioles, como 2-mercaptoetanol o N-acetilcisteína, ya que se forman derivados de isoindol

fluorescentes en medios alcalinos [145,151]. El esquema de esta reacción se muestra en la **Figura 14**.

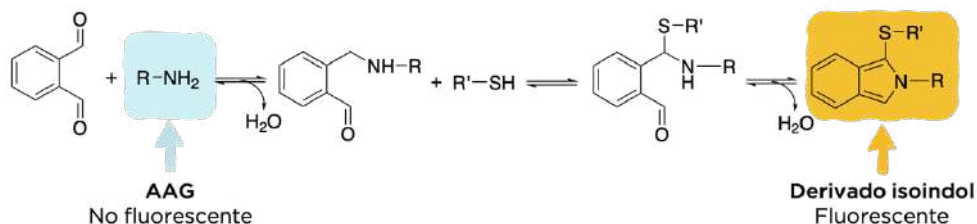


Figura 14. Mecanismo de formación del derivado isoindol fluorescente entre OPA, un AAG (R-NH₂) y un tiol (R'-SH).

Estos detectores también se pueden usar junto a sistemas microfluídicos para la determinación de antibióticos aminoglucósidos [96,152]. Con ello se consiguen las ventajas que presenta el uso de sistemas microfluídicos, como bajo consumo de muestra y reactivos, además de favorecer la portabilidad de los sistemas y tener un coste menor.

Los métodos inmunológicos, como fluoroinmunoensayo, radioinmunoensayo y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), para la determinación de AAGs también son métodos en los que no se usa la separación de los analitos. Presentan una alta sensibilidad y bajos valores de LOD. Estos métodos se basan en el reconocimiento de una molécula objetivo de los anticuerpos. La detección en estos métodos se puede realizar con detectores fotométricos o fluorimétricos [142].

Con el uso de NMs, se facilita la formación de sensores para la determinación de AAGs. Un sensor es un dispositivo en el que hay una etapa de reconocimiento de la molécula objetivo y una etapa de transducción de la señal en una señal detectable físicamente en el mismo dispositivo [153]. Se pueden formar biosensores para la determinación de AAGs si hay una etapa de reconocimiento de la molécula objetivo por inmovilización de los anticuerpos, como la unión de anticuerpos a AuNPs [154]. En estos biosensores también se

pueden inmovilizar otras moléculas de reconocimiento, como liposomas [155] o aptámeros, formando los llamados aptasensores. Estas moléculas, como ya se ha comentado, presentan ventajas respecto de los anticuerpos, como su bajo coste de producción y su alta estabilidad [156].

Los aptasensores se pueden fabricar con varios transductores sensibles a la masa, ópticos o electroquímicos. Dentro de los biosensores ópticos, los más usados han sido los basados en detección colorimétrica y fluorimétrica. Por ejemplo, el uso de AuNPs con aptámeros inmovilizados en los que se mide el cambio en el plasmón de resonancia [157] o la unión del aptámero a un fluoróforo que pierde su fluorescencia en presencia un agente que reduce su fluorescencia con el antibiótico [147,158,159]. Los aptasensores con detección electroquímica se basan en la inmovilización del aptámero marcado con una sonda redox en la superficie del electrodo [109].

Para no necesitar métodos de tratamiento de muestra, se han desarrollado diversos métodos, como los basados en detección del plasmón de resonancia superficial. La unión de detectores SPR da como resultado muchas aplicaciones de aptasensores y diferentes sistemas de LOC en las que se modifica el índice de refracción de la película y, en consecuencia, el ángulo de resonancia cuando se une el antibiótico al sensor [156].

La concentración de estos analitos puede tener unos niveles muy bajos en las muestras agroalimentarias y, debido a la complejidad de la matriz de estas muestras, se crea la necesidad de métodos más sensibles y selectivos para el control de la calidad agroalimentaria. Los LOD de las técnicas descritas hasta el momento y, por ende, los de las técnicas desarrolladas en la presente Tesis Doctoral, deben estar por debajo de los MRL descritos en la legislación. Asimismo, se deben conocer las características de los NMs utilizados en el desarrollo de estos métodos y las variables implicadas en las plataformas analíticas con las que se determinan estos analitos. Es en este sentido donde se

han pretendido que los resultados de la presente Tesis Doctoral realicen su aportación.

Referencias

- [1] Reglamento (CE) No 470/2009 del Parlamento Europeo Y del Consejo de 6 de mayo de 2009 por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen , D. Of. La Unión Eur. L 152 (2009) 11–22.
- [2] R.P. Feynman, There's Plenty of Room at the Bottom: An invitation to enter a new field of physics, *Eng. Sci.* 23 (1960) 22–36.
- [3] E.K. Drexler, *Molecular Machinery and Manufacturing With Applications to Computation*, Massachusetts Institute of Technology, 1991.
- [4] R. Lucena, B.M. Simonet, S. Cárdenas, M. Valcárcel, Potential of nanoparticles in sample preparation, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 620–637. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.069>.
- [5] C. Briones, E. Casero, J. Martín, P. Serena, *Nanociencia y Nanotecnología. Entre la ciencia ficción del presente y la tecnología del futuro*, 2009.
- [6] F.A. Khan, *Applications of nanomaterials in human health*, Springer Singapore, 2020. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-4802-4>.
- [7] C. Dhand, N. Dwivedi, X.J. Loh, A.N. Jie Ying, N.K. Verma, R.W. Beuerman, R. Lakshminarayanan, S. Ramakrishna, Methods and strategies for the synthesis of diverse nanoparticles and their applications: A comprehensive overview, *RSC Adv.* 5 (2015) 105003–105037. <https://doi.org/10.1039/c5ra19388e>.

-
- [8] T.A. Saleh, Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities, *Environ. Technol. Innov.* 20 (2020) 101067. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101067>.
- [9] S. Anees Ahmad, S. Sachi Das, A. Khatoon, M. Tahir Ansari, M. Afzal, M. Saquib Hasnain, A. Kumar Nayak, Bactericidal activity of silver nanoparticles: A mechanistic review, *Mater. Sci. Energy Technol.* 3 (2020) 756–769. <https://doi.org/10.1016/j.mset.2020.09.002>.
- [10] Q. Peng, N. Wang, Y. Zhu, J. Hu, H. Peng, L. Li, B. Zheng, J. Du, D. Xiao, Hydrophobic AgNPs: One-step synthesis in aqueous solution and their greatly enhanced performance for SERS detection, *J. Mater. Chem. C* 7 (2019) 10465–10470. <https://doi.org/10.1039/c9tc03143j>.
- [11] I. de la Calle, I. Lavilla, H. Bartolomé-Alonso, C. Bendicho, Solid-phase extraction of Hg(II) using cellulose filters modified with silver nanoparticles followed by pyrolysis and detection by a direct mercury analyzer, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 161 (2019) 105697. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2019.105697>.
- [12] A. Mageswari, R. Srinivasan, P. Subramanian, N. Ramesh, K.M. Gothandam, Nanomaterials: Classification, Biological Synthesis and Characterization, in: S. Ranjan, N. Dasgupta, E. Lichtfouse (Eds.), *Nanosci. Food Agric.* 3, Springer International Publishing, Cham, 2016: pp. 31–71. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48009-1_2.
- [13] J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier, A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discuss. Faraday Soc.* 11 (1951) 55–75.
- [14] H. Aldewachi, T. Chalati, M.N. Woodroffe, N. Bricklebank, B. Sharrack, P. Gardiner, Gold nanoparticle-based colorimetric biosensors, *Nanoscale*. 10 (2018) 18–33. <https://doi.org/10.1039/c7nr06367a>.
-

- [15] M. Sierra-Rodero, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Determination of N-acetylcysteine via its effect on the aggregation of gold nanoparticles, *Microchim. Acta.* 173 (2011) 11–17. <https://doi.org/10.1007/s00604-010-0542-7>.
- [16] Q. Xiao, H. Gao, C. Lu, Q. Yuan, Gold nanoparticle-based optical probes for sensing aminothiols, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 40 (2012) 64–76. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.07.017>.
- [17] S. Hong, X. Li, Optimal size of gold nanoparticles for surface-enhanced Raman spectroscopy under different conditions, *J. Nanomater.* 2013 (2013). <https://doi.org/10.1155/2013/790323>.
- [18] S.A.C. Carabineiro, Supported Gold Nanoparticles as Catalysts for the Oxidation of Alcohols and Alkanes, *Front. Chem.* 7 (2019). <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00702>.
- [19] V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Gold nanoparticle-biotinylated liposome hybrids as analytical reagents for biotin determination using a competitive assay and resonance light scattering detection., *Talanta.* 99 (2012) 538–543. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.06.029>.
- [20] X.M. Ma, M. Sun, Y. Lin, Y.J. Liu, F. Luo, L.H. Guo, B. Qiu, Z.Y. Lin, G.N. Chen, Progress of Visual Biosensor Based on Gold Nanoparticles, *Chinese J. Anal. Chem.* 46 (2018) 1–10. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(17\)61061-2](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(17)61061-2).
- [21] K. Mahato, S. Nagpal, M.A. Shah, A. Srivastava, P.K. Maurya, S. Roy, A. Jaiswal, R. Singh, P. Chandra, Gold nanoparticle surface engineering strategies and their applications in biomedicine and diagnostics, *3 Biotech.* 9 (2019) 57. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1577-z>.
- [22] J.M. George, A. Antony, B. Mathew, Metal oxide nanoparticles in

- electrochemical sensing and biosensing: a review, *Microchim. Acta.* 185 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00604-018-2894-3>.
- [23] A. Raghunath, E. Perumal, Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 49 (2017) 137–152. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.11.011>.
- [24] F.A. Casado-Carmona, R. Lucena, S. Cárdenas, Magnetic paper-based sorptive phase for enhanced mass transference in stir membrane environmental samplers, *Talanta.* 228 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122217>.
- [25] S. Arsalani, E.J. Guidelli, M.A. Silveira, C.E.G. Salmon, J.F.D.F. Araujo, A.C. Bruno, O. Baffa, Magnetic Fe₃O₄ nanoparticles coated by natural rubber latex as MRI contrast agent, *J. Magn. Magn. Mater.* 475 (2019) 458–464. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2018.11.132>.
- [26] C. Frigerio, D.S.M. Ribeiro, S.S.M. Rodrigues, V.L.R.G. Abreu, J.A.C. Barbosa, J.A.V. Prior, K.L. Marques, J.L.M. Santos, Application of quantum dots as analytical tools in automated chemical analysis: A review, *Anal. Chim. Acta.* 735 (2012) 9–22. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.04.042>.
- [27] M. Mohan Gokhale, R. Ravindra Somani, Fullerenes: Chemistry and Its Applications, *Mini. Rev. Org. Chem.* 12 (2015) 355–366. <https://doi.org/10.2174/1570193x12666150930224428>.
- [28] S. Naqvi, V. Kumar, P. Gopinath, Chapter 11 - Nanomaterial Toxicity: A Challenge to End Users, in: S. Mohan Bhagyaraj, O.S. Oluwafemi, N. Kalarikkal, S. Thomas (Eds.), *Appl. Nanomater.*, Woodhead Publishing, 2018: pp. 315–343. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101971-9.00012-0>.
- [29] Z. Liu, L. Lin, H. Ren, X. Sun, Chapter 2 - CVD Synthesis of Graphene,

- in: G. Zhang (Ed.), *Therm. Transp. Carbon-Based Nanomater.*, Elsevier, 2017: pp. 19–56. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-32-346240-2.00002-9>.
- [30] W.S. Hummers, R.E. Offeman, Preparation of Graphitic Oxide, *J. Am. Chem. Soc.* 80 (1958) 1339. <https://doi.org/10.1021/ja01539a017>.
- [31] A. Zöpfl, M.M. Lemberger, M. König, G. Ruhl, F.M. Matysik, T. Hirsch, Reduced graphene oxide and graphene composite materials for improved gas sensing at low temperature, *Faraday Discuss.* 173 (2014) 403–414. <https://doi.org/10.1039/c4fd00086b>.
- [32] S. Ge, F. Lan, F. Yu, J. Yu, Applications of graphene and related nanomaterials in analytical chemistry, *New J. Chem.* 39 (2015) 2380–2395. <https://doi.org/10.1039/C4NJ01783H>.
- [33] W.J. Cheong, S.H. Yang, F. Ali, Molecular imprinted polymers for separation science: A review of reviews, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 609–628. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200784>.
- [34] J.T. García, S.D. Agüero, Fosfolípidos: Propiedades y efectos sobre la salud, *Nutr. Hosp.* 31 (2015) 76–83. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.1.7961>.
- [35] G. Liu, S. Hou, P. Tong, J. Li, Liposomes: Preparation, Characteristics, and Application Strategies in Analytical Chemistry, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 0 (2020) 1–21. <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1805293>.
- [36] A. Gómez-Hens, J. Manuel Fernández-Romero, The role of liposomes in analytical processes, *TrAC Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.07.017>.
- [37] V. Sánchez-López, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Evaluation of liposome populations using a sucrose density gradient centrifugation approach coupled to a continuous flow system, *Anal.*

-
- Chim. Acta. 645 (2009) 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.04.045>.
- [38] K.A. Edwards, A.J. Baeumner, Liposomes in analyses, *Talanta*. 68 (2006) 1421–1431. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.08.044>.
- [39] T.M. Allen, P.R. Cullis, Liposomal drug delivery systems : From concept to clinical applications ☆, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.037>.
- [40] J.O. Eloy, M. Claro de Souza, R. Petrilli, J.P.A. Barcellos, R.J. Lee, J.M. Marchetti, Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 123 (2014) 345–363. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.09.029>.
- [41] R. Kumar, Chapter 8 - Lipid-Based Nanoparticles for Drug-Delivery Systems, in: S.S. Mohapatra, S. Ranjan, N. Dasgupta, R.K. Mishra, S. Thomas (Eds.), *Nanocarriers Drug Deliv.*, Elsevier, 2019: pp. 249–284. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814033-8.00008-4>.
- [42] M.A. Macchione, C. Biglione, M. Strumia, Design, synthesis and architectures of hybrid nanomaterials for therapy and diagnosis applications, *Polymers (Basel)*. 10 (2018) 1–34. <https://doi.org/10.3390/polym10050527>.
- [43] A. V Povolotskaya, A. V Povolotskiy, A.A. Manshina, Hybrid nanostructures: synthesis, morphology and functional properties, *Russ. Chem. Rev.* 84 (2015) 579–600. <https://doi.org/10.1070/rcr4487>.
- [44] M. Benelmekki, M. Benelmekki, An introduction to nanoparticles and nanotechnology, *Des. Hybrid Nanoparticles*. 2017 (2014). <https://doi.org/10.1088/978-1-6270-5469-0ch1>.
- [45] A.I. López-Lorente, B.M. Simonet, M. Valcárcel, Analytical potential of hybrid nanoparticles, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 43–54.
-

- <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4110-0>.
- [46] S.C. McBain, H.H.P. Yiu, J. Dobson, Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery, *Int. J. Nanomedicine*. 3 (2008) 169–180. <https://doi.org/10.2147/ijn.s1608>.
- [47] H. Fattahi, S. Laurent, F. Liu, N. Arsalani, L. Vander Elst, R.N. Muller, Magnetoliposomes as multimodal contrast agents for molecular imaging and cancer nanotheragnostics, *Nanomedicine*. 6 (2011) 529–544. <https://doi.org/10.2217/nnm.11.14>.
- [48] M. Namdari, M. Cheraghi, B. Negahdari, A. Eatemadi, H. Daraee, Recent advances in magnetoliposome for heart drug delivery, *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 45 (2017) 1051–1057. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1299159>.
- [49] V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Fluorometric Determination of Alkaline Phosphatase Activity in Food Using Magnetoliposomes as On-flow Microcontainer Devices, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 1819–1825. <https://doi.org/10.1021/jf5004804>.
- [50] V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Automatic determination of coenzyme Q10 in food using cresyl violet encapsulated into magnetoliposomes, *Food Chem.* 221 (2017) 864–870. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.085>.
- [51] V. Román-Pizarro, A. Gómez-Hens, J.M. Fernández-Romero, Applicability of Fluorescent Hybrid Magnetoliposomes for the Determination of Reactive Oxygen Compounds in Food, *Food Anal. Methods*. 11 (2018) 2376–2383. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1220-3>.
- [52] T. Mudalige, H. Qu, D. Van Haute, S.M. Ansar, A. Paredes, T. Ingle, *Characterization of Nanomaterials: Tools and Challenges*, Elsevier Inc.,

2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814130-4.00011-7>.
- [53] S. Süß, C. Metzger, C. Damm, D. Segets, W. Peukert, Quantitative evaluation of nanoparticle classification by size-exclusion chromatography, *Powder Technol.* 339 (2018) 264–272. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.08.008>.
- [54] L. Pitkänen, A.M. Striegel, Size-exclusion chromatography of metal nanoparticles and quantum dots, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 80 (2016) 311–320. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.06.013>.
- [55] A. Güven, M. Ortiz, M. Constanti, C.K. O’Sullivan, Rapid and efficient method for the size separation of homogeneous fluorescein-encapsulating liposomes, *J. Liposome Res.* 19 (2009) 148–154. <https://doi.org/10.1080/08982100802674419>.
- [56] C. Grabielle-Madelmont, S. Lesieur, M. Ollivon, Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography, *J. Biochem. Biophys. Methods.* 56 (2003) 189–217. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(03\)00059-9](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(03)00059-9).
- [57] E.P. Gray, T.A. Bruton, C.P. Higgins, R.U. Halden, P. Westerhoff, J.F. Ranville, Analysis of gold nanoparticle mixtures: A comparison of hydrodynamic chromatography (HDC) and asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) coupled to ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1532–1539. <https://doi.org/10.1039/c2ja30069a>.
- [58] J.P.F.G. Helsper, R.J.B. Peters, L. Brouwer, S. Weigel, Characterisation and quantification of liposome-type nanoparticles in a beverage matrix using hydrodynamic chromatography and MALDI-TOF mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 1181–1189. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6530-5>.
- [59] S. Kumar, M.D. Bolan, T.P. Bigioni, Glutathione-Stabilized Magic-

- Number Silver Cluster Compounds, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 13141–13143. <https://doi.org/10.1021/ja105836b>.
- [60] M. Hanauer, S. Pierrat, I. Zins, A. Lotz, C. Sönnichsen, Separation of nanoparticles by gel electrophoresis according to size and shape, *Nano Lett.* 7 (2007) 2881–2885. <https://doi.org/10.1021/nl071615y>.
- [61] A.A. Kokorina, A. V. Sapelkin, G.B. Sukhorukov, I.Y. Goryacheva, Luminescent carbon nanoparticles separation and purification, *Adv. Colloid Interface Sci.* 274 (2019) 102043. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102043>.
- [62] U. Franzen, T.T.T.N. Nguyen, C. Vermehren, B. Gammelgaard, J. Østergaard, Characterization of a liposome-based formulation of oxaliplatin using capillary electrophoresis: Encapsulation and leakage, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55 (2011) 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.12.037>.
- [63] U. Pyell, Characterization of nanoparticles by capillary electromigration separation techniques, *Electrophoresis.* 31 (2010) 814–831. <https://doi.org/10.1002/elps.200900555>.
- [64] S.N. Podoyntsyn, O.N. Sorokina, A.L. Kovarski, I.I. Levin, S.B. Simakin, High-Gradient Magnetic Separation of Nanoparticles with Ferromagnetic Track-Etched Membrane, *IEEE Trans. Magn.* 54 (2018) 2300508. <https://doi.org/10.1109/TMAG.2018.2797918>.
- [65] C.-R. Arlt, D. Brekel, M. Franzreb, Continuous fractionation of nanoparticles based on their magnetic properties applying simulated moving bed chromatography, *Sep. Purif. Technol.* 259 (2020) 118123. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.118123>.
- [66] C.R. Arlt, A. Tschöpe, M. Franzreb, Size fractionation of magnetic nanoparticles by magnetic chromatography, *J. Magn. Magn. Mater.* 497

- (2020) 165967. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2019.165967>.
- [67] N. Alele, R. Streubel, L. Gamrad, S. Barcikowski, M. Ulbricht, Ultrafiltration membrane-based purification of bioconjugated gold nanoparticle dispersions, *Sep. Purif. Technol.* 157 (2016) 120–130. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.11.033>.
- [68] M. Palencia, B.L. Rivas, H. Valle, Size separation of silver nanoparticles by dead-end ultrafiltration: Description of fouling mechanism by pore blocking model, *J. Memb. Sci.* 455 (2014) 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2013.12.051>.
- [69] S.O. Majekodunmi, A Review on Centrifugation in the Pharmaceutical Industry, *Am. J. Biomed. Eng.* 5 (2015) 67–78. <https://doi.org/10.5923/j.ajbe.20150502.03>.
- [70] P. Qiu, C. Mao, Viscosity gradient as a novel mechanism for the centrifugation-based separation of nanoparticles, *Adv. Mater.* 23 (2011) 4880–4885. <https://doi.org/10.1002/adma.201102636>.
- [71] B. Xiong, J. Cheng, Y. Qiao, R. Zhou, Y. He, E.S. Yeung, Separation of nanorods by density gradient centrifugation, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 3823–3829. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.038>.
- [72] M. Li, V.I. Slaveykova, A density gradient centrifugation method for rapid separation of nanoTiO₂ and TiO₂ aggregates from microalgal cells in complex mixtures with mercury, *MethodsX.* 7 (2020) 101057. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.101057>.
- [73] D. Steinigeweg, M. Schütz, M. Salehi, S. Schlücker, Fast and cost-effective purification of gold nanoparticles in the 20-250 nm size range by continuous density gradient centrifugation, *Small.* 7 (2011) 2443–2448. <https://doi.org/10.1002/sml.201100663>.
- [74] S. Li, Z. Chang, J. Liu, L. Bai, L. Luo, X. Sun, Separation of gold

- nanorods using density gradient ultracentrifugation, *Nano Res.* 4 (2011) 723–728. <https://doi.org/10.1007/s12274-011-0128-7>.
- [75] L. Bai, X. Ma, J. Liu, X. Sun, D. Zhao, D.G. Evans, Rapid separation and purification of nanoparticles in organic density gradients, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 2333–2337. <https://doi.org/10.1021/ja908971d>.
- [76] Y. Chang, P.H. Hsieh, C.C.K. Chao, The efficiency of Percoll and Ficoll density gradient media in the isolation of marrow derived human mesenchymal stem cells with osteogenic potential, *Chang Gung Med. J.* 32 (2009) 264–275.
- [77] O. Akbulut, C.R. MacE, R. V. Martinez, A.A. Kumar, Z. Nie, M.R. Patton, G.M. Whitesides, Separation of nanoparticles in aqueous multiphase systems through centrifugation, *Nano Lett.* 12 (2012) 4060–4064. <https://doi.org/10.1021/nl301452x>.
- [78] C. Contado, Field flow fractionation techniques to explore the “nano-world,” *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 2501–2518. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0180-6>.
- [79] B. Meisterjahn, S. Wagner, F. von der Kammer, D. Hennecke, T. Hofmann, Silver and gold nanoparticle separation using asymmetrical flow-field flow fractionation: Influence of run conditions and of particle and membrane charges, *J. Chromatogr. A.* 1440 (2016) 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.02.059>.
- [80] S. Dubascoux, F. Von Der Kammer, I. Le Hécho, M.P. Gautier, G. Lespes, Optimisation of asymmetrical flow field flow fractionation for environmental nanoparticles separation, *J. Chromatogr. A.* 1206 (2008) 160–165. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.07.032>.
- [81] M. Marioli, W.T. Kok, Continuous asymmetrical flow field-flow fractionation for the purification of proteins and nanoparticles, *Sep.*

-
- Purif. Technol. 242 (2020).
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.116744>.
- [82] G.B. Adkins, E. Sun, R. Coreas, W. Zhong, Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation Coupled to Nanoparticle Tracking Analysis for Rapid Online Characterization of Nanomaterials, *Anal. Chem.* 92 (2020) 7071–7078. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00406>.
- [83] A. Zattoni, B. Roda, F. Borghi, V. Marassi, P. Reschiglian, Flow field-flow fractionation for the analysis of nanoparticles used in drug delivery, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 87 (2014) 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.08.018>.
- [84] J. Britton, T.F. Jamison, The assembly and use of continuous flow systems for chemical synthesis, *Nat. Protoc.* 12 (2017) 2423–2446. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.102>.
- [85] L.R. Snyder, Continuous-flow analysis: present and future, *Anal. Chim. Acta.* 114 (1980) 3–18. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)84276-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)84276-8).
- [86] A. Criado, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel, Continuous flow spectrophotometric determination of paracetamol in pharmaceuticals following continuous microwave assisted alkaline hydrolysis, *Talanta.* 53 (2000) 417–423. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(00\)00509-9](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(00)00509-9).
- [87] M. Bigler, A. Svensson, E. Kettner, P. Vallenga, M.E. Nielsen, Jø.P. Steffensen, Optimization of high-resolution continuous flow analysis for transient climate signals in ice cores, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 4483–4489. <https://doi.org/10.1021/es200118j>.
- [88] G.M. Whitesides, The origins and the future of microfluidics, *Nature.* 442 (2006) 368–373. <https://doi.org/10.1038/nature05058>.
- [89] A. Gómez-Hens, J.M. Fernández-Romero, *Microfluidic Systems in*
-

- Analytical Chemistry, *Encycl. Anal. Chem.* (2017) 1–20. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9591>.
- [90] S.C. Terry, J.H. Herman, J.B. Angell, A Gas Chromatographic Air Analyzer Fabricated on a Silicon Wafer, *IEEE Trans. Electron Devices*. 26 (1979) 1880–1886. <https://doi.org/10.1109/T-ED.1979.19791>.
- [91] D.B. Weibel, G.M. Whitesides, Applications of microfluidics in chemical biology, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10 (2006) 584–591. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.10.016>.
- [92] N.-T. Nguyen, S.T. Wereley, *Fundamentals and Applications of Microfluidics*, Second Edi, Artech House, Norwood, MA, USA, 2006.
- [93] D.E. Angelescu, *Highly Integrated Microfluidics Design*, Artech House, Norwood, MA, USA, 2011. <https://doi.org/10.1117/12.764028>.
- [94] Z. Ramshani, F. Fan, A. Wei, M. Romanello-Giroud-Joaquim, C.H. Gil, M. George, M.C. Yoder, D. Hanjaya-Putra, S. Senapati, H.C. Chang, A multiplexed immuno-sensor for on-line and automated monitoring of tissue culture protein biomarkers, *Talanta*. 225 (2021) 122021. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.122021>.
- [95] L. Xu, H. Qu, D.G. Alonso, Z. Yu, Y. Yu, Y. Shi, C. Hu, T. Zhu, N. Wu, F. Shen, Portable integrated digital PCR system for the point-of-care quantification of BK virus from urine samples, *Biosens. Bioelectron.* 175 (2021) 112908. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112908>.
- [96] M. Sierra-Rodero, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Determination of aminoglycoside antibiotics using an on-chip microfluidic device with chemiluminescence detection, *Microchim. Acta*. 179 (2012) 185–192. <https://doi.org/10.1007/s00604-012-0878-2>.
- [97] M. Sierra-Rodero, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Determination of fluoroquinolone antibiotics by microchip capillary

- electrophoresis along with time-resolved sensitized luminescence of their terbium(III) complexes, *Microchim. Acta.* 181 (2014) 1897–1904. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1266-x>.
- [98] B.K. Gale, A.R. Jafek, C.J. Lambert, B.L. Goenner, H. Moghimifam, U.C. Nze, S.K. Kamarapu, A review of current methods in microfluidic device fabrication and future commercialization prospects, *Inventions.* 3 (2018). <https://doi.org/10.3390/inventions3030060>.
- [99] P. Kim, K.W. Kwon, M.C. Park, S.H. Lee, S.M. Kim, K.Y. Suh, Soft lithography for microfluidics: A Review, *Biochip J.* 2 (2008) 1–11.
- [100] B.L. Thompson, Y. Ouyang, G.R.M. Duarte, E. Carrilho, S.T. Krauss, J.P. Landers, Inexpensive, rapid prototyping of microfluidic devices using overhead transparencies and a laser print, cut and laminate fabrication method, *Nat. Protoc.* 10 (2015) 875–886. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.051>.
- [101] Y. Li, J.D. Motschman, S.T. Kelly, B.B. Yellen, Injection molded microfluidics for establishing high-density single cell arrays in an open hydrogel format, *Anal. Chem.* 92 (2020) 2794–2801. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05099>.
- [102] R.D. Sochol, E. Sweet, C.C. Glick, S.Y. Wu, C. Yang, M. Restaino, L. Lin, 3D printed microfluidics and microelectronics, *Microelectron. Eng.* 189 (2018) 52–68. <https://doi.org/10.1016/j.mee.2017.12.010>.
- [103] G.C. Ma, W.H. Lin, C.E. Huang, T.Y. Chang, J.Y. Liu, Y.J. Yang, M.H. Lee, W.J. Wu, Y.S. Chang, M. Chen, A silicon-based coral-like nanostructured microfluidics to isolate rare cells in human circulation: Validation by SK-BR-3 cancer cell line and its utility in circulating fetal nucleated red blood cells, *Micromachines.* 10 (2019). <https://doi.org/10.3390/mi10020132>.

- [104] A. Nilghaz, L. Guan, W. Tan, W. Shen, Advances of Paper-Based Microfluidics for Diagnostics - The Original Motivation and Current Status, *ACS Sensors*. 1 (2016) 1382–1393. <https://doi.org/10.1021/acssensors.6b00578>.
- [105] T. Wang, J. Chen, T. Zhou, L. Song, Fabricating microstructures on glass for microfluidic chips by glass molding process, *Micromachines*. 9 (2018) 1–15. <https://doi.org/10.3390/mi9060269>.
- [106] E. Gal-Or, Y. Gershoni, G. Scotti, S.M.E. Nilsson, J. Saarinen, V. Jokinen, C.J. Strachan, G. Boije Af Gennäs, J. Yli-Kauhaluoma, T. Kotiaho, Chemical analysis using 3D printed glass microfluidics, *Anal. Methods*. 11 (2019) 1802–1810. <https://doi.org/10.1039/c8ay01934g>.
- [107] N. Wongkaew, M. Simsek, C. Griesche, A.J. Baeumner, Functional Nanomaterials and Nanostructures Enhancing Electrochemical Biosensors and Lab-on-a-Chip Performances: Recent Progress, Applications, and Future Perspective, *Chem. Rev.* 119 (2019) 120–194. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00172>.
- [108] J. Sengupta, C.M. Hussain, Graphene and its derivatives for Analytical Lab on Chip platforms, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 114 (2019) 326–337. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.03.015>.
- [109] K. Zhang, N. Gan, F. Hu, X. Chen, T. Li, J. Cao, Microfluidic electrophoretic non-enzymatic kanamycin assay making use of a stirring bar functionalized with gold-labeled aptamer, of a fluorescent DNA probe, and of signal amplification via hybridization chain reaction, *Microchim. Acta*. 185 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2635-z>.
- [110] P. Zuo, X. Li, D.C. Dominguez, B.C. Ye, A PDMS/paper/glass hybrid microfluidic biochip integrated with aptamer-functionalized graphene

- oxide nano-biosensors for one-step multiplexed pathogen detection, *Lab Chip*. 13 (2013) 3921–3928. <https://doi.org/10.1039/c3lc50654a>.
- [111] M. Sierra-Rodero, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Strategies to improve the analytical features of microfluidic methods using nanomaterials, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 57 (2014) 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.01.006>.
- [112] A.T. Reiner, N.G. Ferrer, P. Venugopalan, R.C. Lai, S.K. Lim, J. Dostálek, Magnetic nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance biosensor for extracellular vesicle analysis, *Analyst*. 142 (2017) 3913–3921. <https://doi.org/10.1039/c7an00469a>.
- [113] C. Fenzl, C. Genslein, C. Domonkos, K.A. Edwards, T. Hirsch, A.J. Baeumner, Investigating non-specific binding to chemically engineered sensor surfaces using liposomes as models, *Analyst*. 141 (2016) 5265–5273. <https://doi.org/10.1039/c6an00820h>.
- [114] N. Babincová, P. Sourivong, P. Babinec, C. Bergemann, M. Babincová, Š. Durdík, Applications of magnetoliposomes with encapsulated doxorubicin for integrated chemotherapy and hyperthermia of rat C6 glioma, *Zeitschrift Fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 73 (2018) 265–271. <https://doi.org/10.1515/znc-2017-0110>.
- [115] E.D. Olsen, *Métodos ópticos de análisis*, Editorial Reverté, Barcelona, 1990.
- [116] Á. Ríos Castro, M.C. Moreno Bondi, B.M. Simonet Suau, *Técnicas espectroscópicas en química analítica*, Síntesis, Madrid, 2012.
- [117] R. Almeida, *Lecture 18: Rayleigh and Mie Scattering, Colloidal Metals and Photo-elastic Properties*, (2005).
- [118] I.P.A. Morais, I. V. Tóth, A.O.S.S. Rangel, Turbidimetric and nephelometric flow analysis: Concepts and applications, *Spectrosc. Lett.*

- 39 (2006) 547–579. <https://doi.org/10.1080/00387010600824629>.
- [119] W. Lu, B.S. Fernández Band, Y. Yu, Q. Geng Li, J. Chuan Shang, C. Wang, Y. Fang, R. Tian, L. Ping Zhou, L. Li Sun, Y. Tang, S. Hua Jing, W. Huang, J. Ping Zhang, Resonance light scattering and derived techniques in analytical chemistry: Past, present, and future, *Microchim. Acta.* 158 (2007) 29–58. <https://doi.org/10.1007/s00604-006-0670-2>.
- [120] Z.P. Li, X.R. Duan, C.H. Liu, B.A. Du, Selective determination of cysteine by resonance light scattering technique based on self-assembly of gold nanoparticles, *Anal. Biochem.* 351 (2006) 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.01.038>.
- [121] H.Y. Wang, Y.F. Li, C.Z. Huang, Detection of ferulic acid based on the plasmon resonance light scattering of silver nanoparticles, *Talanta.* 72 (2007) 1698–1703. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.02.028>.
- [122] M. Ahmadi, T. Madrakian, A. Afkhami, Molecularly imprinted polymer coated magnetite nanoparticles as an efficient mefenamic acid resonance light scattering nanosensor, *Anal. Chim. Acta.* 852 (2014) 250–256. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.09.039>.
- [123] J. Han, K. Burgess, Fluorescent indicators for intracellular pH, *Chem. Rev.* 110 (2010) 2709–2728. <https://doi.org/10.1021/cr900249z>.
- [124] K. Rurack, M. Spieles, Fluorescence quantum yields of a series of red and near-infrared dyes emitting at 600-1000 nm, *Anal. Chem.* 83 (2011) 1232–1242. <https://doi.org/10.1021/ac101329h>.
- [125] A.M. Brouwer, Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* 83 (2011) 2213–2228. <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-10-09-31>.
- [126] L.G. Lee, G.M. Berry, C. Chen, Vita blue: A new 633-nm excitable fluorescent dye for cell analysis, *Cytometry.* 10 (1989) 151–164.

- <https://doi.org/10.1002/cyto.990100206>.
- [127] A. Gómez-Hens, M.P. Aguilar-Caballos, Long-wavelength fluorophores: New trends in their analytical use, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 127–136. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(04\)00305-X](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(04)00305-X).
- [128] J. Fan, L. Ding, Y. Fang, Surfactant Aggregates Encapsulating and Modulating: An Effective Way to Generate Selective and Discriminative Fluorescent Sensors, *Langmuir*. 35 (2019) 326–341. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02111>.
- [129] P. Pattnaik, Surface plasmon resonance: Applications in understanding receptor-ligand interaction, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 126 (2005) 79–92. <https://doi.org/10.1385/abab:126:2:079>.
- [130] B. Liedberg, I. Lundström, E. Stenberg, Principles of biosensing with an extended coupling matrix and surface plasmon resonance, *Sensors Actuators B. Chem.* 11 (1993) 63–72. [https://doi.org/10.1016/0925-4005\(93\)85239-7](https://doi.org/10.1016/0925-4005(93)85239-7).
- [131] R.B.M. Schasfoort, Introduction to Surface Plasmon Resonance, in: R.B.M. Schasfoort (Ed.), *Handb. Surf. Plasmon Reson.*, 2nd ed., The Royal Society of Chemistry, 2017: pp. 1–26. <https://doi.org/10.1039/9781788010283-00001>.
- [132] A. Blidar, B. Feier, M. Tertis, R. Galatus, C. Cristea, Electrochemical surface plasmon resonance (EC-SPR) aptasensor for ampicillin detection, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 1053–1065. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1533-5>.
- [133] N.A.S. Omar, Y.W. Fen, S. Saleviter, W.M.E.M.M. Daniyal, N.A.A. Anas, N.S.M. Ramdzan, M.D.A. Roshidi, Development of a graphene-based surface plasmon resonance optical sensor chip for potential biomedical application, *Materials (Basel)*. 12 (2019).

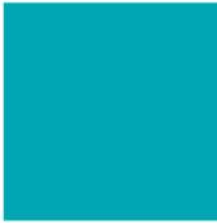
- <https://doi.org/10.3390/ma12121928>.
- [134] N.F. Chiu, C.T. Kuo, C.Y. Chen, High-affinity carboxyl-graphene oxide-based SPR aptasensor for the detection of hCG protein in clinical serum samples, *Int. J. Nanomedicine*. 14 (2019) 4833–4847. <https://doi.org/10.2147/IJN.S208292>.
- [135] L. Wang, C. Zhu, L. Han, L. Jin, M. Zhou, S. Dong, Label-free, regenerative and sensitive surface plasmon resonance and electrochemical aptasensors based on graphene, *Chem. Commun.* 47 (2011) 7794–7796. <https://doi.org/10.1039/c1cc11373a>.
- [136] N.J. de Mol, M.J.E. Fischer, *Surface Plasmon Resonance: Methods and Protocols*, 2010. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-670-2>.
- [137] R.B.M. Schasfoort, *Surface Plasmon Resonance Instruments*, in: R.B.M. Schasfoort (Ed.), *Handb. Surf. Plasmon Reson.*, 2nd ed., The Royal Society of Chemistry, 2017: pp. 60–105. <https://doi.org/10.1039/9781788010283-00060>.
- [138] A.C. Ferrari, Raman spectroscopy of graphene and graphite: Disorder, electron-phonon coupling, doping and nonadiabatic effects, *Solid State Commun.* 143 (2007) 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.ssc.2007.03.052>.
- [139] A.C. Ferrari, J.C. Meyer, V. Scardaci, C. Casiraghi, M. Lazzeri, F. Mauri, S. Piscanec, D. Jiang, K.S. Novoselov, S. Roth, A.K. Geim, Raman spectrum of graphene and graphene layers, *Phys. Rev. Lett.* 97 (2006) 1–4. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.97.187401>.
- [140] V. González Rumayor, O. Ruiz Galán, E. García Iglesias, M. Vega García, *Aplicaciones de la Biotecnología en Seguridad Alimentaria, Genoma Esp*, 2005.
- [141] B. Becker, M.A. Cooper, Aminoglycoside antibiotics in the 21st century, *ACS Chem. Biol.* 8 (2013) 105–115. <https://doi.org/10.1021/cb3005116>.

-
- [142] M. Glinka, W. Wojnowski, A. Wasik, Determination of aminoglycoside antibiotics: Current status and future trends, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 131 (2020) 116034. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116034>.
- [143] F. Farouk, H.M.E. Azzazy, W.M.A. Niessen, Challenges in the determination of aminoglycoside antibiotics, a review, *Anal. Chim. Acta.* 890 (2015) 21–43. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.06.038>.
- [144] Reglamento (CEE) No 2377/90 del consejo de 26 de junio de 1990 por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal, L 224 (1990).
- [145] J.M. Fernández-Romero, M.P. Aguilar-Caballos, *Fluorescence | Food applications*, 3rd ed., Elsevier Inc., 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.00156-6>.
- [146] C. Wang, D. Chen, Q. Wang, R. Tan, Kanamycin detection based on the catalytic ability enhancement of gold nanoparticles, *Biosens. Bioelectron.* 91 (2017) 262–267. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.12.042>.
- [147] C. Liu, C. Lu, Z. Tang, X. Chen, G. Wang, F. Sun, Aptamer-functionalized magnetic nanoparticles for simultaneous fluorometric determination of oxytetracycline and kanamycin, *Microchim. Acta.* 182 (2015) 2567–2575. <https://doi.org/10.1007/s00604-015-1628-z>.
- [148] Y. Sun, D. Li, S. He, P. Liu, Q. Hu, Y. Cao, Determination and dynamics of kanamycin A residue in soil by HPLC with SPE and precolumn derivatization, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 93 (2013) 472–481. <https://doi.org/10.1080/03067319.2012.656095>.
- [149] V.G. Amelin, D.S. Bol'shakov, Rapid Determination of Aminoglycosides in Milk by Exact Ion Masses Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–High Resolution Quadrupole Time-of-Flight Mass
-

- Spectrometry, *J. Anal. Chem.* 74 (2019) S24–S32. <https://doi.org/10.1134/S1061934819090156>.
- [150] X. Zhang, J. Wang, Q. Wu, L. Li, Y. Wang, H. Yang, Determination of kanamycin by high performance liquid chromatography, *Molecules*. 24 (2019) 1–24. <https://doi.org/10.3390/molecules24101902>.
- [151] P. Izquierdo, P. Pavón, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, Kinetic fluorimetric determination of aminoglycoside antibiotics by use of OPA and N-acetylcysteine as reagents, *Fresenius. J. Anal. Chem.* 349 (1994) 820–823. <https://doi.org/10.1007/BF00323112>.
- [152] Y. Zhang, P. Zuo, B.C. Ye, A low-cost and simple paper-based microfluidic device for simultaneous multiplex determination of different types of chemical contaminants in food, *Biosens. Bioelectron.* 68 (2015) 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.12.042>.
- [153] S. Bhunia, N. Dey, A. Pradhan, S. Bhattacharya, A conjugated microporous polymer based visual sensing platform for aminoglycoside antibiotics in water, *Chem. Commun.* 54 (2018) 7495–7498. <https://doi.org/10.1039/c8cc02865f>.
- [154] D. Wei, H. Meng, K. Zeng, Z. Huang, Visual dual dot immunoassay for the simultaneous detection of kanamycin and streptomycin in milk, *Anal. Methods*. 11 (2019) 70–77. <https://doi.org/10.1039/c8ay02006j>.
- [155] D.H. Kang, K. Kim, Y. Son, P.S. Chang, J. Kim, H.-S. Jung, Design of a simple paper-based colorimetric biosensor using polydiacetylene liposomes for neomycin detection, *Analyst*. 143 (2018) 4623–4629. <https://doi.org/10.1039/c8an01097h>.
- [156] A. Mehlhorn, P. Rahimi, Y. Joseph, Aptamer-based biosensors for antibiotic detection: A review, *Biosensors*. 8 (2018). <https://doi.org/10.3390/bios8020054>.

-
- [157] N. Zhou, J. Zhang, Y. Tian, Aptamer-based spectrophotometric detection of kanamycin in milk, *Anal. Methods*. 6 (2014) 1569–1574. <https://doi.org/10.1039/c3ay41816b>.
- [158] N.R. Ha, I.P. Jung, I.J. La, H.S. Jung, M.Y. Yoon, Ultra-sensitive detection of kanamycin for food safety using a reduced graphene oxide-based fluorescent aptasensor, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep40305>.
- [159] L.S. Khabbaz, M. Hassanzadeh-Khayyat, P. Zaree, M. Ramezani, K. Abnous, S.M. Taghdisi, Detection of kanamycin by using an aptamer-based biosensor using silica nanoparticles, *Anal. Methods*. 7 (2015) 8611–8616. <https://doi.org/10.1039/c5ay01807b>.
- [160] Á. Écija-Arenas, V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero, Luminescence continuous flow system for monitoring the efficiency of hybrid liposomes separation using multiphase density gradient centrifugation, *Talanta*. (2020). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135577>.

HERRAMIENTAS ANALÍTICAS



En el desarrollo de las investigaciones que se recogen en esta Memoria han sido posible gracias al empleo de diversas herramientas analíticas, considerando como tales todos los elementos utilizados en ellas, desde estándares, disoluciones y reactivos, disolventes y muestras, así como los dispositivos, aparatos e instrumentos utilizados. En los siguientes apartados de este bloque se describen dichas herramientas, poniendo de manifiesto sus características y los aspectos más relevantes de su uso. Además, se incluye información sobre los métodos de síntesis de los nanomateriales (NMs) utilizados, diferentes procedimientos para su caracterización, así como aquellos necesarios para el tratamiento de las muestras.

1. Estándares, reactivos y muestras

1.1. Estándares

En la siguiente tabla se relacionan los compuestos químicos utilizados como analitos en la Memoria, su pureza y las casas comerciales que los han suministrado. También se incluyen estándares utilizados para realizar el estudio de selectividad de los métodos desarrollados.

Tabla 1. Compuestos empleados, su pureza y casas comerciales distribuidoras

Compuesto	Pureza	Casa comercial
Kanamicina	≥ 98 %	Sigma
Estreptomicina	≥ 95 %	Fluka
Gentamicina	≥ 95 %	Fluka
Neomicina	≥ 85 %	Fluka
Penicilina	≥ 98 %	Sigma

Para su correcta conservación, las disoluciones de todos los estándares se mantienen protegidas de la luz y a una temperatura de 4 °C. Las disoluciones se preparan en disoluciones reguladoras al pH ajustado en casa caso. Las disoluciones de trabajo se preparan diariamente mediante dilución de las anteriores en la disolución reguladora.

1.2. Disoluciones, reactivos y disolventes

- **Reactivos empleados en la síntesis de nanopartículas:** cloruro de hierro(III) hexahidratado de Panreac. Cloruro de hierro(II) tetrahidratado y citrato de trisodio dihidratado de Merck. Ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) trihidratado y 1-dodeciltiol (C_{12}SH) de Sigma-Aldrich.

- **Reactivos empleados en la síntesis de liposomas:** 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfolina (DSPC), 3-sn-fosfatidiletanolamina (DOPE) (tipo II-S de cerebro bovino) y colesterol (CH) de Sigma-Aldrich.
- **Reactivos empleados en la formación de la superficie del aptasensor:** Escamas de grafito de K. W. Thielman & Cie KG (China), monocapas de grafeno obtenido por deposición química de vapor (CVD) (10 × 10) mm desarrollado en un sustrato de cobre recubierto con polimetilmetacrilato (PMMA) de Graphenea (San Sebastián, Spain), aptámero anti-kanamicina (5-AGATGGGGGTTGAGGCT-3') fabricado por Eurofirms, ácido 1-pirenobutírico (PBA), 1-etil-3-(3-(dimetilamino)propil) carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de Sigma-Aldrich.
- **Reactivos para la formación de gradientes multifase de densidad:** Se han preparado diferentes gradientes de densidad para su empleo en las metodologías de centrifugación, todos constituidos por sacarosa de Panreac, Ficoll PM400 y Percoll de Sigma-Aldrich.
- **Disoluciones reguladoras:** Se han preparado diferentes disoluciones para ajustar el pH requerido para el desarrollo de las reacciones utilizadas. Entre otras: hidrógenofosfato de disodio de Merck. N-[2-hidroxiethyl]piperazina-N'-[ácido 2-etanosulfónico] (HEPES) y borato de sodio de Sigma-Aldrich.
- **Fluoróforos:** Rodamina B (RB) de Merck, acetato de violeta de cresilo (CV), naftofluoresceína (NF) y sal trisódica del ácido 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfónico (HPTS), ambos de Sigma-Aldrich.
- **Surfactantes:** Tritón X-100, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y dodecilsulfato de sodio (SDS) de Sigma-Aldrich.

- **Disoluciones de ácidos y bases:** Ácido clorhídrico de Merck, ácido sulfúrico de Panreac, hidróxido de sodio y ácido 16-mercaptohexadecanoico (MHA) de Sigma-Aldrich.
- **Disolventes orgánicos:** n-hexano y metanol de Sigma-Aldrich. Cloroformo y etanol de Panreac.
- **Reactivos generales:** Cloruro de sodio, nitrito de sodio, permanganato de potasio, N-acetilcisteína y o-ftalaldehído (OPA) de Sigma-Aldrich.

Todos los reactivos empleados a lo largo de las investigaciones realizadas han sido de pureza analítica o superior.

1.3. Muestras

Para llevar a cabo el estudio de la aplicabilidad de los distintos métodos analíticos desarrollados se han empleado distintas muestras de procedencia agroalimentaria.

Se han empleado muestras de leche, que fueron adquiridas en supermercados locales de las ciudades de Regensburg (Alemania) y Córdoba (España), donde se realizaron las investigaciones. También se han usado muestras de diferentes piezas de carne procedentes de distintos animales, tales como lomo de cerdo y pechuga de pollo, todas ellas fueron adquiridas en un supermercado local de Córdoba (España).

2. Instrumentación

En el desarrollo experimental de esta Memoria se han utilizado diferentes equipos instrumentales, los cuales se describen a continuación.

2.1. Sistema de fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF4)

Se ha utilizado un sistema automático AF2000 (Postnova Analytics GmbH, Landsberg, Alemania) con un canal termostatzado (PN4020, Postnova Analytics) acoplado en línea con un detector de dispersión de la radiación multiángulo (MALS, PN3621, Postnova Analytics) provisto con 21 detectores para su monitorización. El canal de separación del sistema AF4 tiene una longitud de 29 cm y está equipado con un espaciador trapezoidal de 350 μm de grosor y una membrana compuesta de celulosa regenerada con un tamaño de corte de 10 kDa, y utilizada como pared de acumulación.

2.2. Analizador para medidas de dispersión dinámica de la radiación (DLS)

La distribución de tamaño y el potencial Z de los liposomas se ha medido utilizando un analizador Zetasizer Nano ZSP ZEN5600 (Malvern Instruments, Spring Lane South, Worcestershire, UK). El fundamento de este instrumento se basa en la técnica espectroscópica de correlación de fotones. Las medidas se han llevado a cabo mediante el uso de un láser He-Ne de 10 mW que opera a una longitud de onda de 633 nm y se recoge en un detector situado con un ángulo de dispersión de 173°.

2.3. Espectrómetro de resonancia de plasmón superficial (SPR)

Se ha usado un dispositivo SPR Biosuplar 400T (Mivitec GmbH, Sinzing, Alemania) con un prisma de cristal F1-65° instalado en un carro giratorio. En la parte superior del prisma se ha colocado un portaobjetos de vidrio recubierto de oro, al que se añade fluido (Cargille®, Cargille Labs, Cedar Grove, NJ) para hacer coincidir el índice de refracción del medio con el del vidrio. Sobre el portaobjetos se ha colocado una célula de flujo con dos canales.

Para realizar el desplazamiento de las disoluciones se ha utilizado un sistema de impulsión constituido una bomba peristáltica de cuatro canales IPC 4 (Ismatec, NeoLab, Heidelberg, Alemania).

2.4. Equipos de espectroscopía óptica de emisión molecular.

Se han utilizado dos espectrofluorímetros para realizar las medidas de fluorescencia y, en algunos casos, de dispersión de la radiación. En concreto, se han utilizado dos espectrofluorímetros: Horiba Fluorolog-3P y Horiba Fluoromax-4P (Jobin-Yvon Technology, Horiba Scientific, Francia). Ambos están equipados con una lámpara de Xenón de 150 W que opera a una frecuencia de 50-60 Hz, a una velocidad de muestreo que oscila entre 1 ms y 160 s y una resolución espectral inferior a 0.5 nm, y un tubo fotomultiplicador que opera en un intervalo de 200 a 850 nm, un tiempo de vida medio establecido entre 200 ps y 0.1 ms, una capacidad de adquisición de hasta 400000 cuentas/s y una resolución límite inferior a 7 ps por canal. Para la realización de medidas en sistemas de flujo convencionales se ha usado una célula de flujo Hellma 176-052-QS con un volumen interno de 18 μ L (Hellma, Müllheim, Alemania). El control instrumental de los espectrofluorímetros se ha realizado a través de software de aplicación FluorEssence (Horiba Scientific).

2.5. Equipos de espectroscopía de absorción molecular.

En la caracterización de nanopartículas se han utilizado diferentes técnicas espectroscópicas, tales como la espectroscopía de rayos X (XPS), así como la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). Ambos equipos pertenecen al servicio centralizado de apoyo a la investigación (SCAI) de la UCO.

- **Espectroscopio de Rayos X (XPS):** se ha usado el instrumento Specs Phoibos 150 MCD 5700 con una radiación no monocromática Al K α (12 kV) y un detector multicanal.
- **Espectroscopio infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR):** el espectro infrarrojo se ha obtenido con el espectrofotómetro FT-MIR Bruker Tensor 27 equipado con un microscopio Hyperion 2000, usando pastillas de bromuro de potasio.

2.6. Técnicas microscópicas ópticas y electrónicas.

- **Microscopio confocal.** Para la caracterización de liposomas se ha utilizado un microscopio confocal Zeiss LSM 800 (Zeiss, Alemania) con una resolución de 512×512 píxeles y equipado con láseres UV, VIS y NIR y detector de 3, 6, o 34 canales espectrales.
- **Microscopios electrónicos de transmisión (TEM).** Se han utilizado el microscopio electrónico de transmisión modelo PHILIPS CM-10, con una resolución de 0.5×0.34 nm y equipado con una cámara digital Megaview III y el microscopio electrónico de transmisión modelo JEOL JEM 2010, con una resolución de puntos de 0.194 nm trabajando entre 80 y 200 kV equipado con una cámara ORIUS. Para realizar medidas en estos microscopios se necesitaron rejillas de cobre (200-FC) recubiertas con películas de carbono Formvar de malla 200, suministradas por Aname (Madrid, España).
- **Microscopio electrónico de barrido (SEM).** Se ha utilizado el microscopio electrónico de barrido modelo JEOL JSM 6300 trabajando a una potencia de 20 kV equipado con un detector dispersivo de energía de rayos X (EDX).

Toda esta instrumentación utilizada para la caracterización de los nanomateriales sintetizados también pertenece al servicio centralizado de apoyo a la investigación (SCAI) de la UCO.

- **Microscopio Raman.** También se ha utilizado un microscopio Raman DXR (Thermo Scientific Scientific GmbH, Dreieich, Alemania) con un láser de excitación de 532 nm trabajando a una potencia de 10 mW. La radiación Raman reflejada se recoge en el mismo objetivo y se focaliza hacia un pinole de 50 μm de diámetro previa al detector. El equipo permite obtener espectros Raman de alta resolución con capacidad de originar imágenes Raman de la superficie de la muestra. Las imágenes microscópicas y los mapas se adquirieron mediante un sistema óptico MPlan 100 \times /0.90 BD (Olympus SE & Co. KG, Hamburgo, Alemania).

3. Dispositivos, aparatos y otros materiales

3.1. Dispositivos y aparatos de uso específico

Para poder llevar a cabo las diferentes configuraciones en las que se han desarrollados procesos de separación y/o determinación, se han implementado diferentes sistemas de flujo desarrollados a escala convencional o bien a escala micrométrica. En ambos casos se ha hecho uso de diferentes elementos que se citan a continuación.

3.1.1. Dispositivos y aparatos empleados en sistemas dinámicos convencionales

- Bomba peristáltica de baja presión de cuatro canales con selector de velocidad Gilson (Villiers-le-Bel, France) Minipuls 3.
- Tubos de PTFE de 0,5 mm de diámetro interno para conducir las disoluciones, así como para fabricar los bucles y reactores necesarios.

- Conectores de PTFE (Omnifit) para unir los tubos de conducción de los diferentes componentes del sistema de flujo.

3.1.2. Dispositivos y aparatos empleados en sistemas dinámicos microfluídicos

- Bomba de impulsión múltiple de jeringas KDS220 (KD Scientific Inc., MA, USA).
- Bombas microfluídicas de jeringa NE-300 (Micronit, The Netherlands).
- Válvulas de inyección VA-CN2 Cheminert (Valco, Teknokroma, Barcelona).
- Microrreactores R150.332.2 y R150.676.2 de dimensiones 15 ´ 45 mm y volumen interno de 6 y 13 µL, respectivamente (Micronit, The Netherlands).
- Chipholder modelo 4515 (Micronit, The Netherlands).

3.1.3. Dispositivo de alineamiento fabricado mediante impresión 3D

El dispositivo de alineamiento ha sido diseñado por el equipo de investigación. Este dispositivo se ha utilizado como elemento de integración de un dispositivo microfluídico en el compartimento de muestra un espectrofluorímetro convencional utilizado en el desarrollo de las investigaciones. Su uso permite focalizar la radiación procedente de la fuente de excitación en la zona exacta del reactor microfluídico donde tiene lugar la reacción y la detección de la radiación emitida adecuadamente alineado dentro del compartimento de muestra. En la **Figura 1** se muestran unas imágenes del dispositivo de alineamiento y su colocación en el interior de la cámara de muestra del espectrofluorímetro.

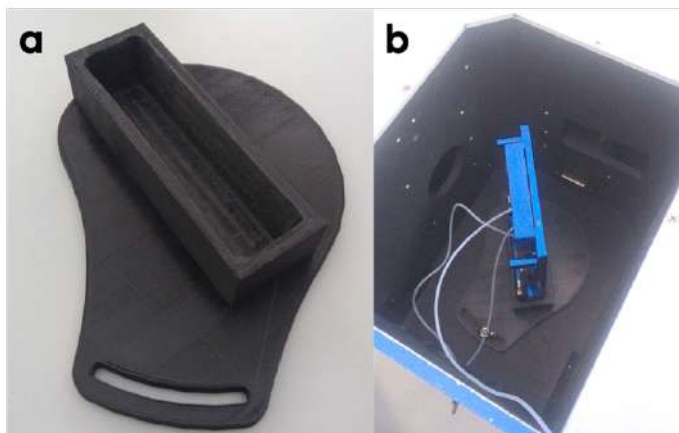


Figura 1. Dispositivo de alineamiento diseñado y fabricado con impresión 3D. **a** Imagen del dispositivo obtenido por impresión 3D con material polimérico PLA-850, **b** Imagen del sistema microfluídico integrado en el compartimento de muestra del detector espectrofluorimétrico

Este prototipo se ha fabricado usando una impresora 3D Anet A8 Plus (Shenzhen Anet Technology Co, China), cuyas características son: dimensiones de $300 \times 300 \times 350$ mm, con una resolución de la boquilla del cabezal de extrusión de 0,1 mm y un rango de altura de impresión de 0,1 a 0,2 mm, proporcionando también temperaturas de bloque y de extrusión de 100 y 250 °C, respectivamente. El prototipo se ha fabricado con un filamento de ácido poliláctico (PLA-850), que se ha modificado con un 3D850-PLA NatureWorks Ingeo biodegradable. El dispositivo de alineación se ha diseñado utilizando el software paramétrico freeCAD versión 0.18-16148 (con licencia de Creative Commons Co, LA, EE. UU.) Y se ha exportado a través de una tarjeta microSD a la impresora 3D utilizando el formato de archivo STL.

3.2. Dispositivos y aparatos de uso general

- Centrífuga controlada por microprocesador MPW-350/R (MPW Med. Instruments).

- Centrífuga angular Nahita Mod. 2650, 4000 rpm (Auxilab-material de laboratorio, España).
- Baño de ultrasonidos, 50/60 Hz, 360 W (J.P. Selecta, Barcelona, España).
- Baño de agua termostatzado (J.P. Selecta, Barcelona, España).
- Rotavapor Büchi R-205 (Büchi, Flawil, Suiza).
- Agitador Vortex (Velp Científica, Milán, Italia).
- Agitador magnético, 2500 rpm (IKA, Alemania).
- Estufa de secado, modelo Conterm (J.P. Selecta, Barcelona, España).
- Placa calefactora con agitación magnética Agimatic-N (J.P. Selecta, Barcelona, España).
- pH-metro (Crison, modelo GLP 21).
- Balanza analítica de precisión OHAUS Explorer (OHAUS, Nänikon, Suiza).
- Equipo de agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE. UU.).
- Micropipetas automáticas con volúmenes comprendidos entre 5 y 1000 μL de capacidad.

3.3. Material general de laboratorio

- Material de vidrio de laboratorio, clase A.
- Jeringas de plástico de 1 y 5 mL (Albus, España).
- Filtros de jeringa de celulosa regenerada de tamaño de poro 0,20 μm (Análisis Vínicos, España).
- Filtros de membrana de nylon de tamaño de poro de 0,20 μm (Millipore, Bedford, MA, EE. UU.).
- Tubos Eppendorf de 1,5 mL.
- Tubos de centrífuga de polipropileno.

4. Programas informáticos

Para la realización de los cálculos estadísticos y la elaboración de las diferentes representaciones gráficas se utilizaron los siguientes programas informáticos:

- Software OriginPro9.1.0 (32-bit, OriginLab Co. 2013, Northampton, MA, USA) 2021.
- Software Statgraphics Centurion XVIII (Statistical Graphics Corp. version 18.1.12 64-bit) 2021.
- Software Microsoft Office Excel. Versión 16.471. Microsoft Office 365, 2021.

El tratamiento de las imágenes generadas mediante las técnicas microscópicas encaminadas a la caracterización de las nanoestructuras fue realizado con la plataforma de software libre ImagenJ del National Institute of Health, 2019.

5. Procedimientos de síntesis de nanoestructuras

5.1. Síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs)

Estas nanopartículas se obtuvieron utilizando el método Turkevich convencional [1]. Brevemente, 5 mg de HAuCl_4 se disuelven en 47.5 mL de agua destilada en un matraz de fondo redondo. Se añaden 2.5 mL de una disolución $3,4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de citrato de trisodio dihidratado gota a gota en 2 min y después se agita vigorosamente bajo reflujo a 100 °C durante 30 min. El color de la disolución cambia gradualmente de amarillo a rojo. La disolución final, que contiene aproximadamente $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ AuNPs, se guardó en el frigorífico a 4 °C hasta su uso.

5.2. Síntesis de nanopartículas de oro funcionalizadas con derivados tiólicos (AuNPs-C12SH)

La funcionalización de las AuNPs con C12SH se lleva a cabo gracias al enlace Au-S por adsorción química entre el compuesto tiólico sobre la superficie de la nanopartícula. Mediante esta funcionalización se obtienen nanopartículas hidrofóbicas, ya que la cadena hidrocarbonada del derivado tiólico quedan orientadas hacia el exterior de la nanopartícula. Las AuNPs-C12SH se obtuvieron de la misma forma que las AuNPs, pero se incluye la adición de 150 μL de C12SH junto con el citrato de trisodio dihidratado y un tiempo de reflujo de 6–10 min. La disolución cambia de color de amarillo a rojo y posteriormente a violeta.

5.3. Síntesis de nanopartículas magnéticas ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$)

La síntesis de las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ se ha llevado a cabo siguiendo el método de coprecipitación de dos sales de hierro [2]. Para ello, a 25 mL de una disolución acuosa que contiene 0,4 mol L^{-1} cloruro de hierro (III), 0,4 mol L^{-1} cloruro de hierro (II) y 40 mmol L^{-1} ácido clorhídrico se le añade gota a gota 250 mL de una disolución 1,5 mol L^{-1} hidróxido sódico con agitación vigorosa (no magnética). Las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ de color marrón oscuro, que se forman inmediatamente, se separan mediante el uso de un imán permanente de NdFeB y se lavan tres veces con 200 mL de agua destilada. Las nanopartículas se centrifugan a 17920 $\times g$ durante 20 min también por tres veces y posteriormente se dispersan en 100 mL de agua destilada. Se guardan en el frigorífico a 4 $^\circ\text{C}$ para su uso posterior.

5.4. Síntesis de nanopartículas magnéticas recubiertas de nanopartículas de oro ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs}$)

Este procedimiento de síntesis se realiza por capas, es decir, en primer lugar, se obtienen nanopartículas de núcleo magnético ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$) y posteriormente se forman capas de AuNPs por adición de los reactantes directamente sobre la suspensión de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$. Brevemente, a 2,5 mL de una disolución de HAuCl_4 (20 mg mL^{-1}) se añade 22,5 mL de agua destilada y se calienta a $90 \text{ }^\circ\text{C}$ con agitación mecánica durante 40 min. A continuación, se le añaden 0,75 mL de la disolución de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ preparada anteriormente y 0,5 mL de citrato de trisodio dihidratado (500 mmol L^{-1}) y se deja reaccionar agitando mecánicamente a $90 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min. La disolución cambia gradualmente de color hasta borgoña, que se corresponde con las nanopartículas híbridas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs}$. Las nanopartículas se conservan refrigeradas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso.

5.5. Síntesis de nanopartículas magnéticas recubiertas de nanopartículas de oro recubiertas de derivados tiólicos ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs-C12SH}$)

El procedimiento para la síntesis de estas nanopartículas híbridas con carácter hidrofóbico es el mismo que el utilizado en el procedimiento anterior, para la síntesis de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs}$. La diferencia reside en que en la etapa de reducción del HAuCl_4 por adición de citrato de trisodio dihidratado, también se procede a la adición 5 mL de C12SH, obteniéndose finalmente las $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs-C12SH}$. Las NPs, de un color grisáceo, se conservan en el frigorífico a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso.

5.6. Síntesis de liposomas

Para la preparación de las diferentes suspensiones de liposomas utilizados en el desarrollo experimental de esta Memoria, se ha seguido el método de evaporación rápida de disolvente (RSE) [3]. Se trata de un método bastante rápido y que permite obtener suspensiones de liposomas a partir de mezclas de diferentes cantidades de fosfolípidos y otras sustancias coadyuvantes disueltos en una mezcla de disolvente orgánicos, procediendo rápidamente a su evaporación en rotavapor a una presión y temperatura controlada bajo condiciones de vacío. Con este método se pueden sintetizar liposomas con distintas especies encapsuladas, como nanopartículas sintetizadas anteriormente, fluoróforos o reactivos.

Se toman 20 μL de una mezcla de disoluciones en cloroformo de fosfolípidos, compuesta por DSPC, DOPE y CH (75:12.5:12.5) y se disuelve en 1 mL de una mezcla 880/120 de cloroformo/metanol. Esta disolución se añade a un matraz de fondo redondo de 50 mL. Se añaden lentamente por las paredes del matraz las distintas especies que se quieran encapsular, rellenando con disolución reguladora hasta un volumen de 10 mL. Los liposomas se forman en fase acuosa y se elimina el disolvente orgánico en el rotavapor a 40 °C y 300 rpm bajo vacío (a una presión aproximadamente de 10 mmHg). Después de 15 min de evaporación, se obtiene un fluido opalescente, con un volumen final aproximado de 10 mL. La suspensión resultante contiene una mezcla de liposomas con una amplia polidispersidad, en la que los componentes mayoritarios son vesículas gigantes unilamelares (GUVs) y vesículas multi-vesiculares (MVVs).

5.7. Síntesis de óxido de grafeno reducido (rGO)

Para obtener óxido de grafeno reducido (rGO), primero se sintetiza óxido de grafeno (GO). El GO se sintetiza a partir de grafito siguiendo el

método modificado de Hummers, sometiéndolo después a una etapa de reducción química [4,5]. Se toman 100 mg de grafito en escamas y se mezclan con 75 mg de nitrato de sodio, 7,5 mL de ácido sulfúrico concentrado y 450 mg de permanganato de magnesio. La mezcla se somete a ultrasonidos durante 3 h y se agita durante 3 días a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se añaden 7,5 mL de ácido sulfúrico al 5 % y se agita bajo reflujo durante 2 h más a 100 °C. A continuación, se adiciona 1,5 mL de peróxido de hidrógeno al 30 % bajo agitación constante durante 1 h a temperatura ambiente. Para la purificación del GO, se lava con las siguientes disoluciones: cuatro veces con una mezcla compuesta por ácido sulfúrico al 3 % y peróxido de hidrógeno al 0,5 %, dos veces con ácido clorhídrico al 3 % y tres veces con agua destilada. El producto obtenido se somete a diálisis en agua (con una membrana de 14 kDa de cut-off) durante 10 días.

Una vez obtenida la suspensión de GO, se procede a su reducción para la formación de rGO [4,6]. Para ello, 7 mL de la suspensión de GO (0,5 mg mL⁻¹) se mezcla con 31 µL de amoníaco al 32 % en agua. Después se añaden 5 µL de hidracina hidratada al 98 % y la mezcla se somete a reflujo durante 1 h a 100 °C. Por último, la suspensión final de color negro se lava con agua destilada.

6. Procedimiento de inclusión de liposomas en una epoxi-resina

La caracterización directa de liposomas mediante TEM no es posible, debido a que la etapa necesaria de evaporación del disolvente para el depósito del residuo seco sobre la rejilla del portamuestras, implica la rotura de los liposomas a causa de su deshidratación. Aunque en la bibliografía existen alternativas al depósito directo por evaporación de la muestra basadas en el empleo de procedimientos de fijación-tinción negativa de las vesículas o el uso de la modalidad crioTEM, en el desarrollo de estas investigaciones se propone

un procedimiento de inclusión de los liposomas en una epoxi-resina, como el empleado en la inclusión de células biológicas [7]. Esta inclusión se basa en la consideración de la suspensión de liposomas como una muestra con consistencia semifluida similar a una muestra biológica. La resina utilizada es la resina comercial EPON preparada a partir de cuatro componentes: TAAB, DDSA, MNA y DPM-30.

El primer paso del procedimiento consiste en añadir 1,5 mL de suspensión de liposomas a un tubo Eppendorf seguido de una centrifugación a $1120\times g$ durante 20 min. Después se retira el sobrenadante y se añade glutaraldehído 2 % a cada uno de los Eppendorf para realizar la fijación y se mantiene refrigerado a 4 °C durante 2 horas. Posteriormente se realizan tres lavados con agua destilada para eliminar el fijador, dejando actuar el agua durante 15 min. Se realiza una post-fijación con tetróxido de osmio 1 % y se mantiene durante 2 horas refrigerado. Se realiza otra serie de cuatro lavados con agua destilada, de 10 min cada uno. El siguiente paso es la deshidratación. Para ello, se realiza una escala ascendente de acetona: pasando de acetona 30 % durante 15 min, a 50 % durante 30 min, 70 % durante toda la noche en frigorífico, 90 % durante 30 min y, por último, 100 % dos veces, cada uno de 45 min. Para adecuar la muestra a la inclusión en la resina, se sustituye el medio de deshidratación, la acetona, por óxido de propileno, añadiendo dos veces este compuesto durante 10 min. Por último, se sustituye el óxido de propileno por la resina, añadiendo mezclas óxido de propileno/agua. Primero, se añade una mezcla 2:1 óxido de propileno/resina durante una hora. Después, se añade una mezcla 1:1 durante 30 min. Posteriormente, una mezcla 1:2 durante 30 min y por último se añade sólo resina y se deja durante toda la noche. Como paso final, la mezcla incluida en la resina se introduce en moldes y se pone en estufa a 50 °C durante 24 horas para realizar la curación de la resina. Cuando se saca de la estufa, se deben esperar otras 24 horas para poder cortar y tallar la muestra.

7. Preparación de muestras

Algunas de las muestras empleadas durante el desarrollo experimental no requirieron ningún tratamiento previo a su análisis. Tal es el caso de las muestras de leche de vaca que se usan para su análisis con SPR, las cuales se introdujeron en el sistema de flujo, bien de forma directa o bien mediante una simple dilución en agua Milli-Q. Sin embargo, esa misma muestra en otros sistemas de análisis u otras muestras requirieron diversos tratamientos previos, los cuales se describen a continuación.

7.1. Precipitación de proteínas

Existen múltiples tratamientos para desnaturalizar y precipitar proteínas de la matriz de la muestra, permitiendo eliminarlas y evitando que interfieran en medidas posteriores. El método utilizado para precipitar las proteínas de la leche analizada consiste en mezclar 20 mL de muestra con 20 mL de una disolución de ácido tricloroacético al 20 % con agitación durante 40 min. Después se somete a un proceso de centrifugación a 4 °C durante 15 min a 11830×g, recogiendo los sobrenadantes y filtrándolos con un filtro de membrana de 0,2-µm. Posteriormente, los filtrados se diluyen cinco veces con la disolución reguladora borato (50 mmol L⁻¹, pH 9,5) [8,9].

7.2. Extracción sólido-líquido

Con el fin de extraer los analitos de la muestra se realiza una extracción convencional sólido-líquido para las distintas muestras de carne. Esta extracción consiste en la separación de componentes solubles de la matriz de la muestra mediante la utilización de un disolvente adecuado. Para ello, 5 g de las distintas muestras de carne se mezclan con 10 mL de la disolución de extracción (ácido tricloroacético 8,3 g L⁻¹, Tween 20 al 0.0083 %, metanol al 16,7 % y

mercaptoetanol al 0.05 %) y se someten a centrifugación durante 10 min a 11830×g. Los sobrenadantes se recogen y se diluyen 5 veces con la disolución reguladora borato (50 mmol L⁻¹, pH 9,5) [10].

Referencias

- [1] J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier, A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discuss. Faraday Soc.* 11 (1951) 55–75.
- [2] J. Li, X. Zhao, Y. Shi, Y. Cai, S. Mou, G. Jiang, Mixed hemimicelles solid-phase extraction based on cetyltrimethylammonium bromide-coated nano-magnets Fe₃O₄ for the determination of chlorophenols in environmental water samples coupled with liquid chromatography/spectrophotometry detection, *J. Chromatogr. A.* 1180 (2008) 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.12.028>.
- [3] A. Gómez-Hens, J. Manuel Fernández-Romero, The role of liposomes in analytical processes, *TrAC Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.07.017>.
- [4] W.S. Hummers, R.E. Offeman, Preparation of Graphitic Oxide, *J. Am. Chem. Soc.* 80 (1958) 1339. <https://doi.org/10.1021/ja01539a017>.
- [5] A. Zöpfl, M.M. Lemberger, M. König, G. Ruhl, F.M. Matysik, T. Hirsch, Reduced graphene oxide and graphene composite materials for improved gas sensing at low temperature, *Faraday Discuss.* 173 (2014) 403–414. <https://doi.org/10.1039/c4fd00086b>.
- [6] Li D, Müller MB, Gilje S, Kaner RB, Wallace GG. Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets. *Nat Nanotechnol.* 3 (2008) 101–105. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.451>.

- [7] M.A.N. Hajibagheri, ed., *Electron Microscopy Methods and Protocols*, Humana Press Inc., 1999. <https://doi.org/10.1385/1-59259-201-5:31>.
- [8] V. Román-Pizarro, A. Gómez-Hens, J.M. Fernández-Romero, Applicability of Fluorescent Hybrid Magnetoliposomes for the Determination of Reactive Oxygen Compounds in Food, *Food Anal. Methods* 11 (2018) 2376–2383. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1220-3>.
- [9] C. Wang, D. Chen, Q. Wang, R. Tan, Kanamycin Detection Based on the Catalytic Ability Enhancement of Gold Nanoparticles, *Biosens. Bioelectron.* 91 (2017) 262–267. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.12.042>.
- [10] C. Liu, C. Lu, Z. Tang, X. Chen, G. Wang, F. Sun, Aptamer-Functionalized Magnetic Nanoparticles for Simultaneous Fluorometric Determination of Oxytetracycline and Kanamycin, *Microchim. Acta* 182 (2015) 2567–2575 <https://doi.org/10.1007/s00604-015-1628-z>.

PARTE EXPERIMENTAL



BLOQUE I

SÍNTESIS, SEPARACIÓN
Y CARACTERIZACIÓN
DE NANOMATERIALES



El desarrollo y caracterización de nuevos nanomateriales (NMs), así como la separación de los componentes posterior a su síntesis para obtener NMs fraccionados según su distribución de forma y tamaño, y así utilizarlos como herramientas analíticas en el desarrollo de nuevas metodologías analíticas es un aspecto de gran interés en la innovación en Química Analítica. Un método ideal para la separación por tamaños de NMs debe ser rápido, económico, fácil de implementar en el equipamiento de rutina y, además, cubrir un amplio intervalo de tamaños [1]. A lo largo de este Bloque de la Memoria se presentan las investigaciones realizadas para la síntesis de diversos NMs y el desarrollo de metodologías de separación y caracterización de dichos NMs, para su posterior utilización en métodos analíticos determinativos, dando lugar a las siguientes publicaciones:

- Separation and purification of hydrophobic magnetite-gold hybrid nanoparticles by multiphase density gradient centrifugation. Á. Écija-Arenas, V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens. *Microchim. Acta* 183 (2016) 2005-2012.
- Luminescence continuous flow system for monitoring the efficiency of hybrid liposomes separation using multiphase density gradient centrifugation. Á. Écija-Arenas, V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero. *Talanta* 222 (2021) 121532.
- Separation and characterization of liposomes using asymmetric flow field-flow fractionation with online multi-angle light scattering detection. Á. Écija-Arenas, V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero. *J. Chrom. A* 1636 (2021) 461798.

Como se ha comentado en la Introducción de esta Memoria, existe una amplia variedad de NMs con implicaciones en diferentes etapas del proceso analítico [2,3]. En el desarrollo experimental de esta Tesis Doctoral, se han utilizado diferentes procedimientos de síntesis tanto de nanopartículas híbridas, como se detalla en la primera publicación de este Bloque (**Capítulo I.1**), como de liposomas híbridos, como los desarrollados en la segunda (**Capítulo I.2**) y tercera publicación (**Capítulo I.3**). Una vez sintetizados los NMs, se han desarrollado diferentes métodos de separación y caracterización de estos.

Las dos primeras publicaciones son referidas al desarrollo de métodos de separación de NMs fundamentados en la centrifugación en gradiente multifase de densidad. En la primera aplicación (**Capítulo I.1**) se detalla el proceso de separación/purificación posterior a la síntesis de nanopartículas magnéticas hidrofóbicas ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs-C12SH}$) y en la segunda (**Capítulo I.2**), la separación de distintas poblaciones de liposomas que se obtienen al sintetizar magnetoliposomas híbridos con fluoróforos encapsulados. Como se ha comentado en la Introducción, la técnica de separación por centrifugación en gradiente de densidad se basa en la creación de un gradiente de densidad en un tubo de centrifugación mediante la adición secuencial de disoluciones con diferente densidad, aumentando desde el fondo del contenedor hacia arriba del tubo. Además de la formación de un gradiente de densidad descendente con disoluciones cada vez más concentradas de sacarosa, se ha añadido los componentes ficoll y percoll a una concentración constante de cada uno de ellos con el fin de conseguir la estabilización de las capas del gradiente de densidad. El modelo propuesto se basa en una centrifugación zonal, en la que la forma, el tamaño y la densidad de los materiales influye en su separación. La muestra se añade por encima del gradiente de separación y se somete a centrifugación. Como la separación debe acabar antes de que los materiales alcancen el fondo del tubo de centrifugación, se realiza un estudio de optimización de las variables

involucradas para obtener la mejor separación, de acuerdo con el tipo de material separado.

Una vez terminado el proceso de separación mediante centrifugación en gradiente multifase de densidad, se ha realizado el acoplamiento del tubo de separación a un sistema continuo de análisis que incluye un detector espectrofluorimétrico para la monitorización en continuo de las fracciones separadas de los NMs. Mediante la monitorización en continuo del contenido del tubo de centrifugación, se pueden realizar medidas de dispersión de la radiación en el caso de nanopartículas y/o de la intensidad de la fluorescencia medidas a las longitudes de onda de máxima excitación y emisión, en el caso de los fluoróforos encapsulados en los magnetoliposomas híbridos.

El tercer método de separación propuesto (**Capítulo I.3**) se fundamenta en la aplicación de la técnica de fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF4), que ya se ha comentado en la Introducción, y que se trata de una técnica de separación hidrodinámica asistida por un flujo de desplazamiento asimétrico [4]. Los NMs se separan a lo largo del canal por sus distintos coeficientes de difusión debido a su tamaño y sus propiedades fisicoquímicas. Este método se ha aplicado a la separación de distintas poblaciones de liposomas encontradas en la suspensión resultante posterior a su síntesis. Las fracciones se caracterizaron mediante el acoplamiento en continuo con un detector de dispersión multiángulo de radiación, que permite caracterizar diferentes poblaciones de liposomas y facilitar su clasificación por tamaños en base a su separación hidrodinámica.

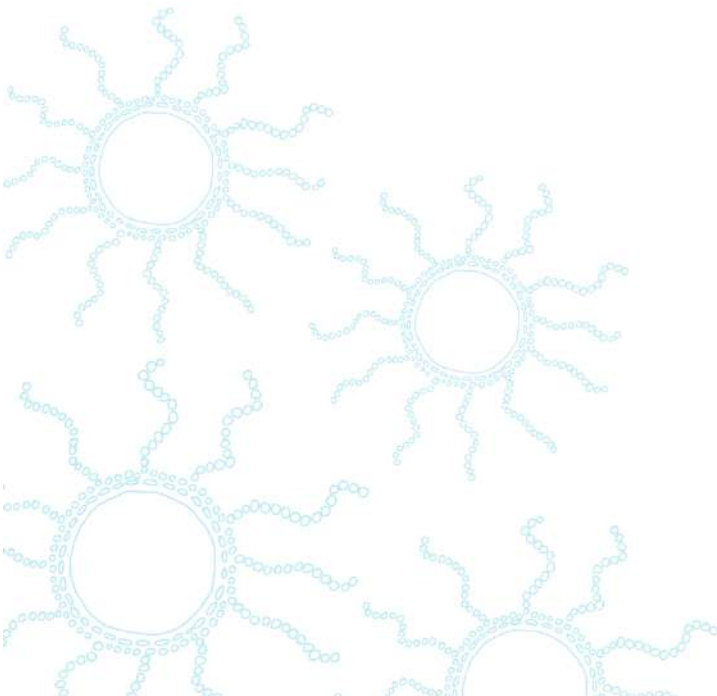
Referencias

- [1] D. Steinigeweg, M. Schütz, M. Salehi, S. Schlücker, Fast and cost-effective purification of gold nanoparticles in the 20-250 nm size range by

- continuous density gradient centrifugation, *Small*. 7 (2011) 2443–2448. <https://doi.org/10.1002/sml.201100663>.
- [2] C. Dhand, N. Dwivedi, X.J. Loh, A.N. Jie Ying, N.K. Verma, R.W. Beuerman, R. Lakshminarayanan, S. Ramakrishna, *Methods and Strategies for the Synthesis of Diverse Nanoparticles and their Applications: A Comprehensive Overview*, *RCS Advances*, 127 (2015) 105003–105037. <https://doi.org/10.1039/C5RA19388E>
- [3] A. Gómez-Hens, J. Manuel Fernández-Romero, The role of liposomes in analytical processes, *TrAC Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.07.017>.
- [4] M. Wagner, S. Holzschuh, A. Traeger, A. Fahr, U.S. Schubert, Asymmetric flow field-flow fractionation in the field of nanomedicine, *Anal. Chem.* 86 (2014) 5201–5210. <https://doi.org/10.1021/ac501664t>.

CAPÍTULO I.1

Separation and
purification of
hydrophobic
magnetite-gold hybrid
nanoparticles by
multiphase density
gradient centrifugation



Separation and purification of hydrophobic magnetite-gold hybrid nanoparticles by multiphase density gradient centrifugation

Ángela Écija-Arenas, Vanesa Román-Pizarro, Juan Manuel Fernández-Romero, Agustina Gómez-Hens

Analytical Chemistry Department, Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry, University of Córdoba, Campus of Rabanales, Annex to Marie Curie Building, 14071 Córdoba, Spain

Abstract

The authors describe a multiphase density gradient centrifugation method for the separation and purification of hybrid nanoparticles (NPs). The method was applied to the purification of NPs consisting of magnetite gold NPs of type $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ and coated with 1-dodecylthiol. A density gradient has been established by forming cushions of a multicomponent solution composed of (a) a nonlinear gradient of sucrose in the of 5–50 % concentration range, (b) a constant concentration of ficoll (a neutral, highly branched, high-mass, hydrophilic polysaccharide; 30 % w/w), and (c) a constant concentration of percoll (colloidal silica particles coated with polyvinylpyrrolidone; 15 % w/w). The final separation profiles are adjusted via dynamic differential centrifugation at $4480\times g$ for 30 min. The mixture of NPs to be separated is added and centrifuged at $2520\times g$ for 40 min. This will separate the NPs into five fractions together with other secondary components. The fractions were characterized by FTIR, XPS, and SEM-EDX techniques. Finally, a continuous flow system with resonance light scattering detection was established and coupled to the separation system in order to monitor the separated fractions.

Keywords Nanomaterial separation · Density gradient · Rate zonal method · Sucrose · Continuous flow system · Light scattering

Introduction

The fast expansion of nanotechnology in a wide range of areas has given rise to significant efforts in the last years directed to optimize the synthesis of nanoparticles (NPs). A general feature of NPs is their polydispersity in shape and size and the presence of secondary components. Thus, there is a growing interest in the availability of separation and purification methods for post- preparative processing because, as it is known, the physical and chemical properties and applications of NPs are critically controlled by their dimension, shape and purity.

A variety of separation techniques have shown their usefulness to obtain purified NP fractions with narrow shape and size distributions. Size exclusion chromatography has been widely used for this purpose but some inherent problems such as degradation or losses by irreversible adsorption can be a limitation. Although the addition of surfactants in the mobile phase can reduce adsorption processes, they can negatively affect the separation resolution [1]. Capillary electrophoresis is another option, but it can be only applied to the separation of charged NPs and, also, it is limited to relatively small sample amounts. For instance, gold and silver NPs have been separated according to their size and shape by agarose gel electrophoresis after coating them with a charged polymer layer [2]. Ultrafiltration, which involves the use of membranes with very low pore sizes, in the nm range, is a fast technique that allows the separation of NPs of different sizes. Several ultrafiltration procedures have been described for the separation of AuNPs [3] and AgNPs [4]. However, a potential limitation of this technique is the interaction of the membrane with the NPs, giving rise to the blocking and the adsorption of NPs on the membrane surface and pore walls.

Field-flow fractionation is a powerful technique that has been used to separate several NPs, including Ag, Au, Pd, and Pt, and also to evaluate the factors that influence retention behaviour [5, 6], although it is time consuming and laborious.

Among the different techniques used for the separation of NMs, the density-gradient centrifugation technique is a simple and inexpensive approach that has been widely described for this purpose. Briefly, a density gradient is created in a centrifuge tube by sequentially layering solutions of different densities, which increases from the top to the bottom of the tube. Then, the sample is added on top of the density gradient and is subjected to centrifugation. During centrifugation, the particles begin to sediment through the gradient into separate zones according to particle size, shape, and density. NPs from different bands can be easily removed by a needle or a pipette syringe. The fractions can be purified by several centrifugation–redispersion cycles using an appropriate solvent.

Usually, the density gradient is prepared with glycerol, sucrose, and other aqueous solutions. For instance, glycerol has been used for the separation of AuNPs in the 20–250 nm size range [7]. Also, sucrose gradient solution has been described for the separation of gold nanorods [8]. Another method for the separation of gold nanorods has been recently described by centrifugation in viscosity gradient adjusted with poly(2-ethyl-2-oxazoline) solutions of different concentrations, which offer a steep viscosity gradient while holding almost the same density [9]. Density gradient centrifugation has been also applied to the evaluation of liposome populations, allowing the separation of giant, large and small size liposomes [10].

We report here on a method for the separation of mixtures of NPs using a multiphase density gradient centrifugation (MDGC) system. The method has been applied to the purification of hydrophobic magnetic-gold NPs coated with 1-dodecylthiol ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@AuNPs-C12SH}$). These NPs have been previously

synthesized for the preparation of magnetoliposomes [11], which were used to develop a method for alkaline phosphatase determination, but they can be contaminated with secondary NPs such as AuNPs, AuNPs-C12SH, Fe₃O₄NPs and Fe₃O₄@AuNPs. In addition to the use of different sucrose concentrations to form the layers, ficoll and percoll at constant concentrations have been used for the stabilization of the layers. Ficoll is a polymer of sucrose with a high molecular weight and percoll consists of a suspension of colloidal silica particles (diameter 15–30 nm) coated with polyvinylpyrrolidone (PVP). Both ficoll and percoll have been used as density gradient media for the separation of cells, viruses and other subcellular particles [12]. Ficoll has been also used in an aqueous multiphase system together with the surfactant Brij 35 and poly(2-ethyl-2-oxazoline) for rate zonal centrifugation to separate nanorods, nanospheres and large particles of a synthesis of gold nanorods [13].

With the aim of evaluating the separation of the tested NPs, the MDGC system described in this study has been coupled to a continuous flow system and the separated fractions have been monitored using resonance light scattering (RLS).

Experimental

Instrumentation

A Horiba Scientific Fluoromax-4P spectrofluorimeter (Horiba Scientific, France, www.horiba.com/scientific/) was used to obtain resonance light scattering (RLS) measurements. A MPW-350R centrifuge (MPW Med. Instrument, Warsaw, Poland, <http://www.mpw.pl>) with cooled chamber of rotating, equipped with an angle rotor HSL-11199 (45°, 12 × 12 × 1.5 mL, max. speed = 18,000 rpm; 24,088 relative centrifugal force (RCF) and $r_{\min/\max} = 3.5/6.25$) was used for multiphase density gradient centrifugation.

The NPs were characterized by electron microscopy (TEM and SEM). TEM images were obtained using a CM-10 Philips microscope (Philips Research, Eindhoven, The Netherlands; <http://www.research.philips.com>) with 0.5 × 0.34 nm resolution and equipped with a digital megaview III camera. Copper grids (200C-FC) coated with a Formvar carbon film 200 mesh supplied by Aname (Madrid, Spain; <http://www.aname.es>) were used as support in TEM experiments. The XPS measurements were carried out using a Specs Phoibos 150 MCD instrument equipped with a monochromatized AlK (12 kV). The morphology and the elemental composition of Fe₃O₄@AuNPs-C12SH were studied by SEM, using a microscope (JEOL JSM 6300) operating at 20 kV, which was also equipped with an energy dispersive detector (EDX).

Solutions and reagents

All chemicals used were of analytical grade. Ficoll PM 400, percoll, tetrachloroauric acid (HAuCl₄) trihydrate and 1-dodecylthiol (C12SH), were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany, <https://www.sigmaaldrich.com>). Sucrose PA-ACS and iron (III) chloride were purchased from Panreac (Castellar del Vallès, Spain, www.panreac.es). Trisodium citrate dihydrate, iron (II) chloride and other common reagents were purchased from Merck (Darmstadt, Germany, <http://www.merck.de>). Aqueous solutions were prepared using deionized water purified with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA, www.merckmillipore.com/LabWater). Different concentrated solutions of 80 % w/v of sucrose, 23 % w/v of percoll (colloidal silica particles of 15–30 nm average diameter size, coated with PVP) and 50 % w/v of ficoll were used for preparing the MDGC layers.

Procedures for the synthesis of nanoparticles

Hydrophobic magnetic-gold NPs coated with C12SH (Fe₃O₄@AuNPs-C12SH) were obtained using a procedure described elsewhere [11]. The first

step was the synthesis of Fe₃O₄NPs by the co-precipitation method [14], in which 25 mL of an aqueous solution containing 0.8 mol·L⁻¹ iron (III) chloride, 0.4 mol·L⁻¹ iron (II) chloride and 40 mmol·L⁻¹ hydrochloric acid was dropwise added to 250 mL of 1.5 mol·L⁻¹ sodium hydroxide solution under vigorous stirring using a nonmagnetic stirrer. Black-brown Fe₃O₄NPs were immediately formed, which were separated using a commercial neodymium magnet (NdFeB) and washed three times with 200 mL deionized water. The NPs were collected by centrifugation at 1120×g for 15 min, dispersed in 100 mL of deionized water and refrigerated at 4 °C for further use. The colour of the solution was dark brown. The procedure used for coating of Fe₃O₄NPs with gold and C12SH was as follows: 2.5 mL of HAuCl₄ · 3H₂O (20 mg·mL⁻¹) was added to 22.5 mL of deionized water and heated to boiling for 40 min. Then, 0.75 mL of the above prepared Fe₃O₄NPs solution was added to the reaction mixture, followed by the addition of 0.5 mL of sodium citrate (500 mmol·L⁻¹) and 5 mL of C12SH, and the mixture was vigorously mixed under stirring. The colour of the solution gradually changed from brown to burgundy. The reaction mixture was boiled under stirring for 15 min.

Because the Fe₃O₄@AuNPs-C12SH obtained can be contaminated with other NPs such as AuNPs, AuNPs-C12SH, Fe₃O₄NPs and Fe₃O₄@AuNPs, these NPs were independently synthesized in order to carry out different separation assays. AuNPs were obtained by the conventional Turkevich method [15]. Briefly, 5 mg of HAuCl₄ trihydrate were dissolved in 47.5 mL of deionized water in a round-bottom flask. A volume of 2.5 mL of 3.4 × 10⁻² mol·L⁻¹ trisodium citrate dehydrate solution was added drop wise in 2 min and then was vigorously stirred under reflux at 100 °C for 30 min. The final aqueous solution, containing approximately 0.25 mmol·L⁻¹ AuNPs, was kept stable in refrigerator at 4 °C until use. The colour of the solution gradually changed from yellow to red. AuNPs-C12SH were obtained in the same way that AuNPs, but it included the addition of 150 µL of C12SH together with the trisodium citrate dihydrate

and the reflux time was 6–10 min [16]. The colour of the solution gradually changed from yellow to red and finally to purple. The preparation of $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs}$ was carried out using the same procedure than that for the $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs-C12SH}$ synthesis, but without the addition of C12SH [17].

Nanoparticle separation by multiphase density gradient centrifugation

The rate zonal method was used for the separation of the NPs by MDGC. The density gradient was performed using a 1.5 mL Eppendorf tube in which seven layers were formed. The bottom layer had a volume of 100 μL and each one of the other layers had a volume of 150 μL , reaching a final volume of 1 mL. Sucrose concentration layers from up to down were 5, 10, 15, 20, 30, 50 and 55 %, maintaining constant the percoll (15 %) and ficoll (30 %) concentrations. After the addition of the layers, the tube was centrifuged at $4480\times g$ for 30 min to conform the multiphase density gradient and their adequate stabilization. Then, a volume of 500 μL of the NPs mixture was added to the preformed multiphase gradient tube and centrifuged at $2520\times g$ for 40 min to achieve the separation of the NPs.

Continuous flow system

Figure 1.a shows the coupling of the MDGC system with a continuous flow system (CFS) for monitoring the NPs separation using a conventional spectrofluorimeter that acts as a RLS detector. After the separation step, the entire content of the MDGC vial was aspirated into the CFS entrapped into two air-bubbles for a switching time of 10-s using a 3-W switching valve, which delimit the initial and final gradient. The air-bubbles were introduced at position 1 of the valve and the content of the vial, at position 2. This solution was pumped at a flow rate of $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The dispersion signal of NPs was monitored at λ_{ex}

$\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$ ($\Delta\lambda = 0$), using 2 nm as excitation and emission slits and a detector gain of 950 V. Data were acquired and treated using the original software of the spectrofluorimeter. All experiments were replicated three times. **Figure 1.b** shows the results obtained after the centrifugation process, in which can be seen the bands corresponding to $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@AuNPs-C12SH}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@AuNPs}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ and AuNPs-C12SH , which are placed between the two air-bubbles.

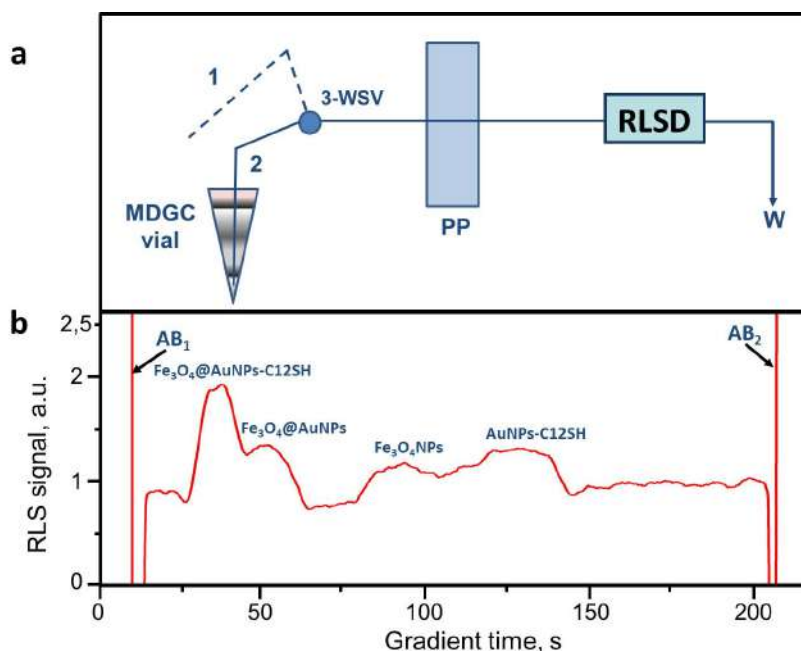


Figure 1. a Scheme of the coupling of the MDGC system with a continuous flow system equipped with a resonance light scattering detector (RLSD) 3-WSV: 3-W switching valve, which introduces air bubbles (1) or sample (2); PP, peristaltic pump; W, waste. **b** Scheme of the nanoparticles' separation. AB_1 and AB_2 , air bubbles

Results and discussion

Optimization of the synthesis of nanomaterials

Although the synthesis of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@AuNPs-C12SH}$ has been previously described [11], it was again optimized in order to increase the final amount of the

NPs obtained. This study also required to optimize again the synthesis of AuNPs, AuNPs-C12SH, Fe₃O₄NPs and Fe₃O₄@AuNPs. **Table 1** summarizes the variables optimized, the ranges assayed and the optimal values chosen.

Table 1. Optimization of variables for the synthesis of different nanoparticles

Nanomaterials	Variable	Range studied	Optimal values
Fe ₃ O ₄ @AuNPs	HAuCl ₄ , mmol · L ⁻¹	0.46–22.7	11.3
	Fe ₃ O ₄ NPs, mmol · L ⁻¹	5–25	15
	[Sodium citrate], mmol · L ⁻¹	80–750	500
Fe ₃ O ₄ @AuNPs-C12SH	[C12SH], mL	1–10	5

Optimization of the multiphase density gradient centrifugation system

A small density gradient volume was chosen (1.5-mL as final volume, using an Eppendorf tube) in order to minimise the duration of the centrifugation process. The MDGC system was performed layer-by-layer, as it has been described above, using different sucrose concentrations and constant concentrations of percoll and ficoll, because the role of these two reagents was only to stabilize the layers. The study of the variables involved in the MDGC separation process was performed in triplicate using the univariate method, by measuring the distance covered by each type of NPs from the top of the Eppendorf tube in the MDGC system. In order to establish comparative measures, this parameter was normalised in all instances.

The optimization of the sucrose gradient showed that the best results were obtained when the system was integrated by 7-layers containing from up to down 5, 10, 15, 20, 30, 50 and 55 % sucrose, using 100 µL for the bottom layer and 150 µL for the other layers, maintaining constant concentrations of 15 % ficoll and 30 % percoll. A stabilization step of the layers was required previous

to the introduction of the NPs mixture in the system, which consisted of the centrifugation of the Eppendorf for 30 min at a RCF value of 4480×g (Table 2).

Table 2. Optimization of MDGC variables

	Variable	Range studied	Chosen value
Multilayer stabilization step	R.C.F. (×g)	1120–10,080	4480
	Time, min	10–60	30
MDGC separation step	RCF (×g)	1120–10,080	2520
	Time, min	20–90	40

This table also summarises the ranges assayed for the RCF and centrifugation time to optimize the NPs separation after the stabilization step. **Figure 2** shows the influence of these variables, in which can be seen that the NPs trend to reach the bottom of the tube at high values. A centrifugation time of 40 min at a RCF value of 2520×g was chosen.

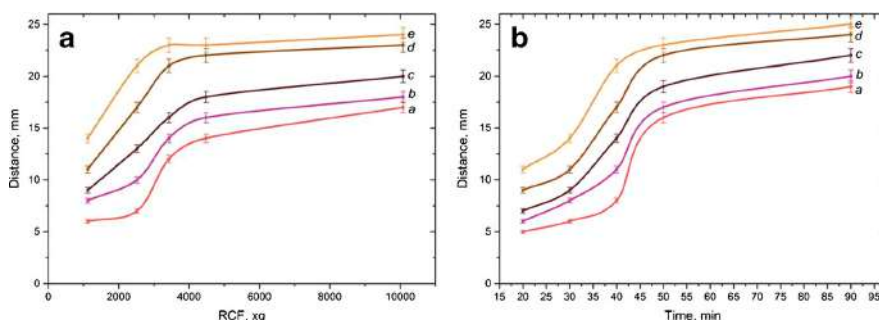


Figure 2. Optimization of the RCF (centrifugation time = 30 min) (a) and the centrifugation time (RCF = 2520×g) (b) on the separation of the NPs. (a) AuNPs, (b) AuNPs-C12SH, (c) Fe₃O₄NPs, (d) Fe₃O₄@AuNPs and (e) Fe₃O₄@AuNPs-C12SH

Optimization of the continuous flow system

The flow-rate used to transport the separated NPs from the MDGC system to the detector is a critical variable that affects to the NPs monitoring and to the final duration of the process.

The use of high flow rates gave rise to the formation of air bubbles due to the high density of the layers, whereas low flow rates increased considerably the measurement time, decreasing the sampling frequency. A flow rate of 0.5 mL min^{-1} was chosen to aspirate the 1.5 mL of the whole vial, which provided a total measurement time of 230 s , distributed as follows: 10 s for the first air-bubble, 140 s for monitoring the layers (14 s for the bottom layer and 21 s for each of the other layers), 70 s for the sample solution and 10 s for the final air-bubble.

Spectroscopic and microscopic characterization of the separated nanomaterials

After the separation step, the content of each layer was analysed using several spectroscopic and microscopic techniques such as infrared (FTIR) and X-ray photoelectron (XPS) spectroscopy, transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy coupled with energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDX). Each layer was suspended four times in water to eliminate sucrose, ficoll and percoll and dried to obtain the solid containing the NPs.

Spectroscopic characterization

The FTIR spectra of the NPs separated by the MDGC system were obtained by mixing a part of the solid with KBr and then press to form a pill. **Figure 3** shows the spectrum achieved for each fraction of the NPs. The AuNPs and AuNPs-C12SH spectra show bands between 1000 and 1500 cm^{-1} that indicate the presence of gold, as can be seen in (A). The magnetic NPs (Fe_3O_4 NPs, Fe_3O_4 @AuNPs and Fe_3O_4 @AuNPs-C12SH) show two bands between 490 and 590 cm^{-1} (B), which are ascribed to the Fe-O bond and suggest an inverse spinel structure.

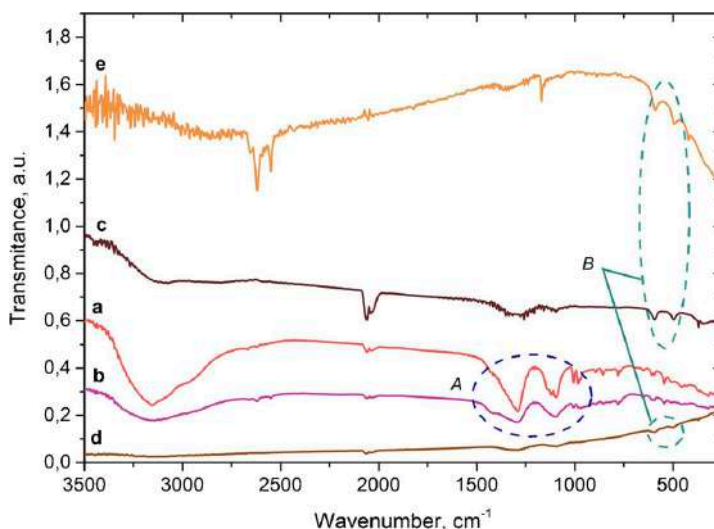


Figure 3. FTIR spectra of the different types of NPs. **a** AuNPs, **b** AuNPs- C12SH, **c** Fe₃O₄NPs, **d** Fe₃O₄@AuNPs and **e** Fe₃O₄@AuNPs-C12SH. Regions *A* and *B* show the presence of Au and magnetic NPs, respectively

The NPs obtained from the MDGC process were also characterized using XPS (**Figure 4**), which gives quantitative information of the distribution of elements on the surface of the NPs. The bands corresponding to oxygen and carbon appeared in all instances. In the case of AuNPs (**Figure 4a**) and AuNPs-C12SH (**Figure 4b**) diagrams, gold bands with two different environments but the same orbital (4f) at 84 and 89 eV can be seen, appearing an additional band for sulphur (2p_{3/2} and 2p_{1/2}) around 160 eV for AuNPs-C12SH. As **Figure 4c** shows, the energy-binding diagram of Fe₃O₄NPs only shows the presence of iron (2p_{3/2} and 2p_{1/2}) at 712–725 eV, together with oxygen and carbon. The Fe₃O₄@AuNPs diagram (**Figure 4d**) also shows the presence of Au (4f) at 84–89 eV, whereas the Fe₃O₄@AuNPs-C12SH diagram (**Figure 4e**) shows the bands corresponding to iron and gold and the sulphur band at 162.2–163.4 eV.

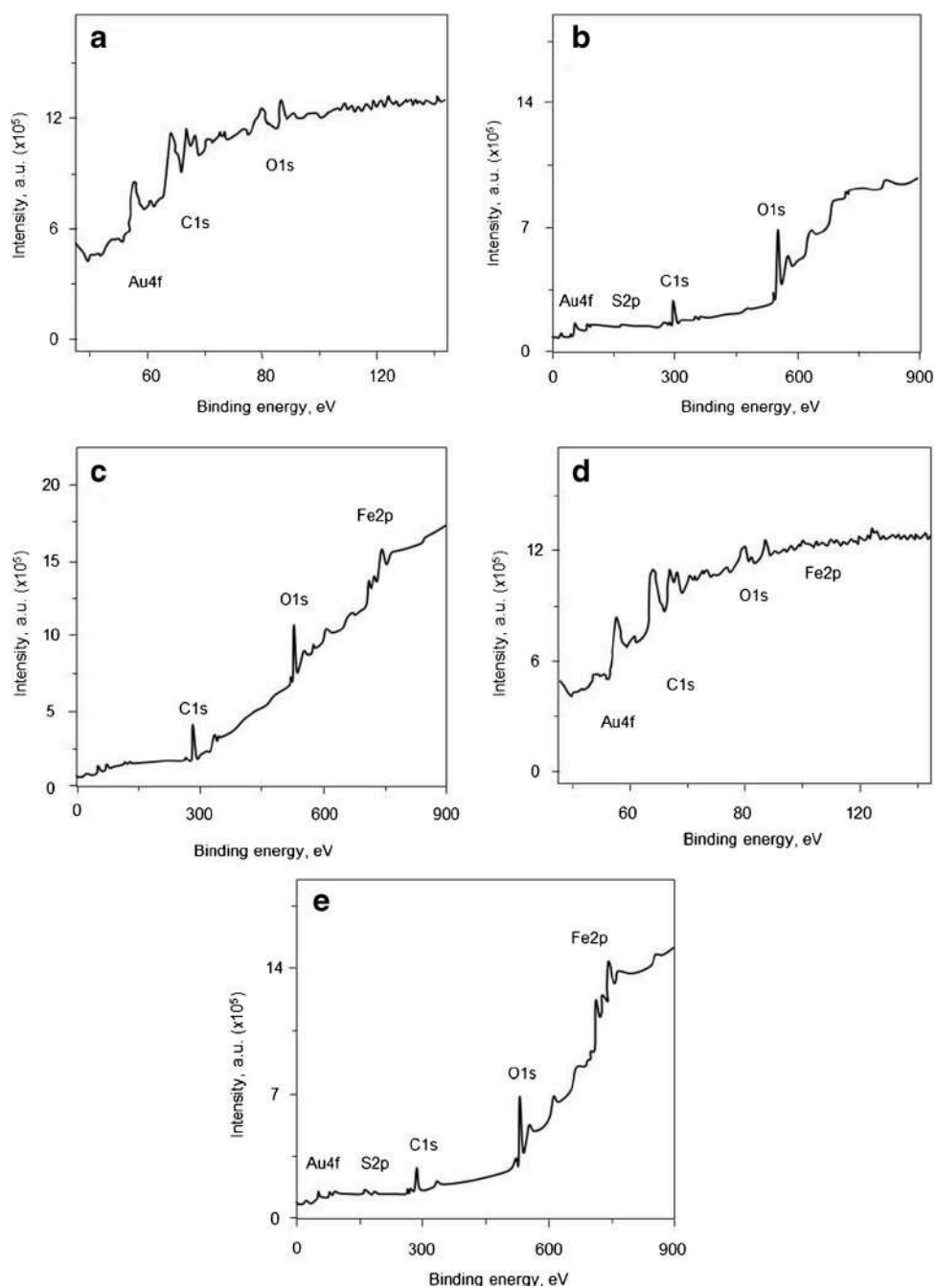


Figure 4. XPS diagrams obtained for **a** AuNPs, **b** AuNPs-C12SH, **c** Fe₃O₄NPs, **d** Fe₃O₄@AuNPs and **e** Fe₃O₄@AuNPs-C12SH

Microscopic characterization

Each NPs fraction obtained after the MDGC separation was also studied by using TEM and SEM-EDX. TEM images were obtained by using a 1:20 dilution with ethanol, placing a drop of this solution on a grid and evaporating the solvent in an oven at 70 °C for 1 h. **Figure 5a** (types 1–5) shows the images obtained for the five types of separated NPs, which provide information about the size and aggregation. The sizes obtained were 13 ± 2 nm for AuNPs, 15 ± 5 nm for AuNPs-C12SH, 19 ± 3 nm for Fe₃O₄NPs, 21 ± 5 nm for Fe₃O₄@AuNPs and 25 ± 3 nm for Fe₃O₄@AuNPs-C12SH. These average sizes were obtained by measuring 100 NPs in each instance.

Figure 5b (types 1–5) shows the results obtained using the SEM-EDX technique. All the spectra show small peaks ascribed to oxygen and carbon from the tape in which the sample is deposited. Gold peaks appear in all the spectra obtained for the NPs containing AuNPs, whereas the peak from iron appears in the spectra corresponding to the three magnetic NPs.

Evaluation of the separation system coupled to a continuous flow system

Several assays were carried out to couple the MDGC system to a CFS with the aim of monitoring the separated fractions using RLS detection. This study was carried out by applying the MDGC system to each individual type of NPs and to the mixture of NPs obtained after the synthesis of Fe₃O₄@AuNPs-C12SH, performing all the assays in duplicate. The same MDGC system was previously used to purify each synthesized type of NPs. **Figure 6** shows the results obtained, in which can be seen the band corresponding to each type of NPs: AuNPs (**Figure 6a**) appears at about 130 s, AuNPs-C12SH (**Figure 6b**) at 120 s, Fe₃O₄NPs (**Figure 6c**) at 100 s, Fe₃O₄@AuNPs (**Figure 6d**) at 50 s and Fe₃O₄@AuNPs-C12SH (**Figure 6e**) at 30 s. Although **Figure 6f** shows that the

bands corresponding to each type of NPs are considerably overlapped, the comparison of this figure with **Figure 6e** shows the usefulness of the method.

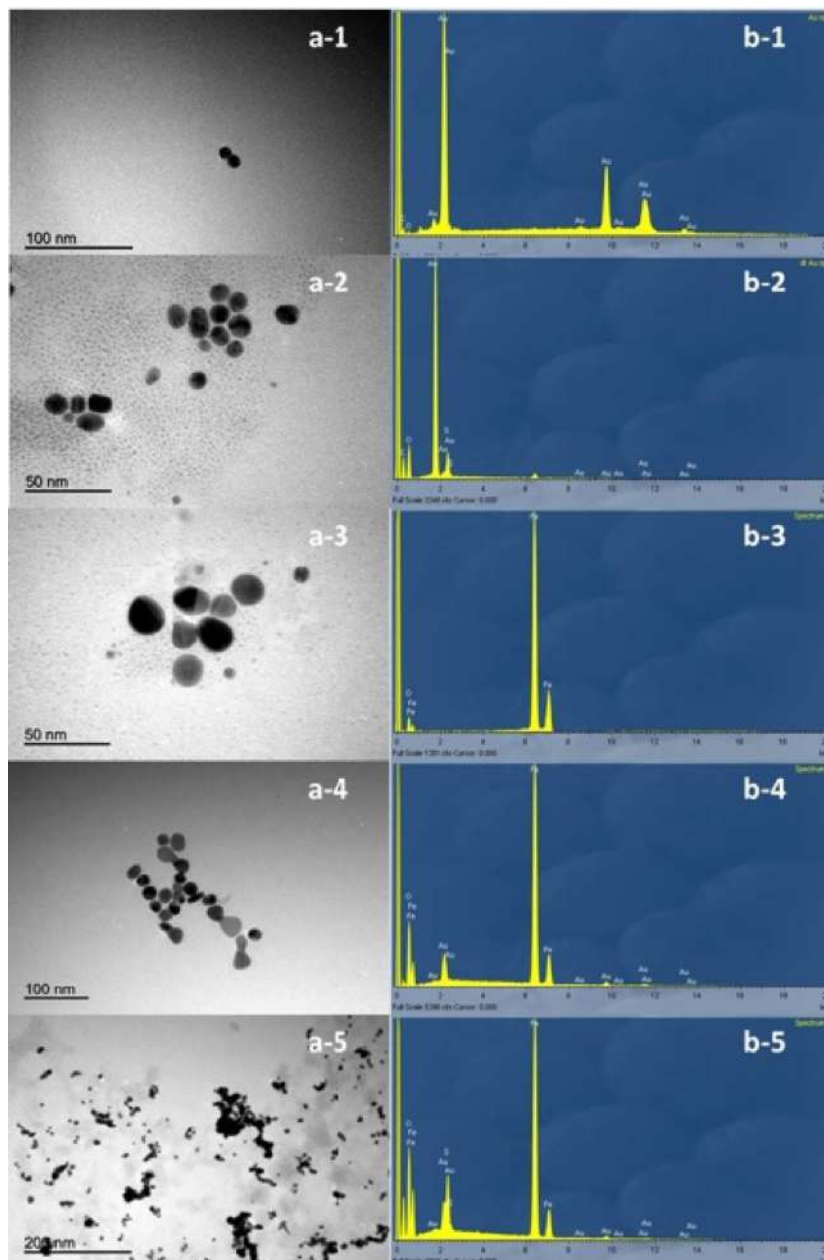


Figure 5. **a** TEM images and **b** EDX spectra obtained for (1) AuNPs, (2) AuNPs-C12SH, (3) Fe₃O₄NPs, (4) Fe₃O₄@AuNPs and (5) Fe₃O₄@AuNPs-C12SH

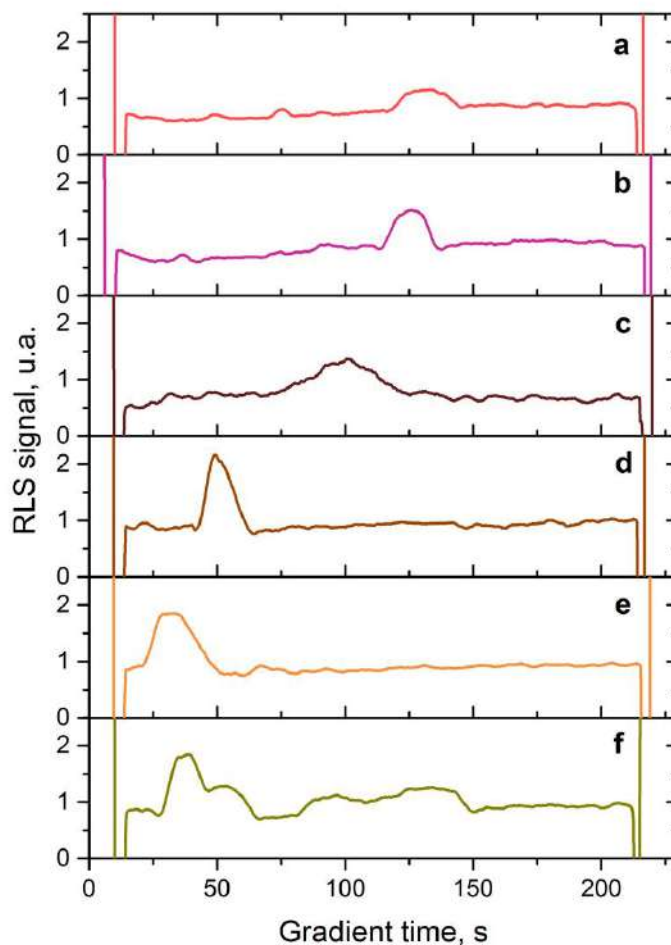


Figure 6. Application of the MDGC system coupled to the continuous flow system to monitor each individual type of NPs [a AuNPs, b AuNPs- C12SH, c Fe_3O_4 NPs, d Fe_3O_4 @AuNPs, e Fe_3O_4 @AuNPs-C12SH, and the mixture of NPs obtained after the synthesis of Fe_3O_4 @AuNPs-C12SH (f)]

Conclusions

The results obtained show that the MDGC system is a simple, economical and fast approach for the separation and purification of NPs. The usefulness of this system has been shown by assaying the separation of five types of NPs (AuNPs, AuNPs-C12SH, Fe_3O_4 NPs, Fe_3O_4 @AuNPs and Fe_3O_4 @AuNPs-

C12SH), which can be monitored using RLS detection by coupling the separation system to a continuous flow system.

The characterization of the fractions obtained using different spectroscopic and microscopic techniques confirms the capability of this system as a post-preparative method for NPs purification. Although the method does not allow the baseline separation, it could be extended to the separation of other types of NPs for preparative purposes after the corresponding experimental optimization.

Acknowledgments

Authors gratefully acknowledge financial support from the Spanish MICINN (Ministerio de Ciencia e Innovación) (Grant No. CTQ-2012-32941/BQU) and the FEDER program. Authors also wish to acknowledge to the UCO Research Support Central Service (UCO/SCAI) for the availability of the supporting techniques for NPs characterization.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest

The authors declared that they have no conflict of interest.

References

1. Wei GT, Liu FK, Wang CR (1999) Shape separation of nanometer gold particles by size-exclusion chromatography. *Anal Chem* 71: 2085–2091. doi: 10.1021/ac990044u

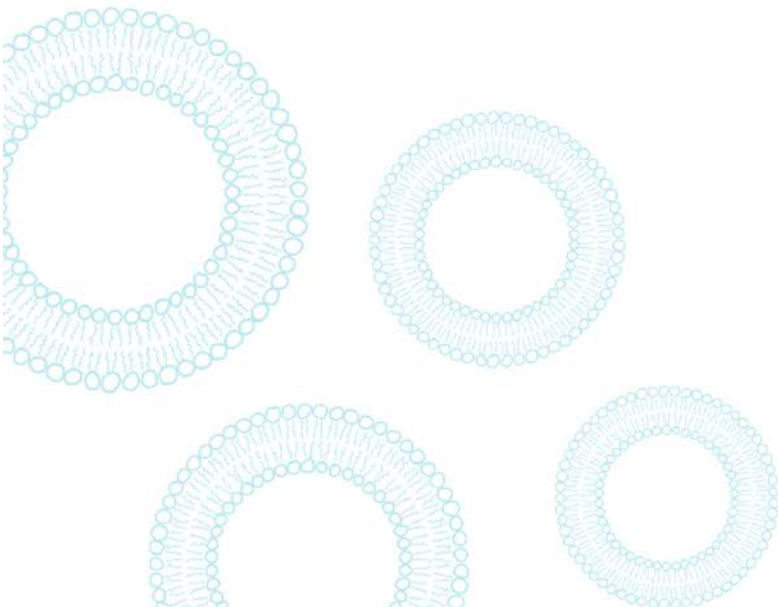
2. Hanauer M, Pierrat S, Zins I, Lotz A, Sönnichsen C (2007) Separation of nanoparticles by gel electrophoresis according to size and shape. *Nano Lett* 7:2881–2885. doi: 10.1021/nl071615y
3. Sweeney SF, Woehrle GH, Hutchison JE (2006) Rapid purification and size separation of gold nanoparticles via diafiltration. *J Am Chem Soc* 128:3190–3197. doi: 10.1021/ja0558241
4. Palencia M, Rivas BL, Valle H (2014) Size separation of silver nanoparticles by dead-end ultrafiltration: description of fouling mechanism by pore blocking model. *J Membr Sci* 455:7–14. doi: 10.1016/j.memsci.2013.12.051
5. Shiundu PM, Munguti SM, Stephen M, Ratanathanawongs W, Kim S (2003) Retention behavior of metal particle dispersions in aqueous and nonaqueous carriers in thermal field-flow fractionation. *J Chromatogr A* 983:163–176. doi: 10.1016/S0021-9673(02)01694-1
6. Kim ST, Kang DY, Lee S, Kim WS, Lee JT, Cho HS, Kim SH (2007) Separation and quantitation of silver nanoparticles using sedimentation field-flow fractionation. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 30:2533–2544. doi: 10.1080/10826070701540092
7. Steinigeweg D, Schütz M, Salehi M, Schlücker S (2011) Fast and cost-effective purification of gold nanoparticles in the 20–250 nm size range by continuous density gradient centrifugation. *Small* 17: 2443–2448. doi: 10.1002/sml.201100663
8. Xiong B, Cheng J, Qiao Y, Zhou R, He Y, Yeung ES (2011) Separation of nanorods by density gradient centrifugation. *J Chromatogr A* 1218:3823–3829. doi: 10.1016/j.chroma.2011.04.038

9. Dong S, Wang Y, Liang A, Li X, Zhang Q. Separation of gold nanorods by viscosity gradient centrifugation. *Microchim Acta*. doi: 10.1007/s00604-015-1709-z
10. Sánchez-López V, Fernández-Romero JM, Gómez-Hens A (2009) Evaluation of liposome populations using a sucrose density gradient centrifugation approach coupled to a continuous flow system. *Anal Chim Acta* 645:79–85. doi: 10.1016/j.aca.2009.04.045
11. Román-Pizarro V, Fernández-Romero JM, Gómez-Hens A (2014) Fluorometric determination of alkaline phosphatase activity in food using magnetoliposomes as on-flow micro-container devices. *J Agric Food Chem* 62:1819–1825. doi: 10.1021/jf5004804
12. Chang Y, Hsieh PH, Chao CCK (2009) The efficiency of percoll and ficoll density gradient media in the isolation of marrow derived human mesenchymal stem cells with osteogenic potential. *Chang Gung Med J* 32:264–275
13. Akbulut O, Mace CR, Martinez RV, Kumar AA, Nie Z, Patton MR, Whitesides GM (2012) Separation of nanoparticles in aqueous multiphase systems through centrifugation. *Nano Lett* 12:4060–4064. doi: 10.1021/nl301452x
14. Cui YR, Hong C, Zhou YL, Li Y, Gao XM, Zhang XX (2011) Synthesis of orientedly bioconjugated core/shell Fe₃O₄@Au magnetic nanoparticles for cell separation. *Talanta* 85:1246–1252. doi: 10.1016/j.talanta.2011.05.010
15. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J (1951) A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Soc* 55:55–75. doi:10.1039/df9511100055

16. Román-Pizarro V, Fernández-Romero JM, Gómez-Hens A (2012) Gold nanoparticle-biotinilated liposome hybrids as analytical reagents for biotin determination using a competitive assay and resonance light scattering detection. *Talanta* 99:538–543. doi:10.1016/j.talanta.2012.06.029
17. Rudakovskaya PG, Beloglazkina EK, Majouga AG, Zyk NV (2010) Synthesis and characterization of terpyridine-type ligand-protected gold-coated Fe₃O₄ nanoparticles. *Mendeleev Commun* 20:158–160. doi:10.1016/j.mencom.2010.05.012

CAPÍTULO 1.2

Luminescence continuous flow system for monitoring the efficiency of hybrid liposomes separation using multiphase density gradient centrifugation





Luminescence continuous flow system for monitoring the efficiency of hybrid liposomes separation using multiphase density gradient centrifugation

Ángela Écija-Arenas, Vanesa Román-Pizarro, Juan Manuel Fernández-Romero

Departamento de Química Analítica, Instituto Universitario de Investigación en Química Fina y Nanoquímica (IUNAN), Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Anexo "Marie Curie", E-14071 Córdoba, España

Abstract

A method for monitoring the efficiency of the hybrid magnetoliposomes (h-MLs) separation using multiphase density gradient centrifugation (MDGC) coupled with a continuous flow system (CFS) is described. Several h-MLs suspensions containing hydrophobic magnetic gold nanoparticles ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs-C12SH}$) and different fluorophores encapsulated have been synthesized using the rapid solvent evaporation (RSE) method. The MDGC system was prepared using a non-linear multiphase density gradient formed with a bottom layer with 100% (v/v) sucrose solution and six layers containing a mixture of sucrose solution (with concentrations ranged between 10 and 55% v/v), and fixed concentrations of ficoll (30% v/v) and percoll (15% v/v) solutions. The density gradient profile was previously stabilized using a relative centrifugal force (RCF) of $4480\times g$ for 30 min. The synthesized h-MLs were added to the density gradient profile and separated by centrifugation at $2520\times g$ for 20 min. The efficiency of the separation procedure was tested, aspirating the separated extract into the CFS and lysing liposomes before their translation to

the detector introducing surfactant solutions. The luminescence signals provided by the release of the encapsulated fluorophores and other materials provided the distribution status of the liposomes in each density gradient stage. The monitoring of the different samples revealed four different fractions (MLs, h-Ls, h-MLs, and non-encapsulated fluorophores) for each separated h-MLs. Additional information on the h-MLs has also been acquired by confocal microscopy.

Keywords: Liposomes separation, Multiphase density gradient centrifugation system, Continuous flow system, Fluorescence

1. Introduction

The extensive use of nanomaterials (NMs) in different areas, including biomedicine, food technology, cosmetics, electronics, and analytical applications, among others, have given rise to significant efforts in the last years directed to improve the synthesis and purifications methods to obtain nanomaterials. Liposomes are bilayer vesicles formed by phospholipids dispersed in water, which can be seen as a type of NMs as some of them reach sizes from nm to μm levels. As known, liposomes have been useful as microcontainer tools with an aqueous compartment surrounded by one or more lipid bilayers. This structure allows the entrapping of hydrophobic substances within the acyl chains of the bilayer and hydrophilic molecules in the aqueous cavity and the insertion of amphiphilic contents in the polar head groups. The resulting nanomaterials usually named hybrid liposomes (h-Ls), provides a high number of applications in a variety of areas such as food, pharmaceutical, and cosmetic industries, medical imaging, and gene therapy, mainly as delivery systems [1–7]. Also, hybrid liposomes have been described as amplification systems to improve the sensitivity of analytical methods [8].

A particular type of liposomes, magnetoliposomes (MLs), are usually loaded with magnetic iron oxide nanoparticles ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$). They have been used as a drug delivery system for cancer or heart treatments using entrapped drugs or as multimodal contrast agents for molecular imaging [9–11]. The analytical usefulness of MLs as an amplification system has been shown using hybrid magnetoliposomes (h-MLs), liposomes containing magnetic nanoparticles, and other reagents. For instance, loading 4-methylumbelliferyl-phosphate for the fluorimetric determination of alkaline phosphatase in milk samples [12]. Literature also provides additional information about the use of h-MLs loaded with compounds that exhibit optical properties that facilitates signal monitoring. Some strategies have been based on the absorption measurement using pyranine (HPTS) encapsulated in h-MLs as pH indicators [13], or luminescence measurement of several fluorophores loaded in h-MLs, such as HPTS [14], rhodamine B [15], cresyl violet for the Q10 determination [16] and naphthofluorescein (NF) for the determination of reactive oxygen species (ROS) [17,18].

The synthesis of h-MLs involves different procedures that provide variability in some features such as shape, size, polydispersity, and species encapsulation that require separation stages before their use for analytical purposes. A growing interest is focused on the development of separation methods to obtain purified h-MLs populations. The effectiveness of these purification steps critically influences their physical and chemical properties, also their applicability as microcontainers. Different separation methods have been applied to separate diverse h-Ls populations with an acceptable degree of purity. Thus, chromatographic techniques, based on size exclusion chromatography (SEC) [19–21] or hydrodynamic chromatography (HDC) [22,23] have been widely used. SEC separation of liposomes has been applied as previous studies of polydispersity, size stability, encapsulation efficiency, and bilayer permeabilization. The flow rate of the mobile phase influence

dramatically on the liposome separation by HDC. Another option to separate liposomes is based on capillary electrophoresis (CE) [24,25], which has been a useful tool to study encapsulation efficiency. However, it is limited by the minimal injection volumes used and the influence of surface charges, sizes, and shapes on electrophoretic mobility. Field-flow fractionation (FFF) is a powerful technique that has also been used to separate several liposomes [26,27], which suppose a novelty to evaluate the variables affecting the separation behaviour, even though it is time-consuming and laborious.

Among different techniques to separate NMs, the density-gradient centrifugation method is simple, inexpensive, straightforward, and has been applied for the separation of nanomaterials and subcellular structures [28–33]. The density gradient is created in a centrifuge tube by sequentially layering solutions of different densities, increasing from top to bottom of the vial. Then, the sample is added on top of the density gradient and is subjected to centrifugation. During zonal centrifugation, the particles in suspension begin to sediment through the gradient into separate zones according to sedimentation coefficient, according to the particle mass, size and shape, not to the density. This technique is useful to separate materials with similar density. The separation has to finish before the materials reach the bottom of the separation tube. Usually, the density gradient is prepared with sucrose, glycerol [28–31], and other solutions including ficoll (high-molecular sucrose polymer) and percoll (suspension of colloidal silica particles with an average diameter of 15–30 nm coated with polyvinylpyrrolidone) [32,33] which provide adequate viscosity and stabilization of centrifugation media.

In this research, a method for monitoring the efficiency of h-MLs separation and purification using a fast, inexpensive, and straightforward multiphase density gradient centrifugation (MDGC) method coupled with a continuous flow detection system, is presented. The separation method is carried-out by zonal centrifugation in which the compounds have been

separated according to the particle size, shape, and density. The efficiency of the separation process was tested by coupling the separate MDGC tube with a continuous flow system with luminescence detection.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

All chemicals used were of analytical grade. 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC), 3-sn-phosphatidylethanolamine (DOPE) (type II-S from sheep brain), cholesterol (CH), cresyl violet acetate (CV), naphthofluorescein (NF), 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt (HPTS), tetrachloroauric acid (HAuCl₄) trihydrate, 1-dodecylthiol (C12SH), Ficoll PM 400, Percoll, Triton X-100 and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany, www.sigma-aldrich.com). Sucrose and iron (III) chloride were purchased from Panreac (Montplet and Esteban SA, Barcelona-Madrid, www.panreac.es). Iron (II) chloride, Rhodamine B (RB), and other common reagents were purchased from Merck (Darmstadt, Germany, www.merckgroup.com). A 50 mmol L⁻¹ of disodium hydrogen phosphate (Merck) adjusted to pH 8 was used as a buffer solution to prepare all solutions. Deionized water purified with a Milli-Q system (Millipore S.A.S., Molsheim, France, www.millipore.com) was also used.

For preparing the MDGC layers, differently concentrated solutions of 80% w/v of sucrose, 23% w/v of percoll, and 50% w/v of ficoll. Four stock solution of 5 mmol L⁻¹ of each fluorophore (HPTS, RB, CV, and NF) were prepared for the synthesis of their respective h-MLs.

2.2. Apparatus and instruments

All luminescence measurements were performed in a Horiba Scientific Fluorolog-3P spectrofluorometer (Horiba Scientific, France, www.horiba.com/scientific/). This spectrofluorimeter is furnished with a 176-052-QS Hellma (Hellma, Müllheim, Germany, www.hellma.com) flow cell, with an inner volume of 18 μL . A four-channel peristaltic pump with rate selector Minipuls-3 (Gilson S.A.S., Villiers le Bel, France, www.gilson.com) and Omnifit (Diba Industries, Inc., Cambridge, UK, www.dibain.com), Teflon tubing of 0.5 mm ID was used for the construction of the hydrodynamic manifold. An MPW-350R centrifuge (MPW Med. Instrument, Warsaw, Poland, www.mpw.pl) with cooling chamber of rotating, equipped with an angle rotor HSL-11199 (45° , $12 \times 12 \times 1.5$ mL, max. Speed = 18,000 rpm, 24,088 RCF and $r_{\text{min/max}} = 3.5/6.25$) was used for multiphase density gradient centrifugation. A Büchi rotavapor R-205 (Flawil, Switzerland, www.buchi.com) was used to evaporate the organic solvent and added enough aqueous phase containing the fluorophores to form the liposomes. A Zeiss LSM 880 confocal microscopy (Zeiss, Germany, www.zeiss.com) with up to 8 images/s with 512×512 pixels and a scanning resolution of 4×1 to 6144×6144 pixels providing a resolution improvement of $1.8 \times$ in all dimensions (120 nm X–Y, 350 nm Z), a signal-to-noise ration ranged between 4 and 8, and equipped with UV, VIS, and NIR lasers with beam splitters for four laser lines (405, 488, 561 and 640 nm) and descanning channels integrated by 3, 6, or 34 passes and the following detectors: GaAsP, multialkali (MA)PMT or Airyscan (GaAsP PMT or MA PMT) detector.

2.3. Synthesis of hybrid magnetoliposomes

The synthesis of h-MLs was performed in subsequent stages using several previously reported procedures consisting on the formation of hydrophobic magnetic NPs (Fe_3O_4 @AuNPs-C12SH) and then entrapped into

the synthesized h-MLs using the Rapid Solvent Evaporation (RSE) process. Both processes were adequately refereed, and their description was avoided [16,33]. 100 μL of a stock solution of 5 mmol L^{-1} of each fluorophore was added in the synthesis process, so the final concentration of fluorophores in the 10 mL synthesis mix was 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Encapsulation efficiency of fluorophores in liposomes was between 30 and 50%, so a concentration of 15–25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ were encapsulated. Once liposomes were synthesized, they were stored at 4 °C and were stable for at least 30 days.

2.4. Multiphase density gradient centrifugation separation of h-MLs

The multiphase density gradient centrifugation (MDGC) procedure used, with scarce modifications, is based on the rate zonal mode centrifugation method previously described for the separation of NPs [33]. The density gradient was performed using a 1.5 mL Eppendorf tube in which seven layers of a mixture containing sucrose, ficoll, and percoll were formed, obtaining a final volume of 1 mL. The gradient profile was performed up to down ranged between a bottom layer of 100 μL with 100% sucrose solution and six continuous layers of 150 μL formed with different concentrations of sucrose and fixed concentrations of ficoll and percoll. The other six layers were created with a sucrose concentration gradient from up to down of 10, 20, 30, 40, 50, and 55%, maintaining constant the concentration of percoll (15%) and ficoll (30%). After the addition of the different layers, the definitive density gradient was preformed by centrifugation of the Eppendorf tube at 4480 \times g for 30 min, enough to achieve an adequate stabilization. For the separation step, 500 μL of the selected synthesized liposomes were added to the preformed tube and centrifuged at 2520 \times g for 20 min to achieve the liposome separation. The separation efficiency was tested using a double method, coupling the separation tube to a continuous flow system (CFS), and using confocal microscopy.

2.5. Continuous flow system

Fig. 1-A shows the manifold that provides the coupling between the MDGC separate tube with a CFS for monitoring h-MLs that reveals the separation process. The integrated method used a conventional spectrofluorimeter, which offers two types of signal: the luminescent signal from the selected fluorophore (free or encapsulated into h-Ls) and the light-scattering signal from the dispersive effect of Fe_3O_4 NPs (encapsulated or not into liposomes). After the separation step, the entire content of the MDGC vial was aspirate through the CFS and entrapped into two air-burbles of 10-s using a 3-way switching valve, which delimited the initial and the final time of the MDGC gradient. Each of the air-bubbles was introduced by switching the 3-way valve to position 1, and the content of the vial at position 2. The solution aspirated from the tube was mixed with a solution containing a different surfactant compatible with the fluorophore to be monitored. Both solutions were pumped at a flow rate of 0.75 mL min^{-1} . The mixture solution passed through an 85 cm-length coil reactor that provided enough time for the liposome disruption previous to go through the detector. Each separation vial was monitored at the optimal values of the instrumental variables (excitation/emission wavelengths, ex/em slit sizes, and power detector gain) according to the fluorophore encapsulated, and MLs were monitored at all wavelengths, to compare with each of the fluorophores. **Table 1** depicts the luminescence characteristics of the selected fluorophores [34–38]. As can be seen, the emission characteristic of these fluorophores provides a wide range of wavelengths which covered between the visible to the long-wavelength emission (LWFs) zones, and the selected fluorophores also present several differences between their quantum yield values. Each of the monitored separation suspension was performed in triplicate, and the results were the average of these repetitions. **Fig. 1-B** shows a general separation profile that could be obtained after the centrifugation process, in which can be seen different zones that correspond to MLs or h-Ls, follows by several segments in

which appeared the h-MLs with the entrapped fluorophores, and finally, the zone in which appeared the different non-encapsulate fluorophores. This scheme constitutes the general distribution of the different families of nanostructures that could be appeared after the process of liposome synthesis. The measurement time corresponds to the time between two consecutively introduced air-bubbles, marking the rate of continuous separation process monitoring.

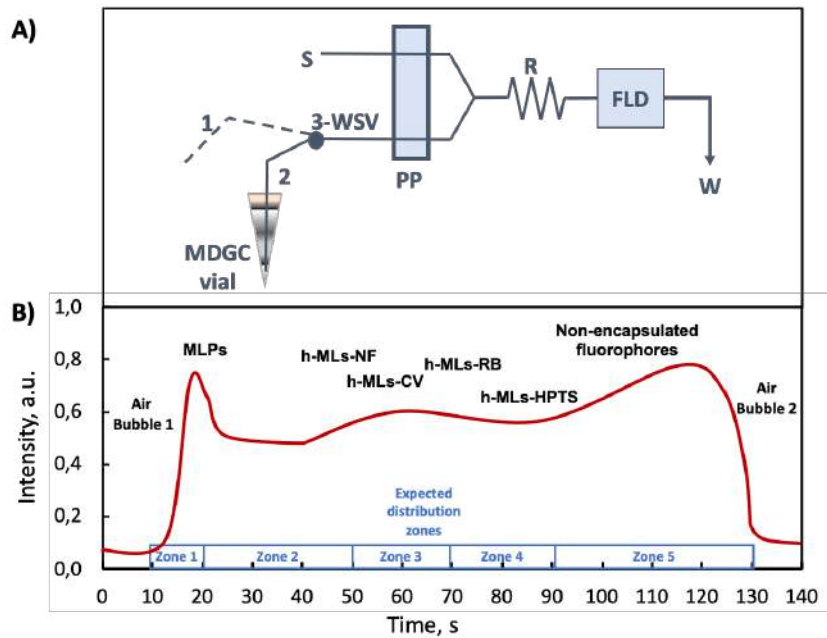


Fig. 1. (A) Scheme of the coupling MDGC system with the continuous flow system equipped with a spectrofluorimeter (FLD). 3-WSV: 3-W switching valve, which introduces air bubbles (1) or sample (2); S: Surfactant solutions; PP: Peristaltic pump; R: Reactor; W: Waste. (B) General scheme of a hybrid liposome separation profile in which the probably zones where each separated material was located can be seen.

Table 1. Instrument features of the fluorophores entrapped into the synthesized h-MLs.

Variables	Selected fluorophores ^a			
	HPTS	RB	CV	NF
Excitation wavelength, nm	466	553	585	603
Emission wavelength, nm	530	574	627	685
Excitation/emission slits, nm	2/2	2/2	2/2	2/2
PMT gain, V	950	950	950	950
Quantum yield (Φ_f) ^b	1.0	0.70	0.58	0.14
ϵ , mol ⁻¹ L cm ⁻¹ ($\cdot 10^4$) ^c	21.6	116	28	4.53

^a HPTS denotes 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt; RB, rhodamine B; CV, cresyl violet, and NF, naphthofluorescein.

^b Quantum yield obtained from references [34–37].

^c Molar absorptivity values obtained from Ref. [38].

3. Results and discussions

3.1. Optimization of variables

3.1.1. Variables affecting the synthesis of hybrid magnetoliposomes

The variables affecting the synthesis of h-MLs containing the hydrophobic MNPs and the encapsulated fluorophores were studied using the univariate method. Concerning the synthesis of the Fe₃O₄@AuNPs- C12SH, the optimization procedure was focused on obtaining hydrophobic NPs, which could be entrapped between the phospholipid bilayer, which was established in previous studies developed by the same research group [12,33]. The h-MLs were prepared using the rapid solve evaporation (RSE) method, also previously described [12]. The influence of each variable was studied, summarizing all variables optimized, the ranges assayed, and the optimal value chosen in **Table 2**.

Table 2. Optimization of variables affecting the liposome formation.

Type	Variable	Range studied	Optimal value
Fe ₃ O ₄ NPs@AuNPs-C12SH formation	HAuCl ₄ , mmol L ⁻¹	0.005–0.063	0.05
	Fe ₃ O ₄ NPs, mL	0.25–1	0.75
	Sodium citrate, mmol L ⁻¹	0.2–1	0.5
	1-dodecylthiol, mL	1–10	5
Liposome formation	DSPC, mmol L ⁻¹	0.45–0.72	0.68
	POPE, mmol L ⁻¹	0.045–0.135	0.11
	CH, mmol L ⁻¹	0.045–0.135	0.11
	Chloroform, μ L	600–900	880
	Methanol, μ L	100–400	120
	Buffer volume, mL	1–20	9
	Fe ₃ O ₄ NPs@AuNPs-C12SH, mL	1–5	3
	[Fluorophore], mmol L ⁻¹	0.01–0.5	0.1
	Temperature, °C	30–60	40
	Evaporation time, min	5–30	15
Rotatory speed, rpm	5–500	300	

3.1.2 Variables affecting the multiphase density gradient centrifugation system

The study of the variables involved in the MDGC separation process was assayed in the same way that the previous research [33] based on the test of different density gradients performed using a final volume of 1.5 mL in an Eppendorf, selected to minimize the required centrifugation time. The multiphase density gradient was performed layer-by-layer, following the procedure described in the experimental section. The study of the variables involved in the MDGC system was performed in triplicate using the similar univariate method previously used by the authors supported on measure the distances covered by each type of separate nanostructures from the top of the Eppendorf tube in the MDGC system. **Table 3** summarized the variables optimized, range assayed, and the optimal or selected values.

Table 3. Optimization of MDGC variables.

	Variable	Range studied	Optimal value
Multilayer stabilization step	RCF, ×g	1120 – 10080	4480
	Time, min	10 – 60	30
MDGC separation step	RCF, ×g	1120 – 10080	2520
	Time, min	10 – 60	20

The optimization of the sucrose gradient showed the best results when the system was integrated by 6-layers of 150 μL containing from up to down 10, 20, 30, 40, 50, and 55% sucrose, maintaining constant concentrations of 30% ficoll and 15% percoll. In comparison with the previous separation method used for NPs separation, this approach incorporates as a novelty the addition of a new layer located at the bottom of the preformed gradient, formed by 100 μL of a 100% sucrose solution. A stabilization step of the gradient layers was required previous to the introduction of the liposome mixture in the system, obtaining the best stabilization at a relative centrifuge force (RCF) value of 4480×g and a centrifugation time of 30 min. Regarding the separation step, an RCF value of 2520×g and a centrifugation time of 20 min was chosen.

3.1.2. Variables affecting the continuous flow system

The optimization of the continuous flow system was aimed to bear in mind a compromise between the optimal condition for monitoring the native fluorescence of each fluorophore by disruption of each separate structure and the rapid transition to the luminescence detector. The variables that influence the system were studied using a univariate method. **Table 4** shows the range of whiting they were considered, and the optimal value found.

Table 4. Optimization of variables affecting the continuous flow system.

Type	Variable	Range studied	Optimal value	
Hydrodynamic	Flow rate, mL min ⁻¹	0.25–1.25	0.75	
	Reactor length, cm	85–190	85	
Chemical	pH	6–10	8	
	[Na ₂ HPO ₄] buffer, mmol L ⁻¹	5–100	50	
	Triton X-100, mmol L ⁻¹	0.2–15	CV	RB
			10	1
	CTAB, mmol L ⁻¹	1–20	HPTS	NF
10			5	

All experiments were carried out at a room temperature of 25 °C because higher values caused the rupture of liposomes previous their MDGC separation. The flow rate and reactor lengths were the main variables that influence the pass of the multidensity gradient layers with the disrupted liposomes through the detector and contributed to the resolution of the system, affecting the final duration of the monitoring process. High flow rates decreased the efficiency of the liposomes disruption and could modify the resolution, while low flow rates increased the monitoring time considerably and reduced the sampling frequency. A flow rate of 0.75 mL min⁻¹ provided a whole measurement time of 140 s, which includes a sequence time as follow: 10 s for the first air-bubble, 80 s for monitoring the gradient (distributed as 8 s for the bottom layer and 12 s for each of the other six layers), 40 s for the sample liposomes suspension and 10 s for the final air-bubble. The influence of the reactor length was assayed in arrange between 85 and 190 cm, selecting a coil reactor of 85 cm as the minimal length that provided the disruption of the liposomes by the lysis solution with the minimal dispersion of the separated multidensity gradient layers.

Surfactants are denaturing agents which provide the liposome disruption due to their capability to conjugate with the phospholipids, giving rise to the formation of aggregate structures. Three different types of surfactants,

including ionic (cetyltrimethylammonium sulfate and sodium dodecylsulfate) and non-ionic (Triton X-100) surfactants, were assayed. As can be seen in **Fig. 2**, the optimization was focused on the effect provided by Triton X-100 and CTAB, because SDS no provide any adequate disruption of the whole liposome populations. **Table 4** includes the selected effective concentration of each surfactant according to the type of fluorophore encapsulated into the hybrid liposome. As shown, 1 and 10 mmol L⁻¹ of Triton X-100 were selected for RB and CV, respectively, and 5 and 10 mmol L⁻¹ of CTAB was selected for NF and HPTS, respectively. A pH 8, adjusted with a 50 mmol L⁻¹ phosphate buffer solution, was chosen at which all liposomes were stable and their lysis due to the surfactant was ensured, so the rupture wasn't before the reactor.

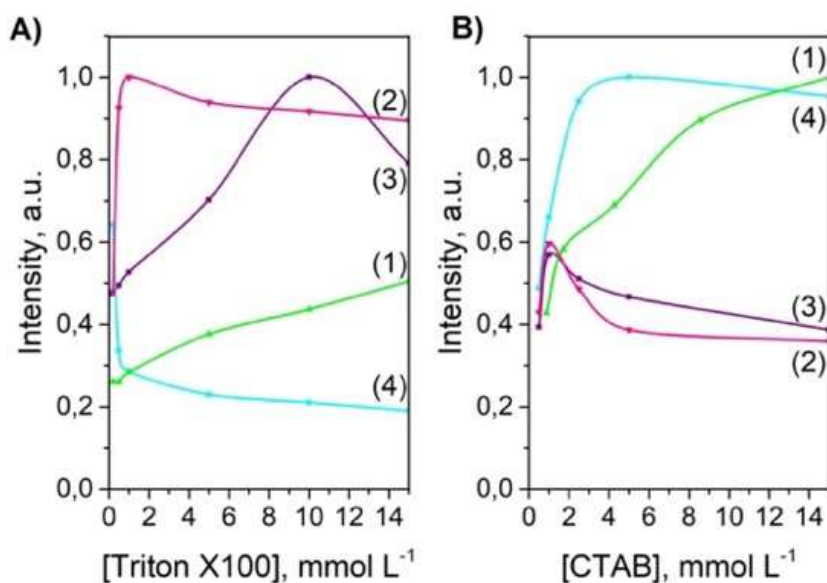


Fig. 2. Optimization of the use of surfactants for h-MLPs release for continuous monitoring of the fluorophores content: Triton X-100 (A) and CTAB (B). (1), denotes HPTS, (2), RB, (3) CV and (4) NF fluorophores, respectively.

3.2. Performance of the MDGC separation coupled with the CFS

The MDGC system, coupled with the CFS provided an adequate way to monitor the separated fractions resulting from the h-MLs synthesis with a satisfactory record between the incorporation of both air bubbles. Different suspensions containing each type of the liposome were assayed (MLs, h-Ls, and h-MLs) with each fluorophore to establish an adequate identification of the provided fractions. Sections A to D in **Fig. 3** show the separation profiles of liposomes containing each of the fluorophores (HPTS, RB, CV, and NF) monitored separately. Each figure section includes the profile achieved at optimum excitation and emission wavelength of each fluorophore (1), the dispersion light scattering (DLS) signal of MLs reached at the same wavelength (2), and an image of the separate materials in the Eppendorf tube, showing the physical zones in which appeared each separated hybrid material (MLs, h-Ls, h-MLs and the non-encapsulated fluorophore) (3).

The registration profile began at 10 s of the start of the first bubble, and five well-defined zones could be observed. When doing the monitoring of the separation of the MLs synthesis, their signal was found in the bottom layer (10–18 s) at all wavelengths, assigning Zone 1 of the separation. In this case, the DLS signal was found because MLs do not show fluorescence. In the case of h-Ls, all fluorophore liposomes stayed in the second and third layers (18–42 s), which is Zone 2 of separation. Regarding h-MLs, they remained in the middle layers. When the fluorophore was RB, CV, or NF, h-MLs appeared at 54–66 s (Zone 3); but when it was HPTS, h-MLs appeared at 66–90 s (Zone 4). Both, in h-Ls and h-MLs profiles, a signal in sample zone (90–130 s) appeared, due to non-encapsulated fluorophores into the liposomes, according to Zone 5.

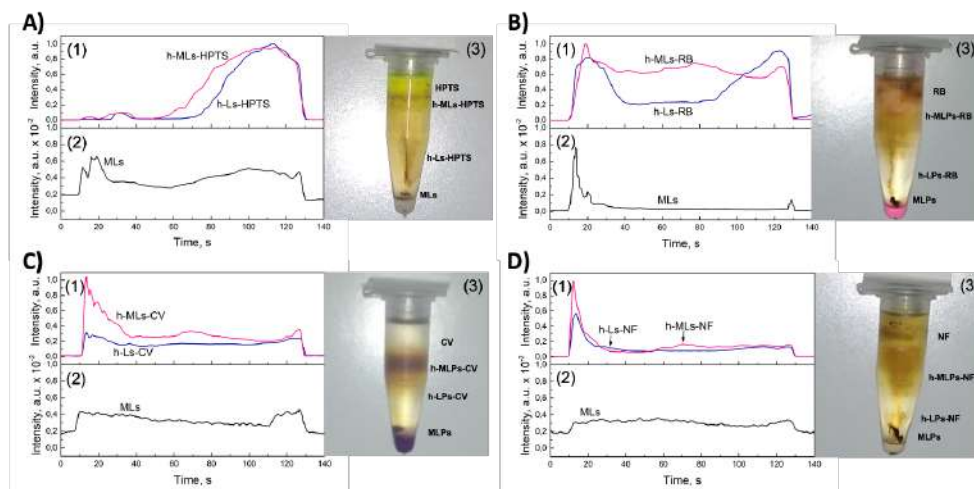


Fig. 3. Monitoring of the different profiles achieved using the MDGC separation coupled with the CFS system of separated liposomes suspension synthesized using the encapsulated fluorophores (HPTS, RB, CV, and NF) (A to D, respectively). Each figure section incorporates the measured profile of h-Ls-X and h-MLs-X (X, denotes the used fluorophores) performed at the specific fluorophore wavelength (1), the DLS signal of MLs (2) and the picture of each Eppendorf tube (3).

The developed technique using a multiphase density gradient centrifugation system is based on zonal centrifugation, in which the separation depends on the sedimentation coefficient and occurs principally due to mass, size, and shape of materials. MLs are the heaviest liposomes due to the encapsulated nanoparticles so that these liposomes could reach the bottom of the gradient. In the case of h-Ls, only the fluorophore was inside, their shape was more homogeneous, and their mass was less than MLs, so they reach the middle of the separation tube. Regarding h-MLs, a competition between nanoparticles and fluorophores made the liposome more extended, so the sedimentation coefficient increased, and their separation rate decreased, remaining on top of the gradient.

3.3. Characterization of the separated liposomes

In previous papers, several techniques to characterize the different nanoparticles and liposomes synthesized by the same research team and also used in this research have been described [16,17,30,33]. In these studies, the size of nanoparticles and liposomes was found. Nanoparticles had an average diameter of 25 ± 3 nm and liposomes had different sizes, according to the different populations. If the liposomes are not subjected to any homogenization procedure, multivesicular (MVV) and multilamellar (MLV) liposomes with a size between 500 nm and 1 μ m was found. According to these sizes, between 20 and 30 nanoparticles could be encapsulated into liposomes. This research incorporated additional information, observed in **Fig. 4**, achieved using confocal microscopy for the characterization of the hybrid liposomes separated using the MDGC system coupled with the CFS. **Fig. 4-A** shows a fraction from the MLs zone, in which the Fe₃O₄NPs included in the liposomes were found. **Fig. 4-(B-E)** shows different confocal microscopy images of h-MLs filtering the wavelength achieved at excitation (488, 561 and 640 nm filters was used) and emission wavelength compatible with the optimal condition to monitor the luminescence images of each encapsulated fluorophores. MVV formed with HPTS were observed, as can be seen in **Fig. 4-B**, apart from an excess of the non-encapsulated fluorophore was found because this compound appeared in the same zone of the separation Eppendorf tube.

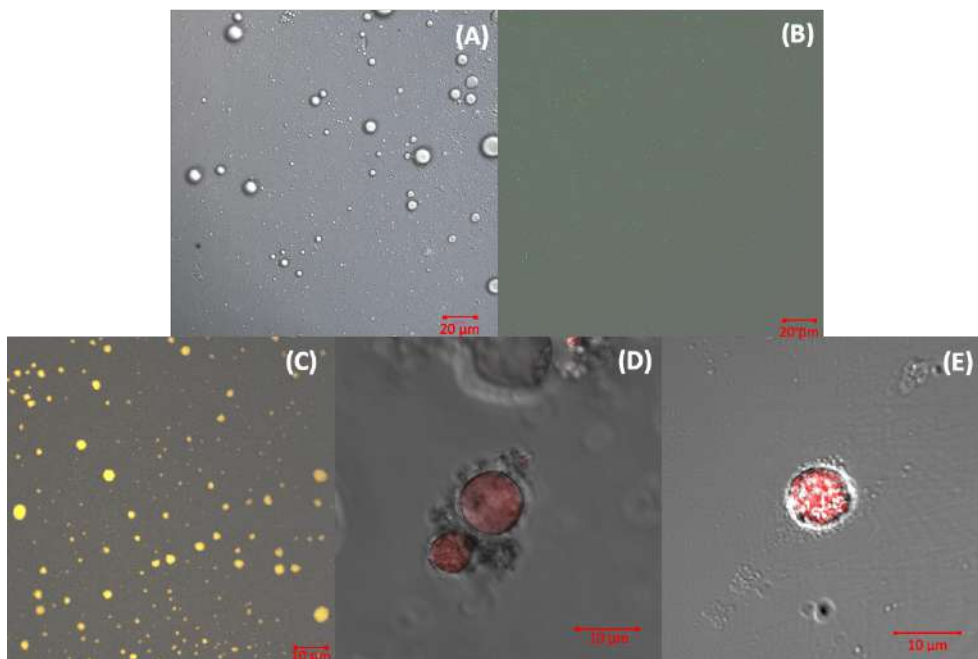


Fig. 4. Confocal microscopy images of different hybrid liposomes: MLs (A), h-MLs containing HPTS, RB, CV, and NF (B-E, respectively).

4. Conclusions

The utility of the coupled use of the MDGC purification and separation system and the continuous flow system for the monitoring of synthesized h-MLs and their sub-products has been demonstrated. In the separation Eppendorf tube, four differentiated zones were obtained, which covered the presence of hybrid magnetoliposomes (h-MLs), hybrid empty liposomes (h-Ls), magnetoliposomes (MLs), and non-encapsulated fluorophores. Additional information about the hybrid nanostructures using confocal microscopy was also achieved.

Ethical approval

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Informed consent

Not applicable.

Credit author statement

Á. Écija-Arenas: Conceptualization, Investigation and Methodology, Data treatment, Writing - original draft, Methodology, Optimization, Formal analysis, Investigation, Writing - review & editing, Visualization. V. Román-Pizarro: Resources, Supervision of data treatment, Optimization and Methodology. J.M. Fernández-Romero: Conceptualization, Investigation and Methodology, Writing-review and editing, Investigation, Resources, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgment

The authors gratefully acknowledge financial support from the Operative Framework Funding FEDER-Andalucía 2014–2020 Program (ref. UCO-1263679). The authors also thank the Central Service for Research

Support (SCAI) of the University of Córdoba for the service provided for MNPs and h-liposome characterization.

References

- [1] A. Gómez-Hens, J.M. Fernández-Romero, Analytical methods for the control of liposomal delivery systems, *TrAC Trends Anal. Chem.* (Reference Ed.) 25 (2006) 167–178, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2005.07.006>.
- [2] P. Sanguansri, M.A. Augustin, Nanoscale materials development – a food industry perspective, *Trends Food Sci. Technol.* 17 (2006) 547–556, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.04.010>.
- [3] S. Emami, S. Azadmard-Damirchi, S.H. Peighambaroust, H. Valizadeh, J. Hesari, Liposomes as carrier vehicles for functional compounds in food sector, *J. Exp. Nanosci.* 11 (2016) 737–759, <https://doi.org/10.1080/17458080.2016.1148273>.
- [4] J.F. Alexander, D. Aguirre-Villarreal, B. Godin, Liposomal encapsulation masks genotoxicity of a chemotherapeutic agent in regulatory toxicology assessments, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 13 (2017) 829–833, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.12.016>.
- [5] A.L. Petersen, A.E. Hansen, A. Gabizon, T.L. Andresen, Liposome imaging agents in personalized medicine, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 1417–1435, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.003>.
- [6] D. Cipolla, H. Wu, I. Gonda, S. Eastman, T. Redelmeier, H.K. Chan, Modifying the release properties of liposomes toward personalized medicine, *J. Pharmacol. Sci.* 103 (2014) 1851–1862, <https://doi.org/10.1002/jps.23969>.

- [7] R.V. Ferreira, T.M.D.M. Martins, A.M. Goes, J.D. Fabris, L.C.D. Cavalcante, L.E. F. Outon, R.Z. Domingues, Thermosensitive gemcitabine-magnetoliposomes for combined hyperthermia and chemotherapy, *Nanotechnology* 27 (2016) 1–8, <https://doi.org/10.1088/0957-4484/27/8/085105>.
- [8] A. Gómez-Hens, J. Manuel Fernández-Romero, The role of liposomes in analytical processes, *TrAC Trends Anal. Chem. (Reference Ed.)* 24 (2005) 9–19, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.07.017>.
- [9] H. Fattahi, S. Laurent, F. Liu, N. Arsalani, L. Vander Elst, R.N. Muller, Magnetoliposomes as multimodal contrast agents for molecular imaging and cancer nanotheragnostics, *Nanomedicine* 6 (2011) 529–544, <https://doi.org/10.2217/nnm.11.14>.
- [10] R. Martínez-González, J. Estelrich, M.A. Busquets, Liposomes loaded with hydrophobic iron oxide nanoparticles: suitable T2 contrast agents for MRI, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016) 1–14, <https://doi.org/10.3390/ijms17081209>.
- [11] M. Namdari, M. Cheraghi, B. Negahdari, A. Eatemadi, H. Daraee, Recent advances in magnetoliposome for heart drug delivery, *Artif. Cells, Nanomed. Biotechnol* 45 (2017) 1051–1057, <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1299159>.
- [12] V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Fluorometric determination of alkaline phosphatase activity in food using magnetoliposomes as on-flow microcontainer devices, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 1819–1825, <https://doi.org/10.1021/jf5004804>.
- [13] L.G. Hermida, M. Sabés-Xamaní, R. Barnadas-Rodríguez, Combined strategies for liposome characterization during in vitro digestion, *J.*

Liposome Res. 19 (2009) 207–219, <https://doi.org/10.1080/08982100902740847>.

- [14] X.J. Han, Y.F. Wei, Y.Y. Wan, L.P. Jiang, J.F. Zhang, H.B. Xin, Development of a novel liposomal nanodelivery system for bioluminescence imaging and targeted drug delivery in ErbB2-overexpressing metastatic ovarian carcinoma, *Int. J. Mol. Med.* 34 (2014) 1225–1232, <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1922>.
- [15] M. Sakamoto, A. Shoji, M. Sugawara, Giant unilamellar vesicles containing Rhodamine 6G as a marker for immunoassay of bovine serum albumin and lipocalin-2, *Anal. Biochem.* 505 (2016) 66–72, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.04.011>.
- [16] V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Automatic determination of coenzyme Q10 in food using cresyl violet encapsulated into magnetoliposomes, *Food Chem.* 221 (2017) 864–870, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.085>.
- [17] V. Román-Pizarro, A. Gómez-Hens, J.M. Fernández-Romero, Applicability of fluorescent hybrid magnetoliposomes for the determination of reactive oxygen compounds in food, *Food Anal. Methods.* 11 (2018) 2376–2383, <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1220-3>.
- [18] A.E. Albers, B.C. Dickinson, E.W. Miller, C.J. Chang, A red-emitting naphthofluorescein-based fluorescent probe for selective detection of hydrogen peroxide in living cells, *Bioorg. Med. Chem. Lett* 18 (2008) 5948–5950, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.08.035>.
- [19] C. Grabielle-Madelmont, S. Lesieur, M. Ollivon, Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography, *J. Biochem.*

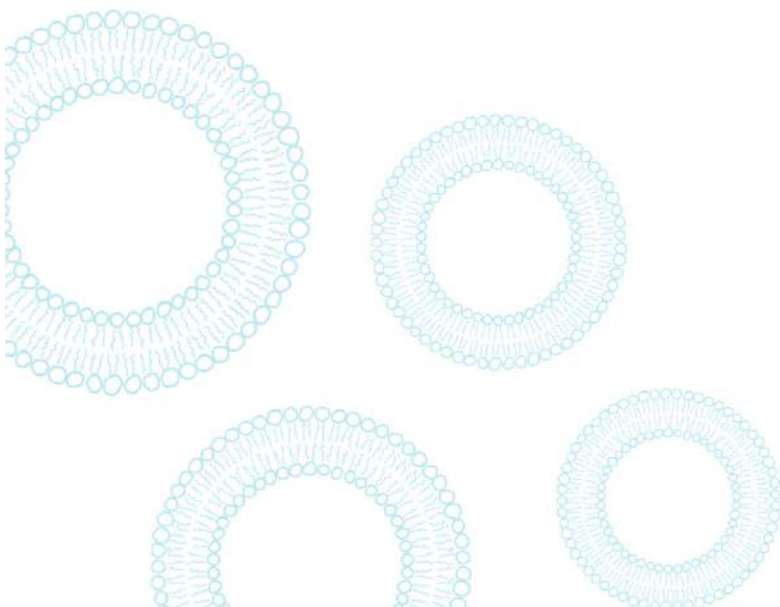
- Biophys. Methods 56 (2003) 189–217, [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(03\)00059-9](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(03)00059-9).
- [20] R. Xu, A. Fitts, X. Li, J. Fernandes, R. Pochampally, J. Mao, Y.M. Liu, Quantification of small extracellular vesicles by size exclusion chromatography with fluorescence detection, *Anal. Chem.* 88 (2016) 10390–10394, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03348>.
- [21] A. Gven, M. Ortiz, M. Constanti, C.K. O'Sullivan, Rapid and efficient method for the size separation of homogeneous fluorescein-encapsulating liposomes, *J. Liposome Res.* 19 (2009) 148–154, <https://doi.org/10.1080/08982100802674419>.
- [22] B.A. Yegin, A. Lamprecht, Lipid nanocapsule size analysis by hydrodynamic chromatography and photon correlation spectroscopy, *Int. J. Pharm.* 320 (2006) 165–170, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.04.014>.
- [23] J.P.F.G. Helsper, R.J.B. Peters, L. Brouwer, S. Weigel, Characterisation and quantification of liposome-type nanoparticles in a beverage matrix using hydrodynamic chromatography and MALDI-TOF mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 1181–1189, <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6530-5>.
- [24] Y. Chen, E.A. Arriaga, Individual electrophoretic mobilities of liposomes and acidic organelles displaying pH gradients across their membranes, *Langmuir* 23 (2007) 5584–5590, <https://doi.org/10.1021/la0633233>.
- [25] U. Franzen, T.T.T.N. Nguyen, C. Vermehren, B. Gammelgaard, J. Østergaard, Characterization of a liposome-based formulation of oxaliplatin using capillary electrophoresis: encapsulation and leakage, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 55 (2011) 16–22, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.12.037>.

- [26] S. Hupfeld, H.H. Moen, D. Ausbacher, H. Haas, M. Brandl, Liposome fractionation and size analysis by asymmetrical flow field-flow fractionation/multi-angle light scattering: influence of ionic strength and osmotic pressure of the carrier liquid, *Chem. Phys. Lipids* 163 (2010) 141–147, <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2009.10.009>.
- [27] V. Vežočanik, K. Rebolj, S. Sitar, K. Ota, M. Tušek-Žnidarič, J. Štrus, K. Sepčič, D. Pahovnik, P. Maček, E. Žagar, Size fractionation and size characterization of nanoemulsions of lipid droplets and large unilamellar lipid vesicles by asymmetric-flow field-flow fractionation/multi-angle light scattering and dynamic light scattering, *J. Chromatogr., A* 1418 (2015) 185–191, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.09.048>.
- [28] E. Goormaghtigh, G.A. Scarborough, Density-based separation of liposomes by glycerol gradient centrifugation, *Anal. Biochem.* 159 (1986) 122–131, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90316-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90316-7).
- [29] B. Xiong, J. Cheng, Y. Qiao, R. Zhou, Y. He, E.S. Yeung, Separation of nanorods by density gradient centrifugation, *J. Chromatogr., A* 1218 (2011) 3823–3829, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.038>.
- [30] V. Sánchez-López, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Evaluation of liposome populations using a sucrose density gradient centrifugation approach coupled to a continuous flow system, *Anal. Chim. Acta* 645 (2009) 79–85, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.04.045>.
- [31] M. Mortimer, E.J. Petersen, B.A. Buchholz, E. Orias, P.A. Holden, Bioaccumulation of multiwall carbon nanotubes in *Tetrahymena thermophila* by direct feeding or trophic transfer, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 8876–8885, <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01916>.
- [32] Y. Chang, P.H. Hsieh, C.C.K. Chao, The efficiency of Percoll and Ficoll density gradient media in the isolation of marrow derived human

- mesenchymal stem cells with osteogenic potential, *Chang Gung Med. J.* 32 (2009) 264–275.
- [33] Á. Écija-Arenas, V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Separation and purification of hydrophobic magnetite-gold hybrid nanoparticles by multiphase density gradient centrifugation, *Microchim. Acta* 183 (2016) 2005–2012, <https://doi.org/10.1007/s00604-016-1838-z>.
- [34] J. Han, K. Burgess, Fluorescent indicators for intracellular pH, *Chem. Rev.* 110 (2010) 2709–2728, <https://doi.org/10.1021/cr900249z>.
- [35] K. Rurack, M. Spieles, Fluorescence quantum yields of a series of red and near-infrared dyes emitting at 600-1000 nm, *Anal. Chem.* 83 (2011) 1232–1242, <https://doi.org/10.1021/ac101329h>.
- [36] A.M. Brouwer, Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* 83 (2011) 2213–2228, <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-10-09-31>.
- [37] L.G. Lee, G.M. Berry, C. Chen, Vita blue: a new 633-nm excitable fluorescent dye for cell analysis, *Cytometry* 10 (1989) 151–164, <https://doi.org/10.1002/cyto.990100206>.
- [38] M. Taniguchi, J.S. Lindsey, Database of absorption and fluorescence spectra of >300 common compounds for use in PhotochemCAD, *Photochem. Photobiol.* 94 (2018) 290–327, <https://doi.org/10.1111/php.12860>.

CAPÍTULO 1.3

Separation and
characterization of
liposomes using
assymmetric flow field-flow
fractionation with online
multi-angle light
scattering detection





Separation and characterization of liposomes using asymmetric flow field-flow fractionation with online multi-angle light scattering detection



Ángela Écija-Arenas, Vanesa Román-Pizarro, Juan Manuel Fernández-Romero

Departamento de Química Analítica, Instituto Universitario de Investigación en Química Fina y Nanoquímica (IUNAN), Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Anexo "Marie Curie", E-14071 Córdoba, España

Abstract

Liposomes, mainly formed by phospholipids and cholesterol that entrapped different compounds, were separated and characterized using asymmetric flow field-flow fractionation (AF4) coupled with a multi-angle light scattering detector (MALS). AF4 allows the separation of liposomes according to their hydro- dynamic size, and the particle size can be estimated directly by their elution time. Besides, different synthesized liposome suspensions of liposomes with different species encapsulated in different places in liposomes were prepared with analytical purposes to be studied. These liposomes were: empty liposomes (e-Ls), magnetoliposomes (MLs) with $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs-C12SH}$ inside the lipid bilayer, and long-wavelength fluorophores encapsulated into the aqueous cavity of liposomes (Ls-LWF). The optimization process of the variables that affect the fractionation has been established. The separation effectiveness has been compared with the results achieved with a photon-correlation spectroscopy analyzer based on dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM), used in self-assembly structures

characterization. In all cases, three different classes of liposomes have been obtained; two are commonly appeared in all studied samples, while only a third class is characteristic for each of the liposomes. This mean that the proposed methodology could be used for identifying liposomes according to the encapsulated material.

Keywords: Liposomes · Asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) · Online detection · Multi-angle light scattering detector (MALS) · Particle size distribution · DLS and TEM comparison

1. Introduction

Liposomes are self-assembled structures and are presented in nature as microscopic vesicles formed from a dispersion of phospholipids and cholesterol in an aqueous solution, easily synthesized in the laboratory. The amphiphilic character of phospho- lipids, with their typical double structure of the polar head and hydrophobic tail means that, when suspended in an aqueous solution, they spontaneously associate, forming aqueous vesicles sur- rounded by a double lipid layer [1]. One of the species encapsulated in this research was long-wavelength fluorophores (LWFs). The encapsulation of these compounds helps amplify their fluorescence intensity or study non-fluorescent reactions when some compound involved in the reaction interferes with the LWF [2–4]. The LWF chosen to be encapsulated, cresyl violet, is a water-soluble compound, so this compound should be found in the aqueous cavity [3,5]. The encapsulation of hydrophobic magnetic nanoparticles (Fe_3O_4 @AuNPs-C12SH), obtaining magnetoliposomes (MLs), was also chosen. This type of encapsulation is useful to obtain drug delivery systems in cancer treatment and, in this way, bring drugs to the specific site with an external magnetic field or like imaging agents in diagnosis [6,7]. These nanoparticles could be anchored to the lipid bilayer due to their hydrophobicity provided by the 1-dodecylthiol [3,4].

The knowledge of the morphologic and structural liposome features, such as size, polydispersity, and homogeneity distribution, is essential. For this purpose, different microscopic or dispersive techniques have been used. Thus, for example, the superficial and morphological information acquired through microscopic techniques, such as transmission (TEM), scanning (SEM) or atomic force (AFM) microscopy, implied sample treatment influence, difficulty in recognition of structures manually, lack of representativeness, and in general, they are expensive techniques. For their part, the most recent dispersive techniques, such as dynamic light scattering (DLS) and nanoparticle tracking analysis (NTA), offer structural information more quickly and with minor sample preparation. However, in suspensions with macromolecular structures, they need to be associated with separation techniques, such as size exclusion chromatography (SEC), which facilitates size discrimination of macromolecules. On the other hand, these dispersion techniques require information from primary data (viscosity, refractive indices, molar absorptivity) that are sometimes difficult to obtain. The main problem with the separation of liposomes using capillary electrophoresis (CE) is the light scattering of large particles using UV detection. Interactions between liposomes and the fused silica of the wall could significantly affect particle detection. Furthermore, some additives (mainly surfactants) could be included in the electrolyte solution and interact with lipid vesicles, enhancing the fusion of liposomes and the formation of macromolecular aggregates. The structural characterization of liposomes has also been described using the nanoelectrospray gas-phase electrophoretic mobility molecular analysis (nES GEMMA). However, the sample treatment requires volatilized samples conducted to mechanical stress, contributing to aggregates formation [8–16].

Field flow fractionation techniques can be presented as an alternative to solve these problems, in particular, using the asymmetric mode. In 1987 Giddings and Wahlung [17] presented the asymmetric flow field flow

fractionation technique (AF4), which provides the separation of particles and macromolecules according to their diffusion coefficient, giving information about size distribution or molar mass. Coupling a light scattering detector, a quick connection in one instrument of fractionation and detection steps allows obtaining the size distribution quickly and easily. In this research, a multi-angle light scattering (MALS) detector has been used.

AF4-MALS has been used until now to know the size of different types of nanoparticles, such as metal oxides, silica, or polymeric nanoparticles [18–21]. It has also been used to separate several macromolecules and structures, like proteins, viruses, polysaccharides, and cells [22–24]. Such compounds have led to the analysis of liposomes to separate populations obtained in the same synthesis and know their size [25–27]. AF4-MALS has also been used to optimize liposomes synthesis, which provides crucial information about the optimum phospholipids/cholesterol ratios involved in the synthesis [28]. However, these methods focused on the study of only a type of liposomes and not all types of liposomes can be studied with the methods described to date. The separation variables optimization includes several parameters: cross-flow conditions, focus rate and time, sample load, and carrier conditions. Regarding the last variable, the carrier should stabilize structures avoiding their agglomeration or sedimentation and should not interfere with both analytes and the membrane. For that, the composition, pH, and ionic strength of the buffer used must be studied [26,29–31].

This work aimed to apply AF4-MALS for the separation of populations and the size characterization of different liposomes to obtain different populations in each synthesis and know their sizes. Three types of liposomes were studied: the first type consisting of empty liposomes (e-Ls); second ones formed by the MLs, which entrapped Fe_3O_4 @AuNPs-C12SH the hydrophobic phospholipid bilayer; and the third type were liposomes with encapsulated cresyl violet as a model of LWF in the aqueous cavity (Ls-CV). Different

characteristics of the AF4-MALS separation method will be studied to obtain the best population analysis, paying particular attention to the pH and ionic strength of the carrier used and variables involved in the focus step and the cross-flow mode. Additionally, the achieved results were compared with those obtained using DLS and TEM.

2. Materials and methods

2.1. Materials

All chemicals used were of analytical grade. 1,2- Diacylsn-glycerol-3-phosphatidylcholine (DSPC), 3-sn-phosphatidylethanolamine (DOPE), (type II-S from sheep brain), cholesterol (CH), cresyl violet acetate (CV), N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES), tetrachloroauric acid (HAuCl₄) trihydrate, 1-dodecylthiol (C12SH), methanol and sodium chloride were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany, www.sigmaaldrich.com). Iron (III) chloride and chloroform were purchased from Panreac (Montplet and Esteban SA, Barcelona-Madrid, www.panreac.es). Iron (II) chloride, disodium hydrogen phosphate anhydrous, hydrochloric acid, and sodium hydroxide were purchased from Merck (Darmstadt, Germany, www.merckgroup.com). All solutions were prepared using deionized water purified with a Milli-Q system (Millipore S.A.S., Molsheim, France, www.millipore.com) and further filtrated with 0.1 μm nylon membrane filters (Millipore, Bedford, USA, www.merckmillipore.com).

2.2. Preparation of liposomes

As described earlier, three different types of liposomes were synthesized using the rapid solvent evaporation (RSE) method [3–5]: e-LPs, MLs, and Ls-CV. Before preparing the MLs type, the magnetic nanoparticles

(Fe₃O₄@AuNPs-C12SH) were synthesized using the coprecipitation method with a further coating with AuNPs and C12SH [32]. Empty and filled liposomes were synthesized following a similar method, which incorporates an additional step to entrap the material according to their respective protocols. Briefly, 100 μ L of a lipid mixture containing DSPC, DOPE, and CH (75:12.5:12.5) was diluted to 1.0 mL with a chloroform/methanol (880:120) mixture and was put into a 50 mL round-bottom flask. Then, HEPES buffer solution 10 mM, pH 8, was carefully added along the flask wall to reach a synthesis volume of 10 mL. The organic solvent was removed in a rotary evaporator at 40 °C and 300 rpm under vacuum pressure. After 15 min, an opalescent fluid was obtained, which contained a wide variety of liposomes. The same procedure was used to synthesize the liposomes containing the long- wavelength fluorophore cresyl violet but included 200 μ L cresyl violet solution (5 mM) previously to adding the HEPES solution. In the MLs synthesis case, the same procedure required adding 2 mL of 30 mg/mL Fe₃O₄@AuNPs-C12SH suspension before adding the HEPES buffer solution. All liposome suspensions were also stabilized by reducing their size and polydispersity by a sonication step developed in an ultrasound bath for 10 min, stopping 10 s for each 2 min until ended. The three types of synthesized liposome sus- pensions remain stable for at least 30 days stored refrigerated at 4 °C under light protection. This stability was demonstrated by observing the liposomes with an optical microscope.

2.3. Asymmetric flow-field flow fractionation (AF4)

The liposomes were analyzed at 25 °C on an AF4 system (AF2000, Postnova Analytics GmbH, Landsberg, Germany, www.postnova.com) integrated by a channel thermostat (PN4020) coupled online with a 21-angle multi-angle light scattering detector (MALS, PN3621). The laser used had an incident light ($\lambda = 532$ nm) with a 50-mW power, working at 80 %. The separation channel used was 29 cm in length and was equipped with a

trapezoidal-shaped spacer (thickness 350 μm , length 280 mm), and membranes composed of regenerated cellulose (molecular weight cut-off 10 kDa) were used as accumulation wall. Two separate pumps provided the flows, and a separate piston pump obtained the cross-flow. Data were collected in intervals of 2 s. The carrier was a mixture solution containing HEPES buffer 10 mM (pH 8) and sodium chloride 50 mM, filtered through a membrane with a pore size of 0.1 μm and degassed with a vacuum degasser. The separation method was developed using a constant detector flow-rate of 0.5 mL/min. A volume of 21 μL of diluted (1:10 v/v) liposome suspension was manually injected with a flow-rate of 1 mL/min for 2 min in the focus mode (focus flow-rate of 2 mL/min). After finishing the injection, the sample was focused for 4 min. During this second focus step, the injection valve was opened again for 1 min to rinse the injection line. Samples were then eluted at a flow-rate of 1 mL/min starting with the cross-flow gradient profile programmed with an initial constant cross flow-rate of 2.5 mL/min within 5 min, followed by two cross-flow gradient decreasing steps, the first as a linear gradient from 2.5 to 1 mL/min within 5 min and the second cross-flow decreasing rate with an exponent of 0.1 from 1 to 0 mL/min within 60 min. After the elution step, the channel was flushed for 5 min with a tip flow-rate of 0.1 mL/min, and the cross-flow turned off to minimize the possible interferences between consecutive samples. All experiments were carried out in triplicate by 81 minutes each-ones. The acquisition and data processes were carried out by the AF2000 control software, version 2.0.7.0. (Postnova Analytics). Radius was calculated using the data from the MALS detector, applying a hollow sphere model. The refractive index of the material was set as 1.45, and the medium refractive index, 1.33. The MALS primary sizes and size distribution information correspond with the root mean square (R_{RMS}) radius, determined from the peak area, and was equal to the geometric radius (R_{G}) for spherical shape-like liposomes.

2.4. Particle size distribution by batch dynamic light scattering (DLS)

The hydrodynamic particle size distribution of the liposomes and their Z-potential were measured using a photon-correlation spectroscopy (PCS) analyzer, Zetasizer-Nano ZSP ZEN5600 (Malvern Instruments, Spring Lane South, Worcestershire, UK, www.malvernpanalytical.com). The sample was appropriately diluted to 1:10 with filtered (pore size 0.1 μm) HEPES solution (10 mM pH 8) at 25 °C and sonicated. Sample viscosity was assumed to be the same as pure water (0.8873 cP at 25 °C), and the refractive index of the medium and the analyzed material was also assumed as 1.33 and 1.45, respectively. The measurements were carried out using a 10-mW laser He-Ne with an incident light ($\lambda = 632.8$ nm) detected at a scattering angle of 173°. All measurements were performed three times for 10 minutes each. The PCS analyzer provides hydrodynamic radii (R_H), the polydispersity indices (PDI), and Z-potential from the liposome suspension analyzed.

2.5. Transmission electron microscopy (TEM)

TEM images were obtained using an ultra-high resolution JEOL JEM 2010 microscope with a 0.194 nm point-to-point resolution, which operates between 80 to 200 kV, and images were recorded with an ORIUS camera (Gatan Inc., Washington, DC, USA). It is well known that the direct observation of liposomes by TEM is not possible due to the rapid liposome lysis caused by the solvent evaporation during the sample preparation stage. For the study of synthesized liposomes using TEM, the sample preparation was based on a conventional method currently used in cell biology to include biological cells and tissues into epoxy resin [33]. This method avoids using other more complex procedures based on liposome negative staining-fixation [34] or using the cryo-TEM technique [35], which offers similar results. The procedure involves a progressive substitution of buffer solution in which the epoxy-resin

media infiltrate the liposomes. Briefly, the steps were: fixation in buffered glutaraldehyde, post-fixation in osmium tetroxide, dehydration in ethanol, and embedment into an epoxy-resin. This block was sectioned and examined in the TEM microscope, putting each section on a copper grid. More than 100 liposomes were examined to obtain the average size using each type of liposome suspensions.

3. Results and discussions

3.1. Optimization of liposome synthesis

All liposome suspensions were prepared by the rapid solvent evaporation (RSE) method, using a previously described method [5,36,37] with slight modifications according to the type of liposome formed. The synthesis is followed by a stabilization process based on an ultrasonic treatment to ensure equal populations in all experiments [37]. The liposomes in all instances were formed using a phospholipid mixture composed of DSPC, DOPE, and CH (75:12.5:12.5), which was diluted to 1 mL with a chloroform/methanol (880:120) mixture. This solution was mixed with different ingredients depending on the type of liposome synthesized. **Table 1** summarized the optimum values of the synthesis of different liposomes, concordant with analytical applications. The synthesis volume was studied, and it was found that under 10 mL did not cover the flask surface, and liposomes were not formed. For this reason, once ingredients have been introduced, a buffer solution was included to reach this 10 mL volume. In this case, the same carrier solution was used to form liposomes. After the liposome synthesis with the RSE method, the homogenization process supposed a sonication the mixture for 10 minutes, stopping 10 s each 2 min. This treatment ensures the resizing of multilamellar vesicles to obtain more homogeneous low sizes. The liposome suspension

stability increased when the suspension was refrigerated at 4 °C under light protection. The encapsulation material was distributed in the aqueous compartment of the bilayer according to their hydrophobic, hydrophilic or amphiphilic nature. The hydrophobic character of the Fe₃O₄@AuNPs-C12SH facilitated their placement in the lipid bi-layer, as shown in previous studies [3,4]. However, the water-soluble cresyl violet was located in the aqueous cavity, as shown with fluorescence and confocal microscopy in previous works [3,5].

Table 1. Optimization of variables affecting the synthesis of liposomes.

Variable	Range studied	Optimum value
Synthesis volume, mL	2 – 20	10
Evaporation time, min	5 – 30	15
Fe ₃ O ₄ @AuNPs-C12SH, mg/mL	1 – 10	6
CV, mM	0.01 – 1	0.1

3.2. Optimization of the variables involved in the AF4 procedure

The studies were carried out using the univariate method selecting the Ls-CV suspension as a model, and the final selected values of these variables were applied to the study of the other liposome samples. **Table 2** shows the range of whitening they were considered, and the optimal value found. In all instances, the MALS online detector flow-rate used was 0.5 mL/min.

3.2.1. Sample injection

The sample (or carrier liquid for rinsing) is injected using the focus mode via a separate line and flows when the injection is necessary. Three sample volumes (21, 50, and 100 µL) were injected, manually and automatically, under a 0,5 mL/min injection-rate for 2 min, focusing the sample for 4 min with a 1 mL/min focus flow and two cross-flow conditions (Experiences no. 2 and 3 from

Table 3). The best separation was obtained with a volume of 21 μL of 1:10 (v/v) diluted liposome suspension manually injected.

Table 2. Variables involved in the AF4 procedure for the separation of different types of liposomes.

AF4 step	Variable	Range studied	Selected value
Injection step	Injection mode	Manual, automatic	Manual
	Injection volume, μL	1 – 100	21
	Injection flow-rate, mL/min	0.2 – 2	1
	Injection time, min	1 – 5	2
Focus step	Focus flow-rate, mL/min	0.8 – 3	2
	Focusing time, min	1 – 15	4
Elution step	Isocratic cross-flow		
	Flow-rate, mL/min	0.1 – 3.5	2.5
	Time, min	1 – 50	5
	Linear decreasing cross-flow		
	Flow-rate, mL/min	0.1 – 3	2.5 to 1
	Time, min	1 – 100	5
	Exponential decreasing cross-flow		
	Flow-rate, mL/min	0.15 – 1.5	1 to 0
Power	0.05 – 1.4	0.1	
Time, min	1 – 100	60	

3.2.2. Focus conditions

In AF4, a small signal (void peak) is usually visible just after switching from focus to elution mode. This void peak is formed because a small portion of the sample leaves the channel without any retention and pass directly through it. To avoid this effect is necessary to optimize the time in which the sample is focused. The focus time influence was tested between 1 to 15 min, obtaining that up to 4 min the void peak was reduced. A similar effect occurs when increasing the focus flow-rate. This variable was tested between 0.8 and 3 mL/min, maintaining at 2 mL/min throughout the studies. The size resolution increase

was also tested using polystyrene standards of 60, 125, and 350 nm without significant mean diameter differences.

Table 3. Optimization of the cross-flow gradient stages used in AF4 fractionation.

Experience no.	Variable	Gradient mode	Flow-rate, mL/min	Time, min
1	Cross-flow mode	Isocratic	1	70
2		Linear	1 – 0	70
3		Exponential ^a	1 – 0	70
4		Exponential ^b	1 – 0	70
5	Cross flow-rate	Linear/Exponential ^c	1 – 0.5/0.5 – 0	5/60
6		Linear/Exponential ^c	1.5 – 0.5/0.5 – 0	5/60
7		Linear/Exponential ^c	2 – 0.5/0.5 – 0	5/60
8		Linear/Exponential ^c	2.5 – 1/1 – 0	5/60
9		Linear/Exponential ^c	3 – 1/1 – 0	5/60

a, b and c, denotes the numerical values assigned to the exponent of the gradient mode (a = 0.4, b = 1.4 and c = 0.1, respectively).

3.2.5. Cross-flow gradient

Different cross-flow conditions were listed to achieve an appropriate cross-flow effect that directly influences the efficient liposome fractionation (**Table 3**). The first study was the cross-flow mode selection (Experiences no. 1 to 4). Previous researches demonstrate the scarce utility of the use of isocratic cross-flow [26]. However, isocratic and linear/exponential gradients modes were assayed. Best separation was achieved with an exponential gradient with an exponent lower than one (Experience no. 3). The inclusion of a first step has been demonstrated. Mixed gradient, which combines in two steps linear and exponential gradient modes were also assayed (Experience no. 5 to 9). The best results were found by using a first linear step, followed by a second exponential. The initial cross flow-rate was tested between 1 to 3.5 mL/min, and the separation obtained is shown in **Fig. 1**. Best separation was obtained, beginning with high cross flow-rates to ensure the separation of liposomes from the void

peak. However, the sample appeared when cross-flow was turned off using too low or high gradients without adequate size resolution. Smaller cross-flow gradients with differences between linear and exponential decreasing stages resulted in a somewhat better size resolution. However, the differences in the elution profiles of the liposomes applying cross-flow gradients with minor flow-rate require long elution time to obtain liposomes separation. For this reason, 70 minutes for the total elution time were selected as enough time to get adequate separations in all instances.

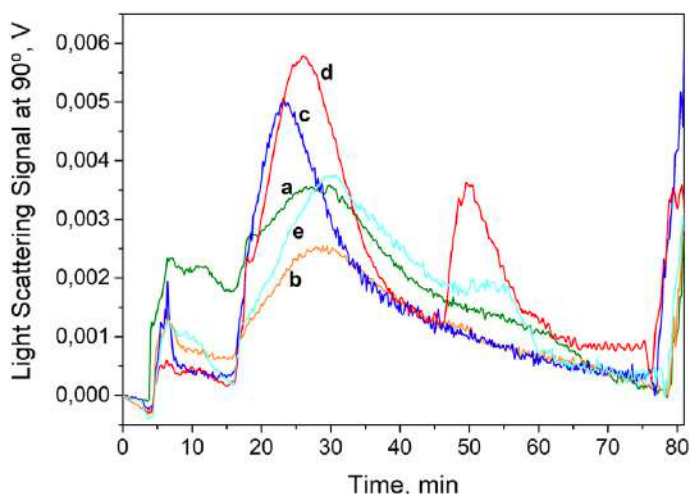


Fig. 1. Influence of the linear cross flow-rates differences in the liposomes AF4-MALS analysis (using Ls-CV). The fractogram shows the light-scattering signal at 90° of the entrapped liposomes versus the elution time. (Each line from a to e shows the cross flow-rate 1, 1.5, 2, 2.5 and 3 mL/min applied). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.).

The best cross-flow gradient profile was programmed, starting with an initial constant cross flow-rate of 2.5 mL/min within 5 min, followed by two cross-flow decreasing stages, as shown in Experience no. 8. The first step consisted of a decreasing linear gradient from 2.5 to 1 mL/min within 5 min, followed by a second exponential decreasing gradient step exponent 0.1 from 1 to 0 mL/min within 60 min. After the elution step, the channel was flushed for 5

min with a tip flow-rate of 0.1 mL/min, turning off the cross-flow to minimize contamination between consecutive injected samples.

3.2.4. Influence of the carrier composition

There is not enough literature about the composition and concentration of the component that integrates the carrier flow solution to separate liposomes. Researches compares the effect of using phosphate buffer solution (PBS) and Tris-HCl solution applied to liposomes fractionation [29]. In another study, the carrier solvent concentration and the salt presence were discussed [30]. Based on this information, two different buffer solutions and saline concentration were studied in this method. **Table 4** shows the alternatives assayed. Liposomes were synthesized with the same buffer solution used as carrier flow.

Table 4. Optimization of the carrier solution for the AF4 fractionation.

Carrier solution	Variable	Range studied	Selected value
PBS	Concentration, mM	5 – 20	10
	pH	6.5 – 8	7.4
HEPES	Concentration, mM	5 – 20	10
	pH	7 – 9	8
HEPES + NaCl	Salt concentration, mM	5 – 100	50

Fig. 2 shows the light-scattering signal (LS) at 90° of Ls-CV using different carrier solutions. As can be seen, not a good LS signal was obtained for each type of liposome suspension using PBS. However, not all types of the studied liposome suspension were separated using HEPES as the carrier, and they appeared when the cross-flow was turned off. The addition of sodium chloride as ion strength to the carrier solution avoids the whole retention of liposomes in the membrane. Low electrolyte concentration may be preferable or even required to stabilize compounds electrostatically for measurements. However, high electrolyte concentration may induce adhesion on the

accumulation wall resulting in sample loss. The addition of 50 mM NaCl was enough to obtain the best separation.

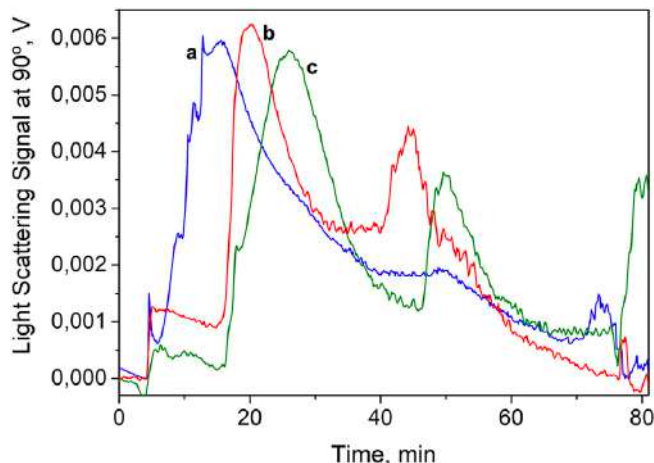


Fig. 2. Influence of the carrier solution components: a) PBS (blue line), b) HEPES (green line), c) HEPES+NaCl (red line), in the liposome AF4-MALS analysis (using Ls-CV). The fractogram shows the light-scattering signal at 90° of the entrapped liposomes versus the elution time. (Each color line shows the used carrier).

3.3. Comparison of the AF4-MALS, DLS, and TEM results

The results obtained using AF4-MALS for the separation of the three types of liposomes (e-Ls, MLs, and Ls-CV) were evaluated and compared to the results obtained with those techniques that offer size distribution information, such as DLS and TEM, that were applied to the same samples using an offline measurement mode. The consideration of liposomes as spherical structures provides similar tools to compare size distribution using R_H achieved in DLS, average liposome radius obtained in TEM, and the R_G obtained in AF4-MALS. Different LS signals at 90° were obtained for different liposome types regarding the whole elution time. **Fig. 3** provides the separation profiles using AF4-MALS for each liposome suspension and each population size found in each separation. Three signals were achieved, as can be seen in **Fig. 3a**, corresponding to e-Ls: the first one at an elution time between 25 – 35 min that corresponded to an R_G

of 60 nm; a second one appeared at an elution time between 45 – 65 min, corresponding to 250 nm; and a third little signal from 65 – 70 min of 300 – 350 nm. **Fig. 3b** depicts the fractogram of MLs suspension in which only a single LS signal at 90° appeared between an elution time of 20 – 30 min corresponding to a population of 70 nm. However, two viable populations with an R_G ranged between 180 – 250 nm appeared without LS signal. Finally, **Fig. 3c**, which corresponds with Ls-CV, exhibits two signals from 20 – 30 min and 30 – 60 min, which corresponds to filled-vesicles with R_G of 50 and 250 nm. Observing the size distribution, another liposome fraction with an R_G of 550 nm also appeared between an elution time of 65 – 75 min, but the LS signal can hardly be seen.

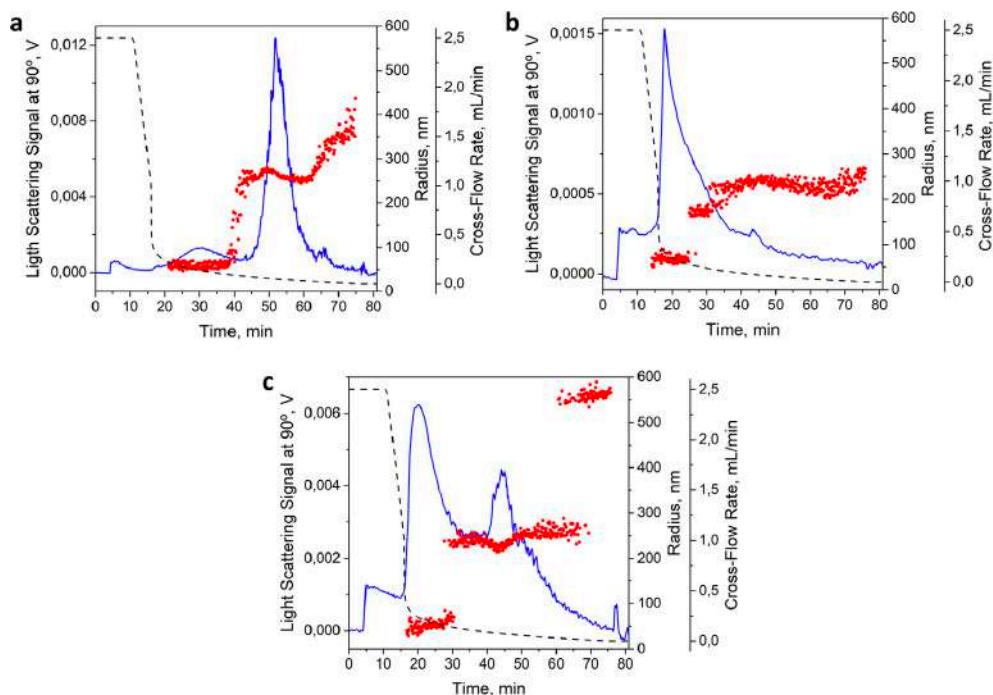


Fig. 3. Separation by AF4-MALS of the three types of liposomes synthesized: (a) e-Ls, (b) MLs, and (c) Ls-CV. Fractogram shows the light-scattering signal monitoring at 90° using MALS detector (blue solid line), the size distribution expressed as the geometric radius (R_G) (red dotted plot), and cross-flow used for the AF4 separation (black dashed line). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.).

The population distribution of these results can be observed in **Fig. 4**. All three types of liposomes have two general populations, the one with R_G of 60 nm and the second with 250 nm. These populations correspond to small (SUV) and large unilamellar vesicles (LUV), respectively. Another specific population was observed for each type of liposome: 350 nm for e-Ls, 150 nm for MLs, and 550 nm for Ls-CV. Results obtained with the AF4-MALS technique show significant differences between the sizes of the different liposomes studied, showing that depending on the species encapsulated, the liposome will have a different size. The usefulness of the described method to study liposome population sizes with different encapsulated species is also demonstrated.

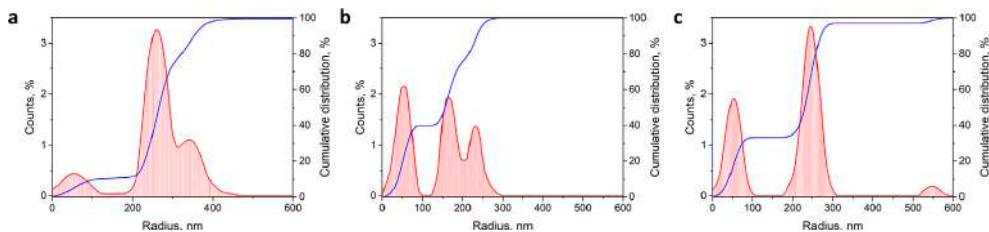


Fig. 4. Differential and cumulative size distribution of geometric radius (R_G) expressed as intensity signal (%) using MALS detector obtained for: (a) e-Ls, (b) MLs, and (c) Ls-CV.

Comparing these results with those obtained in DLS, similar population distributions to AF4-MALS were observed (**Fig. 5**). Three populations of 50, 170, and 480 nm were achieved with e-Ls (**Fig. 5a**). For MLs (**Fig. 5b**), only two populations of 60 and 250 nm were achieved. The one with 180 nm was not observed in DLS due to a lack of resolution compared with AF4-MALS, and it is not possible to discern between populations of a similar radius. Regarding Ls-CV, three populations were observed, with R_H of 60, 240, and 770 nm. The sizes founded for each liposome type indicate a high polydispersity due to different populations with very different sizes. These polydispersity values were obtained with DLS measurements, being 0.688 for e-Ls, 0.559 for MLs, and 0.719 for Ls-CV.

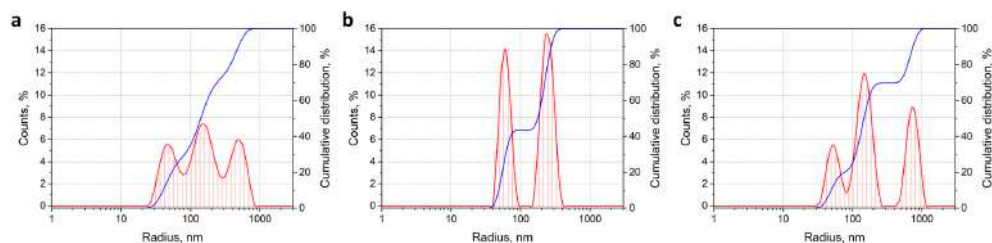


Fig. 5. Differential and cumulative size distribution of hydrodynamic radius (R_H) expressed as a percentage of intensity for the liposome populations. (a) e-Ls, (b) MLs, and (c) Ls-CV measured by DLS.

The Z-potential of each type of liposomes measured with the PCS analyzer was -58.7 mV for e-Ls, -62.2 mV for MLs, and -39.7 mV for Ls-CV. It should be noticed that structures have more stability than the Z potential absent greater in absolute value [38]. Thus, more stable liposomes have less radius, and less stable ones tend to form aggregates to compensate for the charge difference and increase their radius. MLs have magnetic NPs inside, which are negative compounds, so they provide a more negative charge to the liposome and more stability, resulting in smaller liposomes. However, Ls-CV has cresyl violet, a positive colorant, binds to phospholipids, Z potential was closer to zero, and liposome stability was lower, forcing aggregate formation. Thus, this proves radii obtained with AF4-MALS and DLS techniques.

The AF4-MALS results were also compared with those achieved using TEM. The liposome samples were prepared by inclusion in an epoxy-resin [33]. **Fig. 6** depicts three TEM images of the samples jointly with their observed size distribution. The values achieved using TEM confirms a significantly diverse liposome size, corresponding to different populations. **Fig. 6(a–c)** shows the TEM images of e-Ls, MLs, and Ls-CV, and **Fig. 6(d–f)** the calculate differential and cumulative particle size distribution (%) of (d) e-Ls, (e) MLs, and (f) Ls-CV. For e-Ls (**Fig. 6a**), there were three populations with R_G of 50, 250, and 350 nm. For MLs (**Fig. 6b**), another three populations were observed with R_G of 50, 150, and 250 nm. Ls-CV (**Fig. 6c**) had another three populations

with R_C of 100, 250, and 600 nm. The size distribution obtained with the AF4-MALS analysis is similar and with more extensive information than those obtained with the DLS and TEM techniques. While a complete size distribution with extensive information is obtained with AF4-MALS, no information is obtained on the size of all populations with DLS. Accurate information has been obtained with TEM, but fewer populations can be studied, and this study must be done manually. These results demonstrated the usefulness of the described method above others.

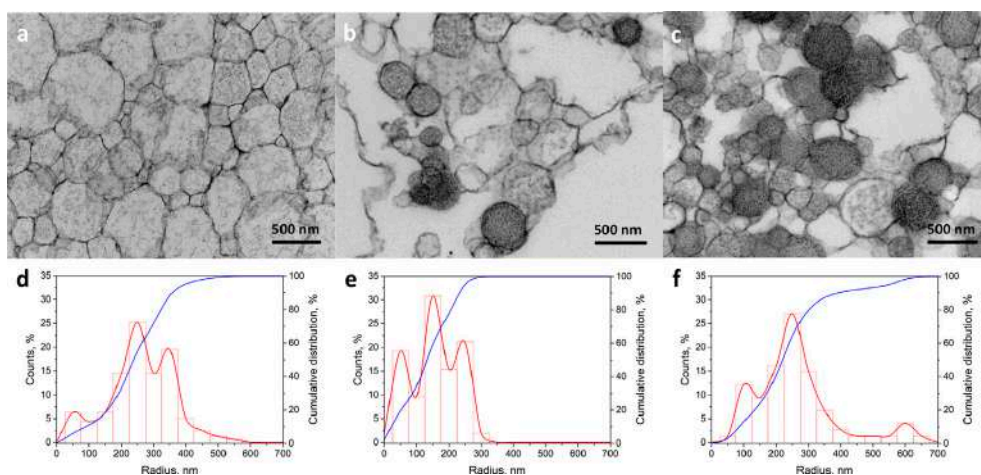


Fig. 6. TEM images and particle size distributions of liposome populations. TEM images of (a) e-Ls, (b) MLs, and (c) Ls-CV. Calculated differential and cumulative particle size distribution (%) of (d) e-Ls, (e) MLs, and (f) Ls-CV.

4. Conclusions

In this work, a method for the separation and characterization of different liposome populations has been developed using the AF4 technique coupled with MALS detection. It has been applied to three types of liposomes, with different species encapsulated found in different areas of the liposome: empty liposomes (e-Ls), magnetoliposomes (MLs) with Fe_3O_4 @AuNPs-C12SH inside the lipid bilayer, and liposomes containing the long wavelength fluorophore cresyl violet (Ls-CV) inside the aqueous cavity.

Three populations have been achieved when the separation of each type of liposome occurs, two populations in common, and one specific for each type. This capability could be used in futures liposome mixtures to stablish differences in size according to different material encapsulated. The results achieved using AF4-MALS have been compared with those obtained using other techniques applied in size evaluation, such as DLS and TEM. In all cases, the effectiveness and efficiency of the separation method have been verified.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

CRedit authorship contribution statement

Ángela Écija-Arenas: Conceptualization, Data curation, Writing - original draft, Methodology, Supervision, Formal analysis, Investigation, Writing - review & editing, Visualization. **Vanesa Román-Pizarro:** Resources, Supervision, Methodology. **Juan Manuel Fernández-Romero:** Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing, Investigation, Resources, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Acknowledgment

The authors thank the Central Service for Research Support (SCAI) of the University of Córdoba for the service provided for Fe₃O₄@AuNPs-C12SH and MLs characterization.

Funding

This study is financially supported by the Operative Framework Funding FEDER-Andalucía 2014-2020 Program (ref. UCO-1263679).

References

- [1] A. Gómez-Hens, J.M. Fernández-Romero, Analytical methods for the control of liposomal delivery systems, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 167–178, doi: 10.1016/j.trac.2005.07.006.
- [2] Y. Friedman-Levi, L. Larush, M. Diana, F. Marchegiani, J. Marescaux, N. Goder, G. Lahat, J. Klausner, S. Eyal, S. Magdassi, E. Nizri, Optimization of liposomal indocyanine green for imaging of the urinary pathways and a proof of concept in a pig model, *Surg. Endosc.* 32 (2018) 963–970, doi: 10.1007/s00464-017-5773-9.
- [3] V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Automatic determination of coenzyme Q10 in food using cresyl violet encapsulated into magnetoliposomes, *Food Chem.* 221 (2017) 864–870, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.11.085.
- [4] V. Román-Pizarro, A. Gómez-Hens, J.M. Fernández-Romero, Applicability of fluorescent hybrid magnetoliposomes for the determination of reactive oxygen compounds in food, *Food Anal. Methods* 11 (2018) 2376–2383, doi: 10.1007/s12161-018-1220-3.
- [5] Á. Écija-Arenas, V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero, Luminescence continuous flow system for monitoring the efficiency of hybrid liposomes separation using multiphase density gradient centrifugation, *Talanta* (2020), doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.135577.

- [6] R.V. Ferreira, T.M.D.M. Martins, A.M. Goes, J.D. Fabris, L.C.D. Cavalcante, L.E.F. Outon, R.Z. Domingues, Thermosensitive gemcitabine-magnetoliposomes for combined hyperthermia and chemotherapy, *Nanotechnology* 27 (2016) 1–8, doi: 10.1088/0957-4484/27/8/085105.
- [7] A.L. Petersen, A .E. Hansen, A . Gabizon, T.L. Andresen, Liposome imaging agents in personalized medicine, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 1417–1435, doi: 10.1016/j.addr.2012.09.003.
- [8] Y. Okamoto, K. Taguchi, M. Sakuragi, S. Imoto, K. Yamasaki, M. Otagiri, In vivo drug delivery efficiency of albumin-encapsulated liposomes as hydrophobic drug carriers, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 47 (2018) 62–66, doi: 10.1016/j.jddst.2018.07.001.
- [9] S.Y. Kim, S.J. Lee, J.K. Kim, H.G. Choi, S.J. Lim, Optimization and physicochemical characterization of a cationic lipid-phosphatidylcholine mixed emulsion formulated as a highly efficient vehicle that facilitates adenoviral gene transfer, *Int. J. Nanomed.* 12 (2017) 7323–7335, doi: 10.2147/IJN.S146785.
- [10] B. Maherani, O. Wattraint, Liposomal structure: a comparative study on light scattering and chromatography techniques, *J. Dispers. Sci. Technol.* 38 (2017) 1633–1639, doi: 10.15713/ins.mmj.3.
- [11] A. Attar, C. Bakir, B. Yuce-Dursun, S. Demir, E. Cakmakci, O. Danis, M. Birbir, A. Ogan, Preparation, characterization, and in vitro evaluation of isoniazid and rifampicin-loaded archaeosomes, *Chem. Biol. Drug Des.* 91 (2018) 153–161, doi: 10.1111/cbdd.13066.
- [12] P. Skupin-Mrugalska, L. Sobotta, A. Warowicka, B. Wereszczynska, T. Zalewski, P. Gierlich, M. Jarek, G. Nowaczyk, M. Kempka, J. Gapinski, S. Jurga, J. Mielcarek, Theranostic liposomes as a bimodal carrier for

- magnetic resonance imaging contrast agent and photosensitizer, *J. Inorg. Biochem.* 180 (2018) 1–14, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2017.11.025.
- [13] S. Shaker, A. Gardouh, M. Ghorab, Factors affecting liposomes particle size prepared by ethanol injection method, *Res. Pharm. Sci.* 12 (2017) 346–352, doi: 10.4103/1735-5362.213979.
- [14] C.F. Duffy, S. Gafoor, D.P. Richards, H. Admadzadeh, R. O’Kennedy, E.A. Arriaga, Determination of properties of individual liposomes by capillary electrophoresis with postcolumn laser-induced fluorescence detection, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1855–1861, doi: 10.1021/ac0010330.
- [15] S.P. Radko, M. Stastna, A. Chrambach, Polydispersity of liposome preparations as a likely source of peak width in capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 761 (2001) 69–75, doi: 10.1016/S0378-4347(01)00301-2.
- [16] C. Urey, V.U. Weiss, A. Gondikas, F. von der Kammer, T. Hofmann, M. Marchetti-Deschmann, G. Allmaier, G. Marko-Varga, R. Andersson, Combining gas-phase electrophoretic mobility molecular analysis (GEMMA), light scattering, field flow fractionation and cryo electron microscopy in a multidimensional approach to characterize liposomal carrier vesicles, *Int. J. Pharm.* 513 (2016) 309–318, doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.09.049.
- [17] K.G. Wahlund, J.C. Giddings, Properties of an asymmetrical flow field-flow fractionation channel having one permeable wall, *Anal. Chem.* 59 (1987) 1332–1339, doi: 10.1021/ac00136a016.
- [18] L. Sánchez-García, E. Bolea, F. Laborda, C. Cubel, P. Ferrer, D. Gianolio, I. da Silva, J.R. Castillo, Size determination and quantification of engineered cerium oxide nanoparticles by flow field-flow fractionation

- coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1438 (2016) 205–215, doi: 10.1016/j.chroma.2016.02.036.
- [19] H. Qu, I.R. Quevedo, S.W. Linder, A. Fong, T.K. Mudalige, Importance of material matching in the calibration of asymmetric flow field-flow fractionation: material specificity and nanoparticle surface coating effects on retention time, *J. Nanoparticle Res.* 18 (2016), doi: 10.1007/s11051-016-3601-0.
- [20] H. Kato, A. Nakamura, H. Banno, M. Shimizu, Separation of different-sized silica nanoparticles using asymmetric flow field-flow fractionation by control of the Debye length of the particles with the addition of electrolyte molecules, *Colloids Surf. A, Physicochem. Eng. Asp.* 538 (2018) 678–685, doi: 10.1016/j.colsurfa.2017.11.067.
- [21] M. Correia, K. Loeschner, Detection of nanoplastics in food by asymmetric flow field-flow fractionation coupled to multi-angle light scattering: possibilities, challenges and analytical limitations, *Anal. Bioanal. Chem.* (2018) 1–13, doi: 10.1007/s00216-018-0919-8.
- [22] G. Yohannes, M. Jussila, K. Hartonen, M.L. Riekkola, Asymmetrical flow field-flow fractionation technique for separation and characterization of biopolymers and bioparticles, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4104–4116, doi: 10.1016/j.chroma.2010.12.110.
- [23] M. Wagner, S. Holzschuh, A. Traeger, A. Fahr, U.S. Schubert, Asymmetric flow field-flow fractionation in the field of nanomedicine, *Anal. Chem.* 86 (2014) 5201–5210, doi: 10.1021/ac501664t.
- [24] S. Sitar, A. Kežar, D. Pahovnik, K. Kogej, M. Tušek-Žnidarič, M. Lenassi, E. Žagar, Size characterization and quantification of exosomes by asymmetrical-flow field-flow fractionation, *Anal. Chem.* 87 (2015) 9225–9233, doi: 10.1021/acs.analchem.5b01636.

- [25] D.R. Arifin, A.F. Palmer, Determination of size distribution and encapsulation efficiency of liposome-encapsulated hemoglobin blood substitutes using asymmetric flow field-flow fractionation coupled with multi-angle static light scattering, *Biotechnol. Prog.* 19 (2003) 1798–1811, doi: 10.1021/bp034120x.
- [26] S. Hupfeld, D. Ausbacher, M. Brandl, Asymmetric flow field-flow fractionation of liposomes: optimization of fractionation variables, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 1465–1470, doi: 10.1002/jssc.200800626.
- [27] A.H. Hinna, S. Hupfeld, J. Kuntsche, M. Brandl, The use of asymmetrical flow field-flow fractionation with on-line detection in the study of drug retention within liposomal nanocarriers and drug transfer kinetics, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 124 (2016) 157–163, doi: 10.1016/j.jpba.2016.02.037.
- [28] C. Decker, A. Fahr, J. Kuntsche, S. May, Selective partitioning of cholesterol and a model drug into liposomes of varying size, *Chem. Phys. Lipids* 165 (2012) 520–529, doi: 10.1016/j.chemphyslip.2012.04.001.
- [29] M.H. Moon, I. Park, Y. Kim, Size characterization of liposomes by flow field- flow fractionation and photon correlation spectroscopy, *J. Chromatogr. A* 813 (1998) 91–100, doi: 10.1016/S0021-9673(98)00325-2.
- [30] S. Hupfeld, H.H. Moen, D. Ausbacher, H. Haas, M. Brandl, Liposome fractionation and size analysis by asymmetrical flow field-flow fractionation/multi-angle light scattering: influence of ionic strength and osmotic pressure of the carrier liquid, *Chem. Phys. Lipids* 163 (2010) 141–147, doi: 10.1016/j.chemphyslip.2009.10.009.

- [31] T. Kowalkowski, M. Sugajski, B. Buszewski, Impact of ionic strength of carrier liquid on recovery in flow field-flow fractionation, *Chromatographia* 81 (2018) 1213–1218, doi: 10.1007/s10337-018-3551-z.
- [32] Á. Écija-Arenas, V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Separation and purification of hydrophobic magnetite-gold hybrid nanoparticles by multiphase density gradient centrifugation, *Microchim. Acta* 183 (2016) 2005–2012, doi: 10.1007/s00604-016-1838-z.
- [33] M.A.N. Hajibagheri (Ed.), *Electron Microscopy Methods and Protocols*, Humana Press Inc., 1999, doi: 10.1385/1-59259-201-5:31.
- [34] S. Bibi, R. Kaur, M. Henriksen-Lacey, S.E. McNeil, J. Wilkhu, E. Lattmann, D. Christensen, A.R. Mohammed, Y. Perrie, Microscopy imaging of liposomes: from coverslips to environmental SEM, *Int. J. Pharm.* 417 (2011) 138–150, doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.12.021.
- [35] M. Almgren, K. Edwards, K. Göran, Cryo transmission electron microscopy of liposomes and related structures, *Colloids Surf. A, Physicochem. Eng. Asp.* 174 (2000) 3–21.
- [36] V. Sánchez-López, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Evaluation of liposome populations using a sucrose density gradient centrifugation approach coupled to a continuous flow system, *Anal. Chim. Acta* 645 (2009) 79–85, doi: 10.1016/j.aca.2009.04.045.
- [37] V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Gold nanoparticle-biotinylated liposome hybrids as analytical reagents for biotin determination using a competitive assay and resonance light scattering detection, *Talanta* 99 (2012) 538–543, doi: 10.1016/j.talanta.2012.06.029.

- [38] A. Kumar, C.K. Dixit, Methods for characterization of nanoparticles, *Adv. Nanomed. Delivery Ther. Nucleic Acids* (2017) 44–58, doi: 10.1016/B978-0-08-100557-6.00003-1.

BLOQUE II



DESARROLLO DE
PLATAFORMAS ANALÍTICAS
CON INTEGRACIÓN ENTRE
SISTEMAS MICROFLUÍDICOS
Y DETECTORES
CONVENCIONALES



Para el desarrollo de plataformas analíticas en las que se incorporan sistemas de flujo a escala micrométrica integrados dentro del compartimento de muestra de un espectrofluorímetro convencional se la propuesto la integración de un chip comercial del sistema microfluídico mediante el uso de un dispositivo de alineamiento fabricado mediante tecnología de impresión 3D. Esta investigación ha dado lugar a la siguiente publicación científica:

- Integration of a microfluidic system into a conventional luminescence detector using a 3D printed alignment device. Á. Écija-Arenas, V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero. *Microchim. Acta*, 187 (2020) 620.

Como se ha comentado en la Introducción de esta Memoria, hay varias formas de integrar las distintas partes del proceso analítico en los sistemas microfluídicos, según si esta integración se realiza en el propio chip que constituye el sistema microfluídico, lo que sería una incorporación *on-chip* [1] o mediante adaptación de diferentes dispositivos que integran todas las partes del proceso analítico pero sin que sean dispositivos microfabricados a escala micrométrica, tratándose entonces de una incorporación *off-chip* [2,3]. En la publicación presentada en este bloque (**Capítulo II.1**) se aborda la integración completa del propio chip microfluídico dentro del compartimento de muestra de un detector convencional, a modo de integración *off-chip*. Para conseguir este acoplamiento, se ha diseñado un dispositivo de alineamiento fabricado mediante la técnica de impresión 3D. Esto supone una alternativa sencilla y económica, que proporciona el potencial instrumental y las ventajas añadidas de usar detectores convencionales basados en la monitorización mediante la técnica de espectroscopía de fluorescencia.

Un objetivo preliminar de esta investigación supone implementar una plataforma analítica con integración de sistemas microfluídicos para su posterior uso en el desarrollo de sistemas analíticos de aplicación en la determinación de residuos de compuestos de interés en análisis agroalimentario. Algunas de las ventajas ya comentadas del uso de sistemas miniaturizados a escala microfluídica suponen un ahorro importante en el consumo de muestras y reactivos, con la consecuente disminución de costes, reducción de los tiempos de análisis y en determinadas circunstancias facilitar su portabilidad.

La utilidad de esta plataforma analítica ha quedado demostrada mediante su implementación como un sistema mixto en el que se ha integrado un tubo de muestra que contiene una suspensión de magnetoliposomas híbridos sintetizados y sus precursores, que previamente han sido separados mediante centrifugación en gradiente multifase de densidad, siguiendo un procedimiento similar al descrito en el **Capítulo I.2**, y comparando los resultados obtenidos con los de dicha publicación. Para llevar a cabo la integración, se han estudiado las variables que afectan a la adaptación del vial de la separación en el sistema microfluídico, su desplazamiento completo por el mismo y la monitorización de la señal obtenida al paso de los diferentes NMs separados en el detector espectrofluorimétrico.

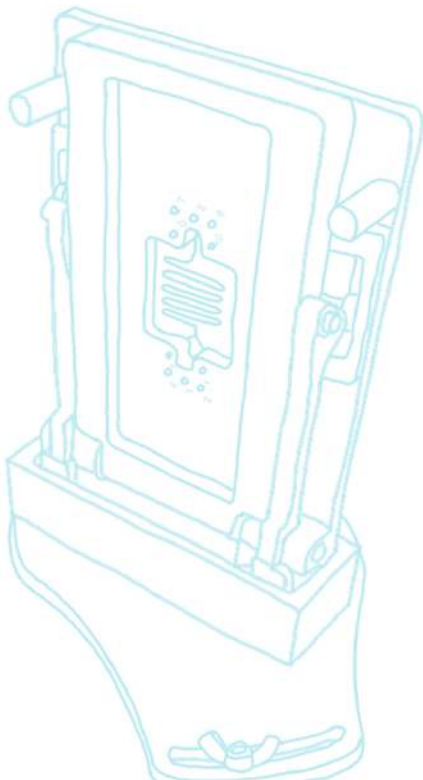
Referencias

- [1] A.M. Zeid, J.J.M. Nasr, F. Belal, M.I. Walash, Y. Baba, N. Kaji, Determination of three antiepileptic drugs in pharmaceutical formulations using microfluidic chips coupled with light-emitting diode induced fluorescence detection, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 246 (2021) 119021. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119021>.
- [2] M. Sierra-Rodero, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Determination of aminoglycoside antibiotics using an on-chip

- microfluidic device with chemiluminescence detection, *Microchim. Acta.* 179 (2012) 185–192. <https://doi.org/10.1007/s00604-012-0878-2>.
- [3] M. Sierra-Rodero, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Determination of fluoroquinolone antibiotics by microchip capillary electrophoresis along with time-resolved sensitized luminescence of their terbium(III) complexes, *Microchim. Acta.* 181 (2014) 1897–1904. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1266-x>.

CAPÍTULO II.1

Integration of a microfluidic system into a conventional luminescence detector using a 3D printed alignment device





Integration of a microfluidic system into a conventional luminescence detector using a 3D printed alignment device

Ángela Écija-Arenas, Vanesa Román-Pizarro, Juan Manuel Fernández-Romero

Departamento de Química Analítica, Instituto Universitario de Investigación en Química Fina y Nanoquímica (IUNAN), Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Anexo “Marie Curie”, E-14071 Córdoba, España

Abstract

A useful 3D printed device for the inside microfluidic integration into a conventional optical detector has been developed. The coupling system supposes the complete integration of a microfluidic device inside the sample compartment of a conventional spectrofluorimeter. For this purpose, a commercial chip-holder, including a microfluidic chip, was anchored inside the detector using a “lab-built” 3D printing alignment prototype. The variables affecting the position of the 3D printed device, such as horizontal and vertical and rotary angles, were optimized. The usefulness of the microfluidic integration system has been tested using an organized suspension of separated hybrid magnetoliposomes containing nanomaterials that were previously separated using a multiphase density gradient centrifugation (MDGC) method. The whole integration system consists of three well-established parts: the impulsion unit, the displacement unit, and the microfluidic chip. The impulsion unit is formed by two syringe pumps, which propel under microflow-rate regime the solutions through to the microfluidic system. The first fluid incorporates an immiscible solution that provides the solution which fills positive oil/water (O/W) displacement unit. In this unit, the previously organized MDGC suspension, which includes different

liposome populations, was layer-by-layer displaced to a y-mixer microfluidic chip. The separation content merges with the second solution propelled by the other syringe pump. This solution incorporates a surfactant that promotes the liposome lysis. The novelty supposes the easy incorporation of a 3D printer alignment device, which facilitates the incorporation of the microfluidic channel focused into the optical pathway of the luminescence detector.

Keywords: Integrated microfluidic/luminescence detector · 3D printing alignment device · Multidensity gradient centrifugation (MDGC) · Hybrid magnetoliposomes

1. Introduction

In the last decades, microscale dynamic systems have brought enormous interest as useful new tools in a wide range of applications supported in automation/miniaturization in different areas such as material synthesis, chemical and biochemical reactivity and detection, drug delivery systems, and biotechnology process control. The incorporation of microfluidic systems into analytical processes constitutes a clear example of the advances in analytical chemistry. The development of microscale dynamic systems involves manipulating fluids in channels with dimensions of tens of micrometers and postulates several variations in physical, physicochemical, and chemical behaviors providing significant changes between the material interactions at microscale in comparison with those that occur on a larger scale. This paradigm shift conditions fluid dynamics processes, surface interactions, changes in chemical reactivity, among others.

Besides, it also provides advantages such as low sample and reagent consumption, simple fluid handling, reduced analysis time, and portability, which increase the interest in the development of analytical applications at microfluidic scale. Microfluidic systems allow the integration of various stages

of the analysis process on a single chip. Since the 70s decade, aided by MEMS technology, an integrated microgas chromatograph was developed into a silicon chip [1], or the inkjet printer was developed by IBM [2], the microscale analysis systems have emerged considerably. From nonintegrated systems based on the erroneous translation from macroscale dynamic systems (i.e., FIA, SIA) to the most integration/miniaturization stages, the so-called total microanalysis systems (μ -TAS), passing through Lab-On-a-Chip (LOC) systems. Since then, the field of integration of microfluidic systems has grown considerably and has diversified into many different areas [3–5].

The evolution of these embedded systems on the microfluidic chip has been improved in this period. One part of the integration involves the detection stage. The monitoring of the analytical signal at microfluidic systems occurs by focusing the optical beam using two ways: by coupling elements “off-chip” or incorporating them as miniaturized elements directly “on-chip”. The most accessible “off-chip” adaptation provides the coupling optical infrastructure using macroscale elements. For example, using bifurcated optical fiber guides that conducted the radiations between the microfluidic reaction/detection zone and the optical detector [6], or using x-y-z alignment devices to place the microfluidic chip in the focused zone of an up-converter microscope [7]. The use of these devices involves taking into account the study of more variables and requires the coupling of voluminous and costly equipment. The second alternative supposed the miniaturization and integration of different devices, “on-chip.” That supposes the real microscale integration at microscale. However, “on-chip” detection supposes costly devices and a high development process, with many engineering steps. Not enough attention has been paid to a third alternative, which involves integrating microfluidic devices focused directly on the optical pathway of conventional detectors. Alignment devices made with 3D printing technique can be designed for the development of this integration. The applicability of these integration systems facilitated the

combined use of microfluidic systems with the excellent technical features of classical optical detectors. Additionally, the use of 3D printing technology provides alignment systems supposing a cheap and straightforward alternative.

On the other hand, liposomes are self-assembled bilayer vesicles formed by phospholipids, which are amphiphilic molecules that entrapped into their inner aqueous space several compounds. This structure is the basis of their potential applicability since they allow the encapsulation of several types of substances according to their hydrophobicity and locations. Liposomes are widely used in different areas such as cosmetic, pharmaceutical, biomedical, gene therapy, and agri-food technology areas, with particular incidence for biomedical or biotechnological purposes [8–12].

The confluence of the uses of microfluidic techniques and liposomes is an exciting subject that has been afforded in literature from the different focusing point of view [13–17]. In the last decade, microfluidic systems have been revealed useful to the online synthesis of nanomaterials, which include effective liposome production. However, when the liposomes are considered analytes, the microfluidic system acts as “on-flow” analytical system, providing information about their morphological and structural features or their entrapped materials. One of the most exciting microfluidic and liposome confluences is the use of liposomes as analytical tools, which provide an active role throughout the analytical process. A significant liposome contribution in (bio)analytical systems were those related to microscale containers in which the entrapped material is protected and transferred to the in situ reaction/detection zone where must be released. Literature provides information about the use of hybrid liposomes with optical properties that facilitate amplified signal monitoring. Some strategies have been based on the absorption measurement using pyranine (HPTS) encapsulated in hybrid magnetoliposomes as pH indicators [18], or luminescence measurement of several fluorophores loaded in hybrid

magnetoliposomes, such as rhodamine B (RB), cresyl violet (CV), and naphthofluorescein (NF) [19–22].

In this research, a novelty procedure to integrate commercial microfluidic devices into the sample compartment of conventional optical detectors using 3D printed alignment devices has been proposed. The availability of this integrated microfluidic/conventional detector system was tested by coupling it with a previously developed multidensity gradient centrifugation (MDGC) system, which provides the separation of mixtures of liposomes. The research group has previously described the development of coupled MDGC systems with conventional flow models to separate mixtures of synthesized nanomaterials (nanoparticles and liposomes) [23,24]. In these cases, the separation and continuous monitoring effectiveness has been demonstrated using fluids working at turbulent dynamic regimes. However, the usefulness of a miniaturized system that coupled MDGC with continuous luminescence detection that working at microscale regime has not so far been demonstrated.

2. Materials and methods

2.1. Materials

All chemicals used were of analytical grade. 1,2-Diasteroylsn- glycerol-3-phosphatidylcholine (DSPC), 3-sn-phosphatidylethanolamine (DOPE) (type II-S from sheep brain), cholesterol (CH), cresyl violet acetate (CV), tetrachloroauric acid (HAuCl_4) trihydrate, 1-dodecylthiol (C_{12}SH), Ficoll PM 400, Percoll, Triton X-100, and hexane were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany, www.sigmaaldrich.com). Sucrose and iron (III) chloride were purchased from Panreac (Panreac Química S.L.U., Barcelona, www.panreac.es). Iron (II) chloride, rhodamine B (RB), fluorescein chloride, and other common reagents were purchased from Merck (Darmstadt,

Germany, www.merckgroup.com). All solutions were prepared in 50 mM disodium hydrogen phosphate buffer solution (pH 8) (Merck), using deionized water purified with a Milli-Q system (Millipore S.A.S., Molsheim, France, www.millipore.com).

For the MDGC layers, different concentrated solutions of 80% w/v of sucrose, 23% w/v of Percoll, and 50% w/v of Ficoll were prepared. Stock solution of 5 mM of fluorophore (RB and CV) were prepared for the synthesis of their respective h-MLs.

2.2. Apparatus and instruments

The 3D printed alignment device was manufactured using an Anet A8 Plus 3D printer (Shenzhen Anet Technology Co, China), with the following features: large dimension area of $300 \times 300 \times 350$ mm, with an extrusion head nozzle resolution of 0.1 mm, and a range of 0.1–0.2 mm printing height, also providing hotbed and extrusion temperatures of 100 and 250 °C, respectively. The piece was performed using polylactic acid (PLA-850) filament, which was modified using a biodegradable NatureWorks Ingeo 3D850-PLA. The alignment device was designed using the freeCAD parametric software version 0.18-16148 (Licensed by Creative Commons Co, LA, USA) and exported through microSD card to the 3D printer using STL file format.

All luminescence signals were carried out in a Horiba Scientific Fluorolog-3P spectrofluorimeter (Horiba Scientific, www.horiba.com, Scientific, France). This spectrofluorimeter was equipped with two signal acquisition modes according to the type of the used sample. When using a microfluidic system placed at the optical pathway of the spectrofluorimeter, the front-face operation mode used is recommended. The acquisition of the emission signal occurs at an angle of 22.5° with respect to the excitation beam, which is adequate to measure on special optical cuvettes or solid samples. All the

information provided by the instrument was processed using the FluoroScan application software (Horiba Scientific) compatible with Origin 9.1.0 software (32-bit, OriginLab Co. 2013, Northampton, MA, USA). The flow was driven through the microfluidic reactor using two microfluidic syringe pumps (NE-300). Two COC (cyclic olefin copolymer) y-mixer microreactors (R150.332.2 and R150.676.2) with dimensions of 45×15 mm, a channel width of $150 \mu\text{m}$, a channel height of $130 \mu\text{m}$, and internal volumes of 6 and $13 \mu\text{L}$ were used to choose the adequate microfluidic mixture zone and was assembled with connection tubes made of Teflon with an inner diameter of $250 \mu\text{m}$ using the fluidic connect pro (FC-PRO-CH4515). All of these microfluidic materials were provided by Micronit (Micronit microfluidics, Enschede, The Netherlands, www.micronit.com). A “lab built” positive oil/water (O/W) solvent displacement unit based on a Eppendorf tube was incorporated to provide the continuous translation of the previous MDGC liposomes layers through the microfluidic system. An MPW-350R centrifuge (MPWMed. Instrument, Warsaw, Poland, <http://www.mpw.pl>) with a cooling chamber of rotating, equipped with an angle rotor HSL-11199 (45° , $12 \times 2.2/1.5$ mL, max. speed = 18,000 rpm, 24,088 RCF and $r_{\text{max}} = 6.65$ cm) was used for multiphase density gradient centrifugation. A Büchi rotavapor R-205 (Flawil, Switzerland; www.buchi.com) was used to evaporate the organic solvent and form the liposomes.

2.3. Separation of hybrid nanomaterials with MDGC system

The hybrid magnetoliposomes were synthesized using the rapid solvent evaporation (RSE) method, which incorporates the selected fluorophores, and the hydrophobic magnetic nanoparticles following previously reported methods [23–25]. The MDGC layers were prepared using a slight modification of the MDGC method previously described for liposome separation [24], consisting of modifying the concentrations of the ingredients that constitute the multiple

density gradient to allow the progress of the mixing fluids at the microscale regime. The gradient was performed using a mixture of Ficoll, Percoll, and sucrose that provide the separation different liposome populations and the excess of reactants. The Ficoll and Percoll concentrations were 20 and 10% (v/v), respectively. The relative concentrations of sucrose in each layer were adjusted to 10, 20, 30, 40, 50, 55, and 65% (v/v). Under these chemical conditions, the hydrodynamic system provided an adequate driven flow under the microfluidic regime. These layers were introduced directly in a 1.5-mL Eppendorf tube and performed by centrifugation at 3340×g for 30 min to providing and stabilizing the adequate multidensity gradient media. The separation stage started by adding 500 μ L of the recently synthesized liposomal suspension and centrifugated at 2520×g for 20 min to reach the adequate separation. This separate MDGC material was stored refrigerated at 4 °C until its incorporation into the microfluidic system.

2.4. Implement of the 3D printed alignment device

The microfluidic chip was introduced on the chip holder, and a 150 μ m diameter “pinhole” was located at 3.5 μ L from the merging zone in order to observe the provided signal, which was enough to eliminate the laminar regime, facilitate diffusion between both fluids, and allow the liposome lysis due to the surfactant. The integration of the microfluidic system into the conventional spectrofluorimeter supposed the use of the “lab-built” 3D printing alignment device that places the microfluidic device adequately into the sample chamber to obtain the correct alignment of the “pinhole” placed at the surface of the microfluidic device correctly aligned with the optical pathway of the spectrofluorimeter detector that is performed at the front-face acquisition mode. **Figure 1** shows the different images of the 3D printer alignment device: the 3DCAD prototype (a), the 3D printed device developed using biodegradable polylactic acid (PLA-850) (b), the Micronit chip-holder including the

microfluidic mixer chip (c), and the correct location of the microfluidic device with the 3D printed alignment prototype inside the spectrofluorimeter sample chamber (d).

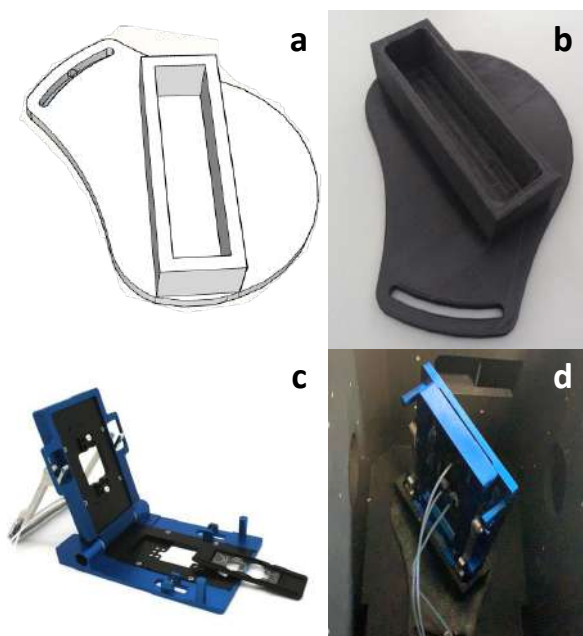


Fig. 1 Three-dimensional printer alignment device: **a** 3D-CAD prototype, **b** 3D printer alignment device performed using biodegradable polylactic acid (PLA-850), **c** chip-holder and microchip device, and **d** integrated 3D printer alignment device into the sample chamber at the spectrofluorimeter system

2.5. Microfluidic monitoring of the post-MDGC separated hybrid nanomaterials

The complete integration of the microfluidic system into the conventional detector was applied to monitor the MDGC separated hybrid liposomes after their synthesis process. Figure 2 represents different parts of the integrated microfluidic system into the conventional detection system. **Figure 2 a** shows the three colored parts that represent the whole integrated microfluidic-MDGC/conventional luminescence detector approach: (1) the microfluidic system, (2) the 3D printed alignment in the conventional detector, and (3) the

computer to control both parts and acquire data. **Figure 2 b** shows a scheme of the O/W positive displacement system. **Figure 2 c** depicts an elaborate scheme of the integrated 3D printed alignment device with the microchip adapted into the spectrofluorimeter's sample chamber.

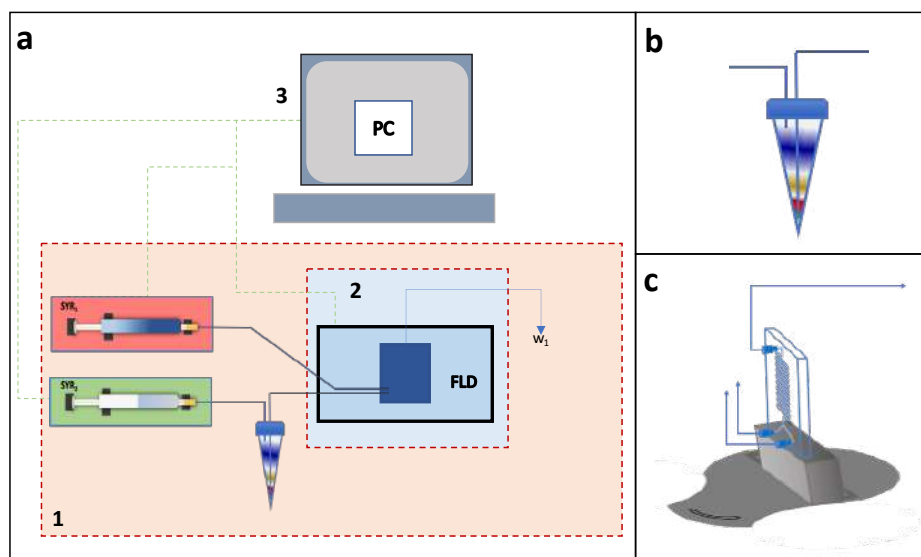


Fig. 2 a Scheme of the integrated microfluidic/conventional detector system: (1) the microfluidic system, (2) the integrated 3D printed alignment device in the sample compartment of the spectrofluorimeter, and (3) the digital connection between the computer and each controlled part of the integrated system. **b** O/W displacement MDGC separated liposome unit. **c** Integrated 3D printer alignment device with the microfluidic chip into the sample chamber at the spectrofluorimeter system

As can be seen, the microfluidic system consisted of two pumps with one syringe, each working at a flow rate of 25 $\mu\text{L}/\text{min}$. The first syringe had a hexane solution to impulse the separated nanomaterials contained in the MDGC tube into the system using the O/W displacement device, and the second syringe had a surfactant solution that provides the fluorophore release from liposomes previous to the detector. The O/W positive displacement device involved using a “lab-built” arrangement equipped with two needles, one longer than the other. Needles were glued to an Eppendorf cover that fits with the MDGC tube. The hexane solution was introduced through the small needle into the tube to

displace the aqueous MDGC content through the microfluidic system. This solvent was chosen because it is immiscible and less dense than the tube content, allowing the entry of the separated nanomaterials into the microfluidic system. LPs were mixed with the surfactant in the microfluidic reactor, which had an internal volume of 6 μL .

As described above, the system included a 3D printed alignment device to place the chip-holder in an adequate focused position to receive the excitation radiation. The potential light dispersion was minimized using the “pinhole,” focusing the radiation in the center of the microchannel. The luminescence signals were monitored at the suitable optimized values to each instrumental variable, including the excitation/emission wavelengths for each encapsulated fluorophore, the optimum ex/em slits size, and the gain of the PMT tube. **Table 1** depicts the luminescence characteristics of the fluorophores and their measurement [26–28]. The front-face mode of the spectrofluorimeter was used to do the measurements, because the excitation light is focused on the front surface of the sample, and fluorescence emission is collected from this region at an angle minimizes reflected and scattered light. This mode is used in case of high opaque or solid sample, and microfluidics is considered as a solid surface. Data were acquired and treated using the original software of the spectrofluorimeter. As can be seen in **Table 1**, both fluorophores do not have the same fluorescence intensity at their excitation and emission wavelength, so all signals were treated applying a smoothing treatment using the adjacent average method (selecting 150 points). All experiments were replicated three times, and the results were the average of these repetitions. After each profile measurement, a sequence of the water-ethanol-water solution was introduced to clean the system.

Table 1. Instrument features of the fluorophores entrapped into the synthesized h-MLs

Variables	Selected fluorophores	
	RB	CV
Excitation wavelength, nm	553	585
Emission wavelength, nm	574	627
Excitation/emission slits, nm	5/5	5/5
PMT gain, V	950	950
Quantum yield (Φ_f) ^a	0.70	0.58
ϵ , mol ⁻¹ L cm ⁻¹ (10 ⁴) ^b	116	28

RB rhodamine B, *CV* cresyl violet

^a Quantum yield obtained from the references [26,27]

^b Molar absorptivity values obtained from reference [28]

3. Results and discussions

3.1. Optimization of MDGC system variables

The MDGC system layers had to be modified compared with the used in previous MDGC methods with continuous flow monitorization [24] because of their high density. Layers with high sucrose, Ficoll, and Percoll concentrations were high-density solutions, caused clogging in the microchannels and increased the measurement time. Consequently, the concentration of layer compounds must be lowered until achieving a compromise situation between obtaining the best separation of the nanomaterials and a good transport of the tube content through the microchannels. The Ficoll concentration in each layer should be decreased from 30 to 20% (v/v) and the Percoll concentration from 15 to 10% (v/v). The sucrose concentration in each layer should be modified to 10, 20, 30, 40, 50, 55, and 65% (v/v), and the last layer had no presence of stabilizing substances (Ficoll and Percoll).

3.2. Development of the microfluidic system

To demonstrate the efficiency of the coupling of a microfluidic chip in the optical pathway of a commercial spectrofluorimeter using a 3D printer alignment device, a previously studied method is needed. For that, the MDGC system for the separation of hybrid magnetoliposomes was chosen. However, the previous method needed modification to be adapted from a macro- to a microfluidic size, so the syringe-based pumps have been used instead of peristaltic pumps. To introduce the separated nanomaterials, an O/W positive displacement device was made, involving a lab-built arrangement equipped with two needles, one longer than the other. Needles were glued to an Eppendorf cover. Concerning the previous separation with the MDGC system, the optimum values of the physical and chemical variables were selected, similar to those used in previous works [20]. The physical variables studied for the integrated system have been summarized in **Table 2**.

Table 2. Optimization of variables affecting the integrated MDGC-MFS

Type	Variable	Range studied	Optimal value
Microfluidic	Flow rate, mL min ⁻¹		
	Syringe pump 1	5-50	25
	Syringe pump 2	5-50	25
	Microfluidic reactor, μ L	6-13	6
Instrumental	Rotary angle, degree	30-60	45
	Slit ex/em, nm	2-10	5/5
	PMT gain, V	400-950	950

The flow rate is an essential variable because the microfluidic scale influenced the change between a laminar to a turbulent fluid regime providing an adequate diffusion between both solutions and the liposome disruption effectiveness before they pass through the detector. High flow rates decreased

the efficiency of the liposome disruption, affecting the final profile of the MDGC separation monitoring, while low flow rates increased the monitoring time considerably. The internal size of the microfluidic channel also affects the availability of the micrometric system. The diameter section lower than 250 μm caused irreversible clogging of the nanomaterial into the channel. A flow rate of 25 mL/min using a 250 μm diameter size with an inner volume of 6 μL was selected. Under this condition, the complete Eppendorf vial volume passed through the system requiring a monitoring time of 70 min, including the washing periods. Another critical aspect of monitoring the adequate emission signal is the position of the microfluidic chip. The alignment device must be focused to the center of the microfluidic channel. To provide this alignment with 150 μm diameter size “pinhole” placed at the center of the channel length at approximately 3.5 μL displaced volume from the y-mixer channel point, it provided adequate diffusion between both solutions the complete disruption of the liposomal vesicles.

The novel use of the 3D printed alignment device facilitated the adequate focusing position of the microchip device inside the sample compartment of the spectrofluorimeter. The 3D printed device had a rotary angle system that provided the best position to focus the emission beam on the emission monochromator using the front-face mode. In order to optimize the best angle position, the system was tested by introducing a solution containing 1 mM fluorescein, prepared in water, and checking the best emission signal at 487 and 518 nm, for the excitation and emission wavelengths, respectively, with slit apertures of 5/5 and a PMT gain of 950 V. The influence of the angle was studied between 30 and 60°. A similar study was performed by passing only water to discriminate between dispersion from the capillary channel and the fluorophore emission. As shown in **Fig. 3**, with the fluorescein solution, the best position angle was 45° that provided the best emission signal.

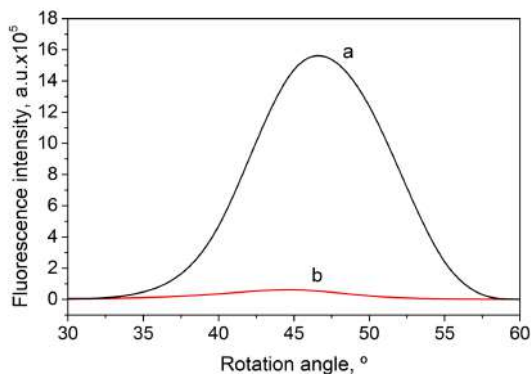


Fig. 3 Influence of the rotation angle measured using (a) 1 mM fluorescein aqueous solution and (b) water

The liposome disruption was evaluated using different surfactants; according to the previous studies [20], Triton X-100 provided the higher lysis effect. It also promoted a fluorescence enhancement of the encapsulated fluorophores, which optimum values were 1 mM of Triton X-100 for liposomes containing cresyl violet and 10 mM of Triton X-100 for those containing rhodamine B. **Figure 4** depicts the excitation and emission spectra achieved for each encapsulated fluorophore to be used. As can be seen, the maximum values of excitation and emission wavelength corresponds to the values registered in **Table 1**.

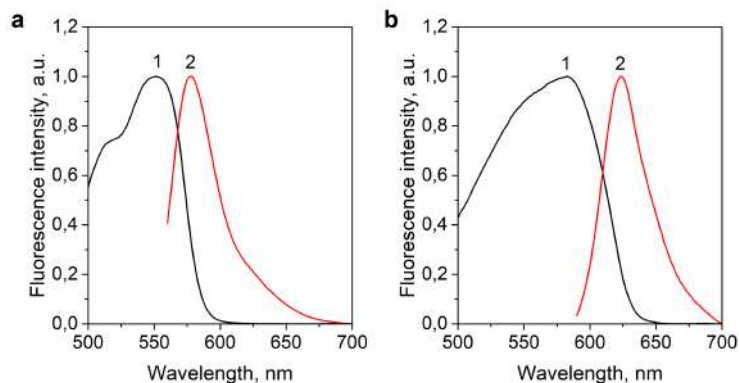


Fig. 4 Excitation and emission spectra of **a** rhodamine B and **b** cresyl violet encapsulated in hybrid magnetoliposomes: (1) excitation and (2) emission spectra

3.3. Evaluation of the microfluidic coupling

The MDGC system was coupled to the continuous flow system to monitor the separated liposomes. Two types of synthesized hybrid magnetoliposome mixtures were assayed to demonstrate the usefulness of the method. **Figure 5** shows the scheme of the different ingredient which constituted the MDGC separation Eppendorf tube and a simulate profile achieved using the integrated microfluidic/conventional spectrofluorimeter system (see **Fig. 5a**). **Figure 5b** and **c** show the monitorization profile for two different types of synthesized liposome mixtures, which were monitored at a selected wavelength corresponding with the encapsulated fluorophores: rhodamine B (**Fig. 5b**) and cresyl violet (**Fig. 5c**), respectively. When monitoring the separation with the microfluidic system, similar results than using the continuous flow system [24] have been obtained, so signals in the different zones described in the previous research can be identified with the corresponding components. Four types of signals were acquired: magnetoliposomes, hybrid liposomes, hybrid magnetoliposomes, and non-encapsulated fluorophores. The signal of magnetoliposomes was observed in zone 1, corresponding to the bottom layer (6.7–11.3 min); hybrid liposomes were found in the second and/or the third layer from the bottom (11.3–22.7 min), which means the zone 2; and hybrid magnetoliposomes appeared in the sixth layer from the bottom (34.7–40.7 min), zone 4. A signal in zone 5, the sample zone (46.7–66.7 min) was observed, due to nonencapsulated fluorophores. In this application, the separation of liposomes using MDGC system and its monitorization is based in the appearance of each liposome population in the corresponding zone. The testing of each liposome fraction has been performed using techniques previously referred [24]. Obtaining the populations separated in the same zones as in the previous developed research demonstrates, although higher times, due to the high density of the components, the efficiency of the microfluidic coupling to the MDGC system for the separation of liposomes.

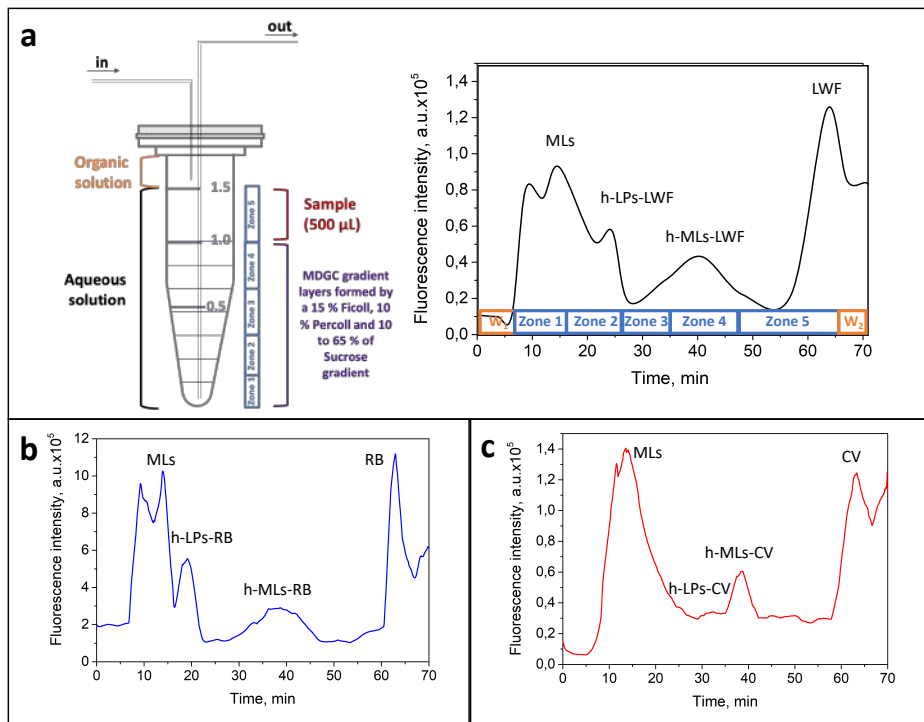


Fig. 5 Excitation and emission spectra of **a** rhodamine B and **b** cresyl violet encapsulated in hybrid magnetoliposomes: (1) excitation and (2) emission spectra

4. Conclusions

In this research, the use of the 3D printing technology provides innovative tools to incorporate miniaturized devices, such as microfluidic systems, inside a conventional optical detector. This usefulness expands the integrated uses of microfluidic systems with conventional optical detectors and facilitates the use of all their instrumental characteristics. Because of this technology, a novel 3D printed alignment device was used to facilitate the adequate integration of the microfluidic system into a spectrofluorimeter sample compartment. The coupling efficiency between a method developed at a microfluidic scale integrated with an O/W positive displacement device facilitates the acquisition of separation profiles of previously performed MDGC separated hybrid magnetoliposomes. Some limitations were found due to the

possibility of clogging problems in the application chosen to demonstrate the efficiency of the integration due to the high density of the solutions inserted in the microfluidic system. The thickness of the channels obstructed the transit of dense solutions, causing clogging and long measurement times. Despite these limitations, the use of the integrated system has been demonstrated, allowing its use in future determinations methods developed by the research group.

Acknowledgments

The authors thank J.I. Calero Gutiérrez for the design and manufacture of the 3D printed alignment prototype for the MFS and FLD coupling system.

Author contributions

Á. Écija-Arenas: conceptualization, data treatment, writing—original draft, methodology, optimization, formal analysis, investigation, writing—review and editing, visualization. V. Román-Pizarro: resources, supervision of data treatment, optimization, and methodology. J.M. Fernández-Romero: conceptualization, methodology, writing—review and editing, investigation, resources, supervision, project administration, funding acquisition.

Funding

This study is financially supported by the Operative Framework Funding FEDER-Andalucía 2014-2020 Program (ref. UCO-1263679).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Terry SC, Herman JH, Angell JB (1979) A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer. *IEEE Trans Electron Devices* 26:1880–1886. <https://doi.org/10.1109/T-ED.1979.19791>
2. Petersen KE (1979) Fabrication of an integrated, planar silicon inkjet structure. *IEEE Trans Electron Devices* 26:1918–1920
3. Whitesides GM (2006) The origins and the future of microfluidics. *Nature* 442:368–373. <https://doi.org/10.1038/nature05058>
4. Weibel DB, Whitesides GM (2006) Applications of microfluidics in chemical biology. *Curr Opin Chem Biol* 10:584–591. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.10.016>
5. Kuswandi B, Nuriman HJ, Verboom W (2007) Optical sensing systems for microfluidic devices: a review. *Anal Chim Acta* 601:141–155. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.08.046>
6. Sierra-Rodero M, Fernández-Romero JM, Gómez-Hens A (2012) Determination of aminoglycoside antibiotics using an on-chip microfluidic device with chemiluminescence detection. *Microchim Acta* 179:185–192. <https://doi.org/10.1007/s00604-012-0878-2>
7. Sierra-Rodero M, Fernández-Romero JM, Gómez-Hens A (2014) Determination of fluoroquinolone antibiotics by microchip capillary electrophoresis along with time-resolved sensitized luminescence of their terbium(III) complexes. *Microchim Acta* 181:1897–1904. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1266-x>

8. Gómez-Hens A, Manuel Fernández-Romero J (2005) The role of liposomes in analytical processes. *TrAC Trends Anal Chem* 24:9–19. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.07.017>
9. Gómez-Hens A, Fernández-Romero JM, Aguilar-Caballos MP (2008) Nanostructures as analytical tools in bioassays. *TrAC - Trends Anal Chem* 27:394–406. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.03.006>
10. Emami S, Azadmard-Damirchi S, Peighambaroust SH, Valizadeh H, Hesari J (2016) Liposomes as carrier vehicles for functional compounds in food sector. *J Exp Nanosci* 11:737–759. <https://doi.org/10.1080/17458080.2016.1148273>
11. Alexander JF, Aguirre-Villarreal D, Godin B (2017) Liposomal encapsulation masks genotoxicity of a chemotherapeutic agent in regulatory toxicology assessments. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* 13:829–833. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.12.016>
12. Petersen AL, Hansen AE, Gabizon A, Andresen TL (2012) Liposome imaging agents in personalized medicine. *Adv Drug Deliv Rev* 64:1417–1435. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.003>
13. Sierra-Rodero M, Fernández-Romero JM, Gómez-Hens A (2014) Strategies to improve the analytical features of microfluidic methods using nanomaterials. *TrAC - Trends Anal Chem* 57:23–33. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.01.006>
14. Van SwaayD, Demello A(2013)Microfluidic methods for forming liposomes. *Lab Chip* 13:752–767. <https://doi.org/10.1039/c2lc41121k>
15. Wang Z, Wu C, Fan T, Han X, Wang Q, Lei J, Yang J (2019) Electroformation and collection of giant liposomes on an integrated microchip. *Chinese Chem Lett* 30:353–358. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2018.12.001>

16. Bottaro E, Nastruzzi C (2016) "Off-the-shelf" microfluidic devices for the production of liposomes for drug delivery. *Mater Sci Eng C* 64:29–33. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.056>
17. Michelon M, Huang Y, de la Torre LG, Weitz DA, Cunha RL (2019) Single-step microfluidic production of W/O/W double emulsions as templates for B-carotene-loaded giant liposomes formation. *Chem Eng J* 366:27–32. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.02.021>
18. Hermida LG, Sabés-Xamaní M, Barnadas-Rodríguez R (2009) Combined strategies for liposome characterization during in vitro digestion. *J Liposome Res* 19:207–219. <https://doi.org/10.1080/08982100902740847>
19. Sakamoto M, Shoji A, Sugawara M (2016) Giant unilamellar vesicles containing Rhodamine 6G as a marker for immunoassay of bovine serum albumin and lipocalin-2. *Anal Biochem* 505:66–72. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.04.011>
20. Román-Pizarro V, Fernández-Romero JM, Gómez-Hens A (2017) Automatic determination of coenzyme Q10 in food using cresyl violet encapsulated into magnetoliposomes. *Food Chem* 221:864–870. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.085>
21. Albers AE, Dickinson BC, Miller EW, Chang CJ (2008) A redemitting naphthofluorescein-based fluorescent probe for selective detection of hydrogen peroxide in living cells. *Bioorganic Med Chem Lett* 18:5948–5950. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.08.035>
22. Román-Pizarro V, Gómez-Hens A, Fernández-Romero JM (2018) Applicability of fluorescent hybrid magnetoliposomes for the determination of reactive oxygen compounds in food. *Food Anal Methods* 11:2376–2383. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1220-3>
23. Écija-Arenas Á, Román-Pizarro V, Fernández-Romero JM, Gómez-Hens A (2016) Separation and purification of hydrophobic magnetite-

- gold hybrid nanoparticles by multiphase density gradient centrifugation. *Microchim Acta* 183:2005–2012. <https://doi.org/10.1007/s00604-016-1838-z>
24. Écija-Arenas Á, Román-Pizarro V, Fernández-Romero JM (2020) Luminescence continuous flow system for monitoring the efficiency of hybrid liposomes separation using multiphase density gradient centrifugation. *Talanta*. 703:135577. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135577>
25. Román-Pizarro V, Fernández-Romero JM, Gómez-Hens A (2014) Fluorometric determination of alkaline phosphatase activity in food using magnetoliposomes as on-flow microcontainer devices. *J Agric Food Chem* 62:1819–1825. <https://doi.org/10.1021/jf5004804>
26. Rurack K, Spieles M (2011) Fluorescence quantum yields of a series of red and near-infrared dyes emitting at 600-1000 nm. *Anal Chem* 83:1232–1242. <https://doi.org/10.1021/ac101329h>
27. Brouwer AM (2011) Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem* 83:2213–2228. <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-10-09-31>
28. Taniguchi M, Lindsey JS (2018) Database of absorption and fluorescence spectra of >300 common compounds for use in PhotochemCAD. *Photochem Photobiol* 94:290–327. <https://doi.org/10.1111/php.12860>

BLOQUE III



PLATAFORMAS
(BIO)SENSORAS
MICROFLUÍDICAS
APLICADAS AL
ANÁLISIS
AGROALIMENTARIO



Este Bloque de la Memoria presenta las investigaciones desarrolladas con el fin de extender la aplicabilidad analítica en ámbito de la seguridad agroalimentaria del empleo de sistemas microfluídicos con diferente grado de integración de dispositivos e instrumentos convencionales. Con este fin, se han desarrollado dos metodologías dinámicas para la determinación de residuos de antibióticos en muestras de alimentos. Esta parte de las investigaciones han dado lugar a la publicación de dos artículos científicos:

- Development of an aptamer-based SPR-biosensor for the determination of kanamycin residues in foods. Á. Écija-Arenas, E.-M. Kirchner, T. Hirsch, J.M. Fernández-Romero. *Anal. Chim. Acta*, 1169 (2021).
- Usefulness of hybrid magnetoliposomes for the determination of aminoglycoside residues in food using an integrated microfluidic system with fluorometric detection. Á. Écija-Arenas, V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero. *J. Agric. Food Chem.*, aceptado para su publicación 2021.

A su vez, ambos métodos suponen propuestas de plataformas analíticas (bio)sensoras integradas dentro del propio sistema microfluídico. La adaptación de la microzona sensible en el sistema de flujo a escala micrométrica, ha sido una tarea esencial para el desarrollo de estos (bio)sensores y su aplicabilidad en muestras reales. En el planteamiento de las dos investigaciones se han usado dos sistemas de detección ópticos con distinto fundamento, tal y como se muestra en la utilización de la técnica no espectroscópica de monitorización del plasmón de resonancia superficial (SPR) (**Capítulo III.1**) para la determinación de residuos de kanamicina en leche de vacuno, o en el empleo de la detección mediante espectroscopía de fluorimetría en el caso de la segunda publicación (**Capítulo III.2**) para la determinación de residuos de antibióticos aminoglucósidos en

diferentes muestras de alimentos. Hasta la fecha se han establecido bastantes métodos para la determinación de antibióticos aminoglucósidos en diversas muestras (agroalimentarias, farmacéuticas, etc.) [1–3]. Sin embargo, han sido pocos los métodos desarrollados utilizando sistemas dinámicos a escala micro con implementación de sensores acoplados en el sistema de detección [4–6].

El primer método (**Capítulo III.1**) fue desarrollado durante la estancia de tres meses en el “Institute of Analytical Chemie, Chemo and Biosensors” de la Universidad de Regensburg (Alemania), bajo la tutela del Profesor Thomas Hirsch. La investigación realizada ha contribuido favorablemente a mejorar la formación de la doctoranda en el uso de sistemas microfluídicos acoplados con sistemas de ópticos de detección, entre los que se encuentra el detector SPR. Por otra parte, esta estancia ha permitido cumplir uno de los requisitos necesarios para optar a la Mención de Doctorado Internacional. Este método consiste en el desarrollo de un biosensor basado en la unión covalente irreversible y selectiva de los analitos objeto de estudio. En este caso, se ha aplicado a la determinación del antibiótico kanamicina, mediante la implementación de una microzona sensible en la superficie del detector SPR en la que, mediante diferentes tipos de grafeno, se ha retenido un aptámero selectivo a la kanamicina. La monitorización mediante el detector SPR registra los cambios en el ángulo de resonancia durante la interacción bioespecífica, en el que un haz de radiación polarizada incide sobre un prisma en el que se coloca un chip con una delgada película de oro depositada en su superficie, en el cual la intensidad de la luz reflejada es la mínima. Las desviaciones de los ángulos de resonancia adquiridos van a ser proporcionales a una modificación en la masa depositada sobre la capa de oro debida a la interacción aptámero-analito y, por tanto, son proporcionales a los cambios en los índices de refracción originados. El seguimiento de estos cambios proporciona información sobre la cinética de la interacción y, además, permite establecer relaciones entre la señal instrumental y la masa de kanamicina

depositada. El biosensor desarrollado se ha aplicado a la determinación de kanamicina en muestras de leche.

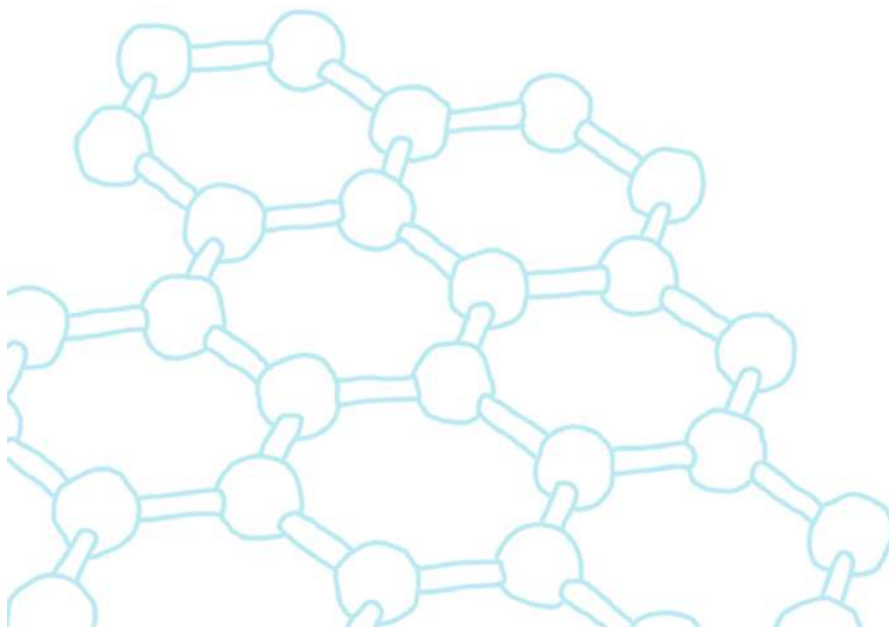
El segundo método desarrollado (**Capítulo III.2**) implica también el uso de un sistema sensor en el que se utilizan magnetoliposomas híbridos retenidos en la zona de reacción/detección, considerada como la microzona sensible del sensor implementado en un sistema microfluídico integrado dentro de la cámara de muestra de un espectrofluorímetro convencional. Los magnetoliposomas híbridos contienen un reactivo implicado en la reacción analítica y nanopartículas magnéticas, lo que facilita su retención magnética en la zona de reacción/detección del sistema microfluídico. Los antibióticos aminoglucósidos carecen de fluorescencia nativa, por lo que se ha utilizado una derivatización química a partir de su interacción con N-acetilcisteína y o-ftalaldehído para formar un derivado isoindol fluorescente. Mientras que la N-acetilcisteína, se ha encapsulado en el interior del liposoma, el o-ftalaldehído se introduce con la disolución que contiene a la muestra o disoluciones patrón del analito. La incorporación de un electroimán confina la microzona activa en un segmento del orden de 1 a 2 mm en el microtubo del chip microfluídico, localizado a su vez en la zona de focalización del haz de radiación incidente del espectrofluorímetro convencional. Para el desarrollo de esta aplicación se ha utilizado un modelo de plataforma analítica microfluídica integrada bastante similar a la utilizada en el **Capítulo II.1**. Esta plataforma analítica determinativa se ha aplicado a la determinación de cuatro antibióticos aminoglucósidos (kanamicina, estreptomycin, gentamicina y neomicina), quedando demostrada la eficacia del empleo de magnetoliposomas híbridos como dispositivos amplificadores de la señal instrumental y, por tanto, de la sensibilidad analítica en comparación con el caso de no usarlos. Se ha llevado a cabo la determinación de estos antibióticos en diferentes muestras de alimentos.

Referencias

- [1] C.Z. Yu, Y.Z. He, G.N. Fu, H.Y. Xie, W.E. Gan, Determination of kanamycin A, amikacin and tobramycin residues in milk by capillary zone electrophoresis with post-column derivatization and laser-induced fluorescence detection, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2009) 333–338. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.12.011>.
- [2] Á. Tölgyesi, E. Barta, M. Sohn, V.K. Sharma, Determination of Antimicrobial Residues in Honey by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, *Food Anal. Methods.* 11 (2018) 2043–2055. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1166-5>.
- [3] D. Wei, H. Meng, K. Zeng, Z. Huang, Visual dual dot immunoassay for the simultaneous detection of kanamycin and streptomycin in milk, *Anal. Methods.* 11 (2019) 70–77. <https://doi.org/10.1039/c8ay02006j>.
- [4] M. Sierra-Rodero, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Determination of aminoglycoside antibiotics using an on-chip microfluidic device with chemiluminescence detection, *Microchim. Acta.* 179 (2012) 185–192. <https://doi.org/10.1007/s00604-012-0878-2>.
- [5] K. Zhang, N. Gan, F. Hu, X. Chen, T. Li, J. Cao, Microfluidic electrophoretic non-enzymatic kanamycin assay making use of a stirring bar functionalized with gold-labeled aptamer, of a fluorescent DNA probe, and of signal amplification via hybridization chain reaction, *Microchim. Acta.* 185 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2635-z>.
- [6] D.H. Kang, K. Kim, Y. Son, P.S. Chang, J. Kim, H.-S. Jung, Design of a simple paper-based colorimetric biosensor using polydiacetylene liposomes for neomycin detection, *Analyst.* 143 (2018) 4623–4629. <https://doi.org/10.1039/c8an01097h>.

CAPÍTULO III.1

Development of an
aptamer-based
SPR-biosensor for the
determination of
kanamycin residues
in food





Development of an aptamer-based SPR-biosensor for the determination of kanamycin residues in foods



Ángela Écija-Arenas ^{a‡}, Eva-Maria Kirchner ^{b‡}, Thomas Hirsch ^{b*}, Juan Manuel Fernández-Romero ^{a*}

^a Departamento de Química Analítica, Instituto Universitario de Investigación en Química Fina y Nanoquímica (IUNAN), Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Anexo “Marie Curie”, 14071 Córdoba, España

^b Institute of Analytical Chemistry, Chemo and Biosensors, University of Regensburg, 93040 Regensburg, Germany

‡ These authors contributed equally

Abstract

A biosensor in which an affinity reaction occurs in the sensitive microzone through the use of specific aptamers to determine kanamycin residues in agri-food samples has been developed. It is an irreversible and continuous flow aptameric biosensor (aptasensor) in which the signal variations are monitored by surface plasmon resonance (SPR) measurements based on the specific interaction of the aptamer with the antibiotic. The signal variation is proportional to the analyte concentration. Graphene is known for efficient binding of molecules with its p-electron system, so a monolayer of graphene prepared from chemical vapor deposition (CVD) has been compared to a multilayer of graphene made from reduced graphene oxide (rGO) for immobilization of the aptamer on the gold surface of the physicochemical transducer. The best results have been obtained with CVD graphene. The dynamic range was between 1 and 100 mmol L^{-1} of kanamycin concentration (r^2

= 0.9981, $n = 7$, $r = 4$), with a limit of detection of 285 nmol L⁻¹ and a sampling frequency of 6 h⁻¹. The precision, expressed as relative standard deviation (RSD%), was established in the range of 1.49 and 3.89%, calculated for 1, 10, and 50 mmol L⁻¹. The selectivity was studied applying the described method to determine other antibiotics, obtaining no significant difference in the analytical signal. The method was applied to determine kanamycin residues in milk samples with recovery values ranging between 90 and 96%.

Keywords: aptamer sensor, graphene support, kanamycin residues detection, surface plasmon resonance spectroscopy, Raman spectroscopy

1. Introduction

Surface plasmon resonance (SPR)-based biosensors are valued in different fields such as medical diagnosis and analytical or biochemical monitorization for labeling-free and providing information on binding events in real-time monitoring methods [1–4]. SPR is an optical technique reporting an intensity change of the reflected light at a specific angle of incidence (resonance angle) at a receptor modified-metal surface caused by the alteration of the refractive index at proximity to this surface due to the analyte binding [5,6]. SPR sensing has been developed in the last years for timesaving, inexpensive, simple operation, and portable miniaturized devices [6,7]. Quantifying low molecular weight compounds makes this technique suitable for its application in broad areas such as clinical, pharmaceuticals, theranostics, environmental research, and food safety [3,8]. It is widely used in real sample analysis due to the lack of matrix effect susceptibility, making sample pretreatment unnecessary. However, the sensitivity of the SPR sensor is determined by the sensor surface, considering the transport and binding of small concentrations of the analyte or the surface available for analyte binding. Approaches based on

graphene coating of the gold substrate can improve the sensitivity and increase the immobilized molecule concentration [5].

Aptamers are short RNA or single-stranded DNA oligonucleotide sequences obtained by the in-vitro well-known selection process called SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment). Their interest as recognition elements has been raised as an alternative to antibodies due to their high affinity and selectivity to the target molecule with the advantages of chemical stability, easy synthesis and modification, high resistance against denaturation, and ability to bind many types of target molecules, including antibiotics. These advantages make them attractive in the field of analytical chemistry, giving a new approach to biosensors. These types have been called aptasensors and have been used to determine a wide range of analytes with SPR detection [7,9,10]. Different options to assemble aptamers on the gold surface have been studied. Thiol groups self-assemble to the gold surface via well-known and stable AuS-binding, so a thiol-modified aptamer can be developed [7,11,12]. Self-assembling via alkanethiols is known to form a too dense layer of aptamers, and the target cannot bind efficiently for steric hindrance and electrostatic reasons. This drawback can be overcome by diluting the aptamer-modified thiols with non-functionalized short-chain thiols at the surface, accompanied by an increase of non-specific binding. More advanced surface chemistry would enlarge the distance of the analyte to the surface. As sensitivity in SPR decays exponentially with distance, this is not favorable for reasons of decreased sensitivity. A feasible alternative is the use of graphene monolayers to anchor the aptamer to the surface.

Graphene is a 2D layered material of sp^2 hybridized carbon atoms with an increasing interest in the use of biosensors due to its properties, such as biocompatibility, high surface-to-volume ratio, π -stacking interactions, possible modifications, the presence of an intrinsic surface plasmon, and its hydrophobicity, which means there should be not much unspecific binding in

aqueous systems. Graphene layers can be obtained multiple ways from top-down starting from graphite, like reduced graphene oxide (rGO), or bottom-up methods, like chemical vapor deposition (CVD) metal substrates. The first one was fabricated by chemical exfoliation as a top-down approach from graphite, and the second one was grown on a copper substrate. The physical and chemical properties of the resulting nanomaterial differed according to the adapted method, observing materials with different flake sizes and a different number of layers [13].

The rGO synthesis is simple, cheap, and the material can be processed quickly by drop-casting. Nevertheless, the preparation is time-consuming and cannot result in a large area of a uniform graphene monolayer. Thus, the resulting quality layer was not so excellent to increase sensitivity due to the considerable inhomogeneity and lattice defects. On the other hand, CVD results in an almost perfect monolayer with numerous receptor places and better sensitivity [7,14e16]. Both types of graphene have been used in biosensors to determine different analytes with SPR [5,6,14,17]. However, only the rGO has been used for kanamycin determination with various detection methods [18,19].

Once the aptasensor has been developed, its usefulness has been demonstrated by applying it to the determination of kanamycin residues in food samples. Kanamycin is an aminoglycoside antibiotic widely used in treating Gram-positive and Gram-negative bacterial infections in human and veterinary medicine due to the interaction with ribosomal RNA interfering with the bacterial protein synthesis [20,21]. However, kanamycin residues can be found in animal-derived foods due to their overuse. Accumulative overdose of this antibiotic may cause several affections such as nephrotoxicity, auditive loss, allergic reactions, and antibiotic resistance [22]. Therefore, the European Union has fixed maximum residue limits (MRLs) for kanamycin in milk as 150 mg kg^{-1} , and highly sensitive, accurate, economical, and simple detection methods have to be established to determine this amount [23].

In this study, an SPR-based biosensor was developed and applied to determine kanamycin by demonstrating the benefits of using CVD graphene compared to rGO. The differences between the two graphene types and the homogeneity of the transfer process were characterized using Raman spectroscopy.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Kanamycin sulfate from streptomyces kanamyceticus, penicillin, streptomycin, 1-pyrenebutyric acid (PBA), 1-ethyl-3-(3-(dimethylamino) propyl)carbodiimide (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), and 16-mercaptohexadecanoic acid (MHA) were obtained from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany, www.sigmaaldrich.com). Other chemicals were obtained from VWR International (Darmstadt, Germany, www.de.vwr.com), and all chemicals used were of analytical grade. A solution containing 25 mmol L⁻¹ disodium hydrogen phosphate (Merck, Taufkirchen, Germany, www.sigmaaldrich.com), adjusted to a pH 7.4, was used as the buffer. Kanamycin aptamer (50eH2NeAGATGGGGGTTGAGGCT-30) was purchased from Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany, www.eurofinsgenomics.eu) which is synthesized using SELEX procedure [18,24]. The aptamer was functionalized with an amino group at the 5' terminal for immobilization on the graphene surface. Before being used, the aptamer was stored at 4 °C and in stock buffer (Eurofins Genomics, Germany) and was dissolved in the immobilization buffer containing 25 mmol L⁻¹ disodium hydrogen phosphate, 100 mmol L⁻¹ NaCl, and 4 mmol L⁻¹ EDTA (pH 7.4), previous to its use.

2.2. Materials and instruments

Glass slides (20 × 20) mm of F1-type with a refractive index of 1.61 covered with a continuous gold film of 45 nm thickness were purchased at Mivitec GmbH (Sinzing, Germany, www.mivitec.de). Samples of a chemical vapor deposited graphene monolayer (10 × 10) mm grown on an 18 mm thickness copper substrate coated with approximately 60 nm thickness of a polymethylmethacrylate layer (PMMA) Model 495K, A2, which was purchased from Graphenea (San Sebastián, Spain, www.graphenea.com).

All SPR experiments were carried out on a BioSuplar SPR instrument (Mivitec GmbH, Germany). The gold-coated glass slide was brought in optical contact with an index-matching fluid (Cargille®, Cargille Labs, Cedar Groove, NJ, www.cargille.com). The solutions entered the system through a four channels peristaltic pump IPC 4 (Ismatec, NeoLab, Heidelberg, Germany, www.ismatec.com). Raman spectroscopy measurements used to characterize the subsequent sensor surface modification stages were performed on a DXR Raman microscope (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Germany, www.thermofisher.com). The Raman microscopic mapping images were obtained with an MPlan N 100/0,90 BD objective (Olympus SE & Co. KG, Hamburg, Germany, www.olympus-europa.com).

2.3. Aptasensor fabrication

The aptasensor consisted of a glass slide covered with a thin gold layer and was functionalized with graphene to ensure the binding of the aptamer to the sensor surface. Two types of graphene were studied to carry out this binding, rGO, and CVD-graphene. Despite the graphene being directly deposited onto the sensor surface, a cleaning step must be introduced beforehand. The sensor surface formed by the gold-covered glass slides was thoroughly cleaned with ethanol and dried with a nitrogen stream.

The rGO was synthesized by a modified Hummers method and subsequent chemical reduction using hydrazine [25,26]. The gold-layer surface modification with rGO was developed by adapting a previously described method [27]. Gold surfaces were immersed in 16-mercaptohexadecanoic acid (MHA) before the rGO deposition to render the hydrophilic surface to improve their spreading adhesion to form a self-assembled monolayer (SAM) [28e30]. The slides have been immersed for a minimum of 20 h in an ethanolic solution of MHA (200 mmol L⁻¹). At ambient conditions, drop-casting of 50 mL rGO ($\beta = 250 \text{ mg mL}^{-1}$) dispersed in a 1:1 (v/v) water and isopropanol solution ensured a uniform film formation on top of the slides.

CVD-graphene was grown by the direct deposition of gaseous reactants onto a substrate surface (Graphenea, Spain). For the modification with a monolayer of CVD-graphene, a wet transfer method was used [5,16]. CVD-graphene, supported by a copper substrate and covered by protective polymethylmethacrylate (PMMA) layer (Graphenea, Spain), was floated for 30 min on the surface of a solution of 400 mmol L⁻¹ iron (III) chloride to etch the copper. After a thorough washing step, the CVD-PMMA-layer is deposited onto the slide, putting this one at the bottom of the solution and removing the solution to lower the film onto the gold slide. A thermal treatment consisted of heating at 70 °C in the air for 30 min flattened the CVD graphene film. The immersion of the slide into an acetone bath for 30 min is used to dissolve PMMA before the aptamer immobilization. The chips were rinsed with ethanol and dried with nitrogen.

Once the gold film was covered by graphene, the surface was modified with 1-pyrenebutyric acid (PBA) via p-stacking to ensure the covalent binding of the aptamer. PBA consists of a pyrene group molecule with p-electrons and a carboxylic group that can be used to facilitate further functionalization [15]. The graphene-modified slides were assembled into the flow system of the SPR instrument and treated with PBA. First, a 5 mmol L⁻¹ PBA solution in DMSO

was introduced into the system at a flow rate of 0.1 mL min^{-1} for 30 min. A carbodiimide coupling reaction ensured the binding of aptamers. EDC and NHS activated the carboxyl groups of PBA and facilitated an amide binding with the aptamer [31]. The buffer containing 50 mmol L^{-1} EDC and 50 mmol L^{-1} NHS was added at a flow rate of 0.2 mL min^{-1} for 10 min. The slide was incubated with 1 mmol L^{-1} antikanamycin aptamer dissolved in the immobilization buffer, containing 100 mmol L^{-1} NaCl and 4 mmol L^{-1} EDTA, for 30 min. Afterward, the slides were rinsed thoroughly with the buffer.

2.4. Aptasensor characterization

Besides the deposition of PBA, the quality of the deposited graphene films was monitored by Raman spectroscopy using a 532 nm laser excitation (10 mW) and with a 50 mm slit. SPR monitored the deposition of PBA and the aptamer. Changes in the intensity of reflected light were recorded at a fixed angle. An F1-65° glass prism was installed on a swiveling carriage. A flow cell with two channels was placed on the slide. One channel was used as a reference and the other one for the sample. Only the buffer, without analyte or surface modifiers, passed through the reference channel.

2.5. Kanamycin determination using the SPR based aptasensor

The determination of kanamycin is based on the affinity interaction between the analyte and the immobilized aptamer, which provides changes in the refractive index at the near-field surface monitored by an SPR detector. The SPR instrument includes two monitoring cells (reference and sample) that provide continuous monitoring of the refractive index variations at the same incidence angle close to the active sensor surface. The corrected baseline was obtained by subtracting the reference channel signal from the sample channel signal to eliminate small fluctuations in laser intensity or temperature variations. Any changes can be related only to the binding events at the sensor surface. The

determination of kanamycin through the affinity interaction to the immobilized aptamer was studied at a concentration range between 1 and 100 mmol L^{-1} prepared in phosphate buffer (25 mmol L^{-1} , pH 7.4) at room temperature.

The selectivity of the aptasensor has been tested using an aminoglycoside antibiotic (streptomycin) and others from another antibiotic family (penicillin). The cross-reactivity of these antibiotics was tested at two concentrations (50 and 100 mmol L^{-1}) of each potential interferent.

2.6. Application of the method

The developed aptasensor was applied to determine different kanamycin concentrations in commercial cow milk samples (1.5% fat content) provided from a local commercial market. No sample pre-treatment was required to obtain the measurements, and samples were directly measured with the developed aptasensor. No kanamycin residues were found in previous studies performed with these milk samples. Therefore, a standard addition method was carried out with milk samples directly spiked with solid kanamycin to obtain a recovery study. Different kanamycin amounts were directly added to the samples to obtain known analyte concentration levels in samples ranged from the lowest concentration in the dynamic range to the middle of this range (1, 10, and 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$). When their signal difference in RIU of each spiked sample was obtained regarding blank samples and the calibration graph, the added kanamycin concentration was calculated. The relation between the obtained and the known concentrations were necessary to obtain the recovery data.

3. Results and discussions

3.1. Aptasensor design and characterization

Several steps have been studied to obtain the best aptasensor signal. The first step is to functionalize the gold surface with both graphene types (rGO and CVD-graphene). **Figure 1** depicted the Raman spectroscopy characterization. As can be seen, three Raman bands at 1350 cm^{-1} (D-peak), 1600 cm^{-1} (G-peak), and 2690 cm^{-1} (2D-peak) were used to identify the graphene layers. Intensity ratios between the characteristic bands, such as I_D/I_G and I_{2D}/I_G ratios, were used to indicate the graphene deposition on the metal surface. The ratio $I_{2D}/I_G \approx 2$ reveals the monolayer CVD deposition, whereas the low intensity of the 2D-peak of rGO shows stacked multilayers of graphene. The constant I_D/I_G ratio indicated the homogeneous distribution of reduced graphene oxide along the surface. This result was also attributed to the slide modified by CVD, as demonstrated by a constant I_{2D}/I_G ratio for CVD graphene due to the absence of a D-peak in CVD. The I_D/I_G ratio provides information about the flake size and some defects, involving the I_{2D}/I_G ratio with the number of layers [32,33].

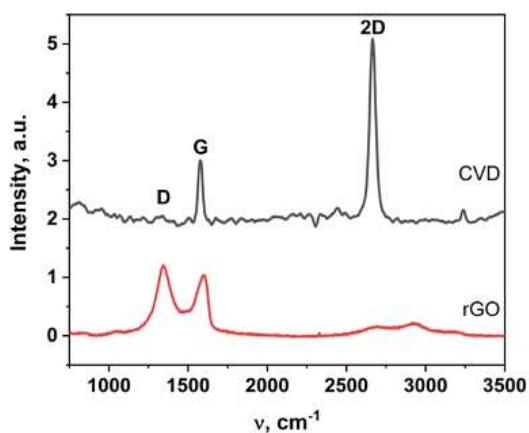


Figure 1. Raman spectra of CVD-graphene and rGO modified slides normalized to the G-peak.

In the case of rGO immobilization, different amounts of graphene were drop cast. The functionalized surfaces were analyzed using Raman microscopy (Figure 2). The microscopic image with a 2D-intensity map of a characteristic peak (G-peak) (Figure 2.a) shown qualitative information about the film homogeneity. The continuous red color of the images indicates no variations in the layer thickness of the rGO deposited. Spectra of rGO (Figure 2.b) showed quantitative results with the typical features: broad peaks and, most importantly, an I_D/I_G ratio that is slightly higher than 1 [34]. The optimization of the influence of the amount of graphene used to perform the rGO deposition was supported on the I_D/I_G ratios obtained, shown in Table 1. The best results were achieved using 50 μL of a solution of 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ rGO with 1:1 (v/v) isopropanol and water.

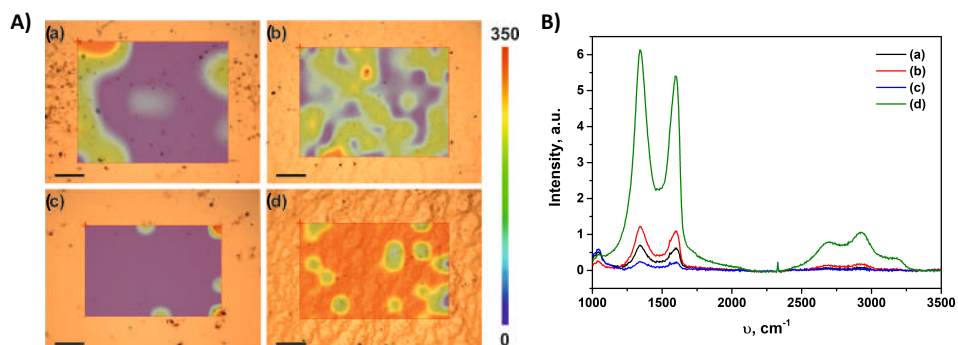


Figure 2. Microscopic image (A) and Raman spectra (B) of a gold slide modified with 100 μL rGO ($\beta = 62 \mu\text{g mL}^{-1}$) (a), 50 μL rGO ($\beta = 125 \mu\text{g mL}^{-1}$) (b), 30 μL rGO ($\beta = 250 \mu\text{g mL}^{-1}$) (c), and 50 μL rGO ($\beta = 250 \mu\text{g mL}^{-1}$) (d). A 2D intensity map of the G-peak is blended over the microscopic images. The scale bars are 100 μm .

Regarding the immobilization of CVD graphene, Table 1 summarizes the intensity ratios studied. The presence of a small single 2D-peak with around double the G-peak intensity and an I_D/I_G ratio in the range of 0.05 to 0.3 is typical for CVD-derived monolayer samples [35]. These results indicate the successful transfer of CVD graphene onto the substrates.

Table 1. I_D/I_G and I_{2D}/I_G ratios of each type of graphene used ($n = 3$, $r = 50$).

Type of graphene	Case number	I_D/I_G	I_{2D}/I_G
rGO			
100 μL ($\beta = 62.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) 1:4 (v/v) isopropanol and water	1	1.24 ± 0.28	0.39 ± 0.29
50 μL ($\beta = 125 \mu\text{g mL}^{-1}$) 1:2 (v/v) isopropanol and water	2	1.12 ± 0.05	0.15 ± 0.07
30 μL ($\beta = 250 \mu\text{g mL}^{-1}$) 1:1 (v/v) isopropanol and water	3	1.86 ± 0.51	0.67 ± 0.24
50 μL ($\beta = 250 \mu\text{g mL}^{-1}$) 1:1 (v/v) isopropanol and water	4	1.14 ± 0.02	0.13 ± 0.03
CVD		0.14 ± 0.04	2.19 ± 0.51

The consecutive functionalization steps were monitored via Raman spectroscopy and SPR spectroscopy, depicted in **Figures 3** and **4**. The graphene surface was modified using PBA via π -stacking interactions to facilitate the immobilization of the biorecognition molecules. PBA provided enough superficial acid groups on the modified graphene surface to facilitate the aptamer covalent bound through its amino-derived functionalization. As shown in **Figure 3**, a small peak near the D-peak (1230 cm^{-1}) appeared on Raman due to the PBA deposition (red line) and possible G-peak intensity changes due to multilayer conversions. The I_{2D}/I_G ratio decreases from 2.19 ± 0.51 to 1.42 ± 0.23 , keeping the I_D/I_G ratio constant in 0.18 ± 0.06 . The SPR signal change expressed as refractive index units (RIU) has been used to monitor the SPR measurements. As shown in **Figure 4.a**, a change of $4 \cdot 10^{-3}$ RIU with CVD-graphene and $2.5 \cdot 10^{-3}$ RIU with rGO was obtained due to the immobilization of PBA.

The surface was modified with an EDC-NHS solution to activate the carboxyl groups and ensure binding to primary amines and the efficient coupling to the aptamer. After this modification, the Raman spectra remained constant. However, as shown in **Figure 4.b**, the SPR signal changed to $2 \cdot 10^{-3}$ RIU using these EDC-NHS modified CVD-graphene surfaces and $1.6 \cdot 10^{-3}$ RIU EDC-

NHS rGO. The I_{2D}/I_G ratio decreases again (1.25 ± 0.36) after the coupling of the antikanamycin aptamer, keeping constant the ID/IG ratio (0.17 ± 0.09) (blue line in **Figure 3**). The refractive index changed to $1.8 \cdot 10^{-3}$ RIU for the CVD-graphene-based surface and $1.3 \cdot 10^{-3}$ RIU for the rGO-based (**Figure 4.b**). All this information suggests the successful modification of the graphene sensor with the biorecognition elements.

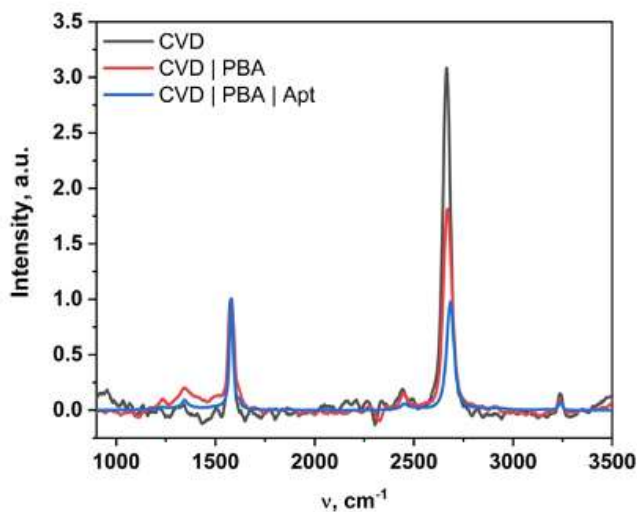


Figure 3. Raman spectra of CVD modified slides (black line), CVD treated with 1-pyrenebutyric acid (PBA) (red line), and a CVD-PBA modified slide after the aptamer immobilization (blue line).

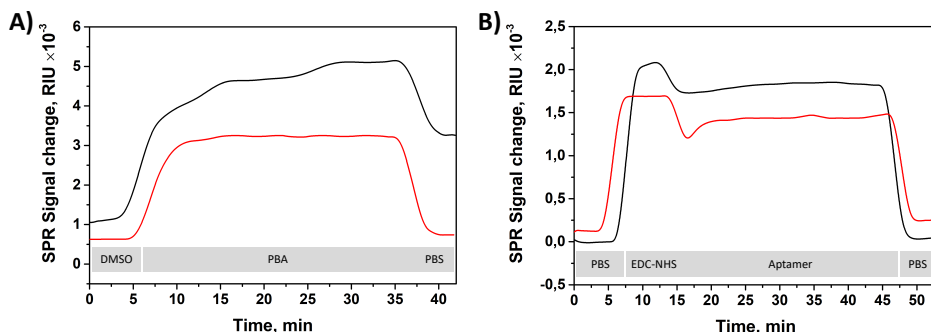


Figure 4. SPR characterization of the gold surface with CVD-graphene (black line) and rGO (red line) after the immobilization of PBA (A) and the aptamer solution, with a previous modification with an EDC-NHS solution (B).

3.2. Analytical features of the method

The calibration graphs of the method for determining kanamycin using the aptasensor under the optimum experimental conditions and monitoring the SPR signal expressed in RIU are shown in **Figure 5**. **Figure 5.a** shows the RIU change for different kanamycin concentrations obtained with deposited CVD-graphene-based aptasensor. The SPR signal increased after the kanamycin binding, providing the immobilization of the antibiotic via the interaction with the specific aptamer, as evidenced in the calibration graphs in **Figure 5.b**, where the difference between the signal obtained when no kanamycin was bound to the aptasensor and the signal provided by different kanamycin concentration solutions has been represented. A linear relationship was found within the concentration mentioned above range, relating the difference signal with the kanamycin concentration logarithm.

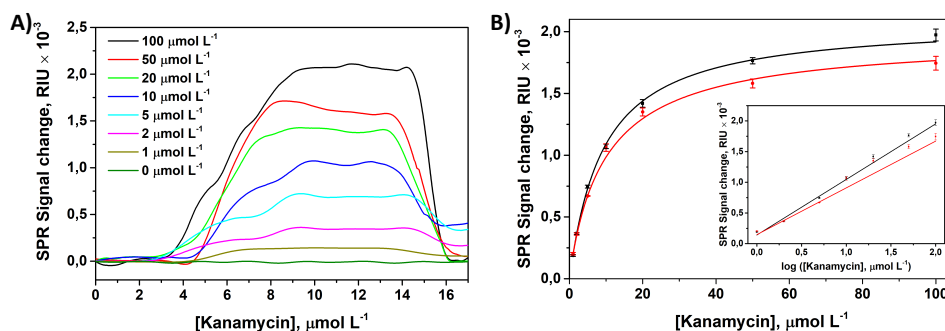


Figure 5. (A) Signal change in refractive index units (RIU) of aptasensor with CVD-graphene with different kanamycin concentrations. (B) The derived relationship between the signal change in RIU of the aptasensor using CVD-graphene (black line) or rGO (red line) and the concentration of kanamycin. The inset indicates the linear relationship between the signal change in RIU and the logarithm of the kanamycin concentration for both types of graphene.

Table 2 summarizes the features for the determination with rGO and CVD graphene, which include the equation parameters for the Hill relationship and the linearization of the representation, the dynamic range of the calibration

graph, the limit of detection (LOD), and the limit of quantification (LOQ) established according to IUPAC recommendations [36], and the precision of the method expressed as RSD% values. LOD and LOQ were calculated from the standard deviation of the blanks. A high number of blanks ($n = 28$) were measured, and calculated the corresponding concentration for each calibration graph. Once concentrations were calculated, the mean and the standard deviation of the blank were obtained. LOD was defined by the mean value plus three times the standard deviation of the blank, and LOQ was obtained as the mean value plus ten times the standard deviation of the blank. The sampling frequency under the working conditions was estimated as 6 h^{-1} .

As can be seen, the LOD using CVD-graphene is round $0.28 \mu\text{mol L}^{-1}$, which is 7-fold lower than obtained with rGO. The precision values were also better in the case of the CVD-graphene aptasensor. The selectivity was studied by assaying other antibiotics (streptomycin and penicillin) instead of kanamycin. The results showed in **Figure 6** revealed that the kanamycin signal difference was significantly higher than other antibiotics.

The developed method based on an aptasensor has been compared with other methods for kanamycin or other aminoglycoside antibiotics determination. Several methods for determining kanamycin based on aptasensors [12,37–39] or SPR detection [40] separately have been established. Even though combining both techniques in the same method has been reported for determining other analytes [41], this combination has not been used to date for determining kanamycin. The LOD was in the same order of magnitude [42] or higher [38] than other methods based on luminescence detection but lower than using other aptasensors [39]. Nevertheless, the proposed method showed advantages concerning portability, cost, and measurement time. Also, the use of aptamers interaction provided higher selectivity than others supported on chemical reactions.

Table 2. Analytical features of the method

Calibration graphs	rGO method		CVD-graphene method	
	Hill ^{a,b}	Linearization ^{a,c}	Hill ^{a,b}	Linearization ^{a,c}
Equation parameters	RIU _{max} = 1.9·10 ⁻³ (± 6.5·10 ⁻⁵) K _D = 9.1 (± 0.5) r ² = 0.997	a = 7.6·10 ⁻⁴ (± 5.8·10 ⁻⁵) b = 1.5·10 ⁻⁴ (± 3.9·10 ⁻⁵) r ² = 0.967	RIU _{max} = 2.1·10 ⁻³ (± 3.4·10 ⁻⁵) K _D = 9.6 (± 0.3) r ² = 0.998	a = 9.1·10 ⁻⁴ (± 5.1·10 ⁻⁵) b = 1.4·10 ⁻⁴ (± 2.8·10 ⁻⁵) r ² = 0.982
LOD, μmol L ⁻¹	1.79	1.53	0.28	0.81
LOQ, μmol L ⁻¹	5.88	3.46	0.92	1.06
Linear range, μmol L ⁻¹ (n = 7, r = 4)	5.88 – 100 ^d	3.46 – 100	1 – 100 ^d	1 – 100
RSD, % (r = 4)				
1 μmol L ⁻¹	4.55		3.89	
50 μmol L ⁻¹	1.26		1.49	

^a y = signal difference in refractive index units (ΔRIU); x = kanamycin concentration (μmol L⁻¹)

^b Hill equation: $y = \text{RIU}_{\text{max}} \cdot x / (\text{K}_D + x)$

^c Linearization of the representation: $y = a \cdot \log x + b$

^d Dynamic range for the Hill relationship

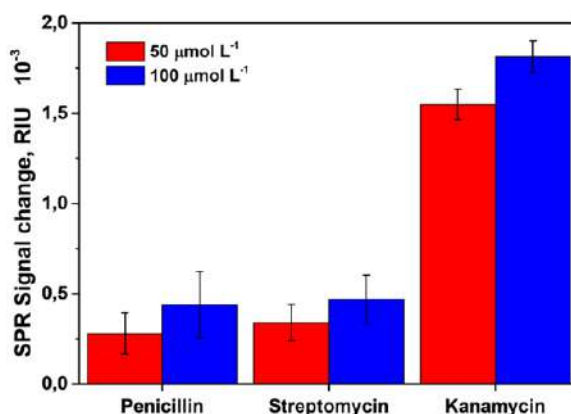


Figure 6. Signal change in RIU for penicillin, streptomycin, and kanamycin at two concentration levels: 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (red columns) and 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (blue columns).

3.3. Application of the method

The developed aptasensor was applied to determine different kanamycin concentrations in commercial cow milk samples (1.5% fat content) from a local commercial market. No SPR signal response corresponding to kanamycin was observed when the milk samples were analyzed; thus, different kanamycin concentrations (1, 10, and 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) were directly added to the samples to carry out the standard addition method. A recovery study was carried out by adding kanamycin to reach three milk sample concentrations, obtaining their signal difference in RIU regarding blank samples. Taking into account the calibration graph, this difference was related to the added kanamycin concentration. Known the added concentration, the recovery values were calculated. As can be seen in **Table 3**, the recovery values obtained were $96.24 \pm 7.55 \%$, $97.85 \pm 5.91 \%$, and $94.53 \pm 2.72 \%$, respectively for 1, 10, and 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ kanamycin concentrations.

Table 3. Application of the method to the determination of kanamycin in milk

Added, $\mu\text{mol L}^{-1}$	RIU signal ^a	Found $\mu\text{mol L}^{-1}$ ^a	Recovery ^a , %	RSD, % (n = 3)
1	$1.91 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 1.44 \cdot 10^{-5}$)	0.96	96.24	7.55
10	$1.06 \cdot 10^{-3}$ ($\pm 9.52 \cdot 10^{-5}$)	9.78	97.85	5.91
50	$1.75 \cdot 10^{-3}$ ($\pm 4.71 \cdot 10^{-5}$)	45.06	94.53	2.72

^a Mean value of three experiments

4. Conclusions

The development of SPR substrates based on graphene modified with aptamers has been carried out in this research and was applied to the determination of kanamycin residues. Comparing both types of graphene studied, rGO and CVD, the last one shows more homogeneous and reproducible graphene films, leading to a better immobilization of aptamers. Within SPR measurements, the highest surface sensitivity was achieved for those modified with CVD graphene, resulting in a 7-fold lower LOD for the kanamycin detection. Therefore, PBA can be attached to the 2D carbon nanomaterial via π -stacking and subsequently modified by the aptamer, leading to a universal approach for selective (bio)analysis. This feature represents an advantage in developing selective methods because just by changing the immobilized aptamer, the method can be adjusted to determine another analyte. The method has several advantages, such as portability, speed of measurement, and low cost. The applicability of the method was demonstrated by the determination of one aminoglycoside antibiotic in milk samples. Even though the sensibility of the method and the values of LOD and LOQ can be improved to reach the values obtained with other techniques, the selectivity of the method was significant due to the high affinity and sensibility of aptamers for the target molecule.

CRedit authorship contribution statement

Ángela Écija-Arenas: Conceptualization, Data curation, Writing – original draft, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing e review & editing, Visualization. **Eva-Maria Kirchner:** Data curation, Resources, Supervision, Methodology, Writing – review& editing, Visualization. **Thomas Hirsch:** Conceptualization, Resources, Supervision, Methodology, Writing – review & editing, Project administration, Funding acquisition. **Juan Manuel Fernández-Romero:** Writing – review & editing, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgement

This study is supported by the Operative Framework Funding FEDER-Andalucía 2014-2020 Program (ref. UCO-1263679). Á. Écija-Arenas thanks to the IDEP-UCO for the International Mobility Grant provided for her stay at the University of Regensburg.

References

- [1] Z. Li, L. Leustean, F. Inci, M. Zheng, U. Demirci, S. Wang, Plasmonic-based platforms for diagnosis of infectious diseases at the point-of-care, *Biotechnol. Adv.* 37 (2019) 107440. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107440>.

- [2] M.M. Moussilli, A.R. El Falou, R.M. Shubair, Overview of fiber optic surface plasmon resonance biosensors for medical applications, Proc. - ANTEM 2018 2018 18th Int. Symp. Antenna Technol. Appl. Electromagn. 2018-Augus (2018) 12–13. <https://doi.org/10.1109/ANTEM.2018.8572836>.
- [3] A. Jebelli, F. Oroojalian, F. Fathi, A. Mokhtarzadeh, M. de la Guardia, Recent advances in surface plasmon resonance biosensors for microRNAs detection, Biosens. Bioelectron. 169 (2020) 112599. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112599>.
- [4] M. Bocková, T. Špringer, I. Nečasová, J. Nunvar, B. Schneider, J. Homola, Monitoring RAYT activity by surface plasmon resonance biosensor, Anal. Bioanal. Chem. 407 (2015) 3985–3993. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8491-y>.
- [5] C. Genslein, P. Hausler, E.-M. Kirchner, R. Bierl, A.J. Baeumner, T. Hirsch, Detection of small molecules with surface plasmon resonance by synergistic plasmonic effects of nanostructured surfaces and graphene, in: Plasmon. Biol. Med. XIV, 2017: p. 100800F. <https://doi.org/10.1117/12.2252256>.
- [6] N.A.S. Omar, Y.W. Fen, S. Saleviter, W.M.E.M.M. Daniyal, N.A.A. Anas, N.S.M. Ramdzan, M.D.A. Roshidi, Development of a graphene-based surface plasmon resonance optical sensor chip for potential biomedical application, Materials (Basel). 12 (2019). <https://doi.org/10.3390/ma12121928>.
- [7] A. Blidar, B. Feier, M. Tertis, R. Galatus, C. Cristea, Electrochemical surface plasmon resonance (EC-SPR) aptasensor for ampicillin detection, Anal. Bioanal. Chem. 411 (2019) 1053–1065. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1533-5>.

- [8] J.F. Masson, Surface Plasmon Resonance Clinical Biosensors for Medical Diagnostics, *ACS Sensors*. 2 (2017) 16–30. <https://doi.org/10.1021/acssensors.6b00763>.
- [9] W.W. Wang, X. Han, L.Q. Chu, Polyadenine-mediated immobilization of aptamers on a gold substrate for the direct detection of bacterial pathogens, *Anal. Sci.* 35 (2019) 967–972. <https://doi.org/10.2116/analsci.19P110>.
- [10] W. Wu, Z. Zhu, B. Li, Z. Liu, L. Jia, L. Zuo, L. Chen, Z. Zhu, G. Shan, S.Z. Luo, A direct determination of AFBs in vinegar by aptamer-based surface plasmon resonance biosensor, *Toxicol.* 146 (2018) 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2018.03.006>.
- [11] Y.S. Kim, J.H. Niazi, M.B. Gu, Specific detection of oxytetracycline using DNA aptamer-immobilized interdigitated array electrode chip, *Anal. Chim. Acta.* 634 (2009) 250–254. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.12.025>.
- [12] H.Y. Song, T.F. Kang, N.N. Li, L.P. Lu, S.Y. Cheng, Highly sensitive voltammetric determination of kanamycin based on aptamer sensor for signal amplification, *Anal. Methods*. 8 (2016) 3366–3372. <https://doi.org/10.1039/c6ay00152a>.
- [13] E.M. Kirchner, T. Hirsch, Recent developments in carbon-based two-dimensional materials: synthesis and modification aspects for electrochemical sensors, *Microchim. Acta.* 187 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00604-020-04415-3>.
- [14] S. Szunerits, N. Maalouli, E. Wijaya, J.P. Vilcot, R. Boukherroub, Recent advances in the development of graphene-based surface plasmon resonance (SPR) interfaces, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 1435–1443. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6624-0>.

- [15] M. Hinnemo, J. Zhao, P. Ahlberg, C. Hägglund, V. Djurberg, R.H. Scheicher, S.L. Zhang, Z. Bin Zhang, On Monolayer Formation of Pyrenebutyric Acid on Graphene, *Langmuir*. 33 (2017) 3588–3593. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b04237>.
- [16] J.W. Suk, A. Kitt, C.W. Magnuson, Y. Hao, S. Ahmed, J. An, A.K. Swan, B.B. Goldberg, R.S. Ruoff, Transfer of CVD-grown monolayer graphene onto arbitrary substrates, *ACS Nano*. 5 (2011) 6916–6924. <https://doi.org/10.1021/nn201207c>.
- [17] N.F. Chiu, C.T. Kuo, C.Y. Chen, High-affinity carboxyl-graphene oxide-based SPR aptasensor for the detection of hCG protein in clinical serum samples, *Int. J. Nanomedicine*. 14 (2019) 4833–4847. <https://doi.org/10.2147/IJN.S208292>.
- [18] N.R. Ha, I.P. Jung, I.J. La, H.S. Jung, M.Y. Yoon, Ultra-sensitive detection of kanamycin for food safety using a reduced graphene oxide-based fluorescent aptasensor, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep40305>.
- [19] R. Li, Y. Liu, L. Cheng, C. Yang, J. Zhang, Photoelectrochemical aptasensing of kanamycin using visible light-activated carbon nitride and graphene oxide nanocomposites, *Anal. Chem.* 86 (2014) 9372–9375. <https://doi.org/10.1021/ac502616n>.
- [20] N. Isoherranen, S. Soback, Chromatographic methods for analysis of aminoglycoside antibiotics, *J. AOAC Int.* 82 (1999) 1017–1045. <https://doi.org/10.1093/jaoac/82.5.1017>.
- [21] L.S. Khabbaz, M. Hassanzadeh-Khayyat, P. Zaree, M. Ramezani, K. Abnous, S.M. Taghdisi, Detection of kanamycin by using an aptamer-based biosensor using silica nanoparticles, *Anal. Methods*. 7 (2015) 8611–8616. <https://doi.org/10.1039/c5ay01807b>.

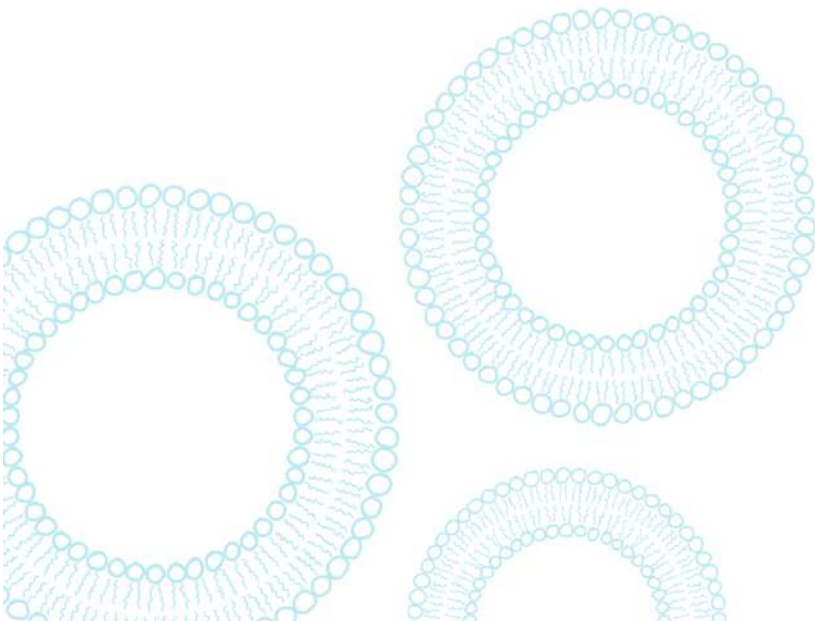
- [22] N. Zhou, J. Zhang, Y. Tian, Aptamer-based spectrophotometric detection of kanamycin in milk, *Anal. Methods*. 6 (2014) 1569–1574. <https://doi.org/10.1039/c3ay41816b>.
- [23] Commission Regulation (EC) No 324/2004 of 25 February 2004 amending Annex I to Council Regulation (EEC) No 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal or, 2004.
- [24] K.M. Song, M. Cho, H. Jo, K. Min, S.H. Jeon, T. Kim, M.S. Han, J.K. Ku, C. Ban, Gold nanoparticle-based colorimetric detection of kanamycin using a DNA aptamer, *Anal. Biochem.* 415 (2011) 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.04.007>.
- [25] W.S. Hummers, R.E. Offeman, Preparation of Graphitic Oxide, *J. Am. Chem. Soc.* 80 (1958) 1339. <https://doi.org/10.1021/ja01539a017>.
- [26] A. Zöpfl, M.M. Lemberger, M. König, G. Ruhl, F.M. Matysik, T. Hirsch, Reduced graphene oxide and graphene composite materials for improved gas sensing at low temperature, *Faraday Discuss.* 173 (2014) 403–414. <https://doi.org/10.1039/c4fd00086b>.
- [27] C. Genslein, P. Hausler, E.M. Kirchner, R. Bierl, A.J. Baeumner, T. Hirsch, Graphene-enhanced plasmonic nanohole arrays for environmental sensing in aqueous samples, *Beilstein J. Nanotechnol.* 7 (2016) 1564–1573. <https://doi.org/10.3762/bjnano.7.150>.
- [28] G. Yan, Y. Wang, X. He, K. Wang, J. Liu, Y. Du, A highly sensitive label-free electrochemical aptasensor for interferon-gamma detection based on graphene controlled assembly and nuclease cleavage-assisted target recycling amplification, *Biosens. Bioelectron.* 44 (2013) 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.01.010>.

- [29] C. Fenzl, C. Genslein, C. Domonkos, K.A. Edwards, T. Hirsch, A.J. Baeumner, Investigating non-specific binding to chemically engineered sensor surfaces using liposomes as models, *Analyst*. 141 (2016) 5265–5273. <https://doi.org/10.1039/c6an00820h>.
- [30] A.T. Reiner, N.G. Ferrer, P. Venugopalan, R.C. Lai, S.K. Lim, J. Dostálek, Magnetic nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance biosensor for extracellular vesicle analysis, *Analyst*. 142 (2017) 3913–3921. <https://doi.org/10.1039/c7an00469a>.
- [31] C. Fenzl, P. Nayak, T. Hirsch, O.S. Wolfbeis, H.N. Alshareef, A.J. Baeumner, Laser-Scribed Graphene Electrodes for Aptamer-Based Biosensing, *ACS Sensors*. 2 (2017) 616–620. <https://doi.org/10.1021/acssensors.7b00066>.
- [32] A.C. Ferrari, J.C. Meyer, V. Scardaci, C. Casiraghi, M. Lazzeri, F. Mauri, S. Piscanec, D. Jiang, K.S. Novoselov, S. Roth, A.K. Geim, Raman spectrum of graphene and graphene layers, *Phys. Rev. Lett.* 97 (2006) 1–4. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.97.187401>.
- [33] C. Backes, K.R. Paton, D. Hanlon, S. Yuan, M.I. Katsnelson, J. Houston, R.J. Smith, D. McCloskey, J.F. Donegan, J.N. Coleman, Spectroscopic metrics allow in situ measurement of mean size and thickness of liquid-exfoliated few-layer graphene nanosheets, *Nanoscale*. 8 (2016) 4311–4323. <https://doi.org/10.1039/c5nr08047a>.
- [34] I.K. Moon, J. Lee, R.S. Ruoff, H. Lee, Reduced graphene oxide by chemical graphitization, *Nat. Commun.* 1 (2010). <https://doi.org/10.1038/ncomms1067>.
- [35] L.M. Malard, M.A. Pimenta, G. Dresselhaus, M.S. Dresselhaus, Raman spectroscopy in graphene, *Phys. Rep.* 473 (2009) 51–87. <https://doi.org/10.1016/j.physrep.2009.02.003>.

- [36] G.L. Long, J.D. Winefordner, Limit of Detection: A Closer Look at the IUPAC Definition, *Anal. Chem.* 55 (1983) 712A-724A. <https://doi.org/10.1021/ac00258a001>.
- [37] R.Y. Robati, A. Arab, M. Ramezani, F.A. Langroodi, K. Abnous, S.M. Taghdisi, Aptasensors for quantitative detection of kanamycin, *Biosens. Bioelectron.* 82 (2016) 162–172. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.04.011>.
- [38] C. Liu, C. Lu, Z. Tang, X. Chen, G. Wang, F. Sun, Aptamer-functionalized magnetic nanoparticles for simultaneous fluorometric determination of oxytetracycline and kanamycin, *Microchim. Acta.* 182 (2015) 2567–2575. <https://doi.org/10.1007/s00604-015-1628-z>.
- [39] X. Bai, H. Hou, B. Zhang, J. Tang, Label-free detection of kanamycin using aptamer-based cantilever array sensor, *Biosens. Bioelectron.* 56 (2014) 112–116. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.12.068>.
- [40] L. Zhang, C. Zhu, C. Chen, S. Zhu, J. Zhou, M. Wang, P. Shang, Determination of kanamycin using a molecularly imprinted SPR sensor, *Food Chem.* 266 (2018) 170–174. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.128>.
- [41] J. Ashley, S.F.Y. Li, An aptamer based surface plasmon resonance biosensor for the detection of bovine catalase in milk, *Biosens. Bioelectron.* 48 (2013) 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.04.009>.
- [42] Y. Zhang, P. Zuo, B.C. Ye, A low-cost and simple paper-based microfluidic device for simultaneous multiplex determination of different types of chemical contaminants in food, *Biosens. Bioelectron.* 68 (2015) 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.12.042>.

CAPÍTULO III.2

Usefulness of hybrid magnetoliposomes for the determination of aminoglycoside residues in food using an integrated microfluidic system with fluorometric detection



Usefulness of hybrid magnetoliposomes for the determination of aminoglycoside residues in food using an integrated microfluidic system with fluorometric detection

Accepted for publication in Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2021

Ángela Écija-Arenas, Vanesa Román-Pizarro, Juan Manuel Fernández-Romero

Departamento de Química Analítica, Instituto Universitario de Investigación en Química Fina y Nanoquímica (IUNAN), Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Anexo "Marie Curie", E-14071 Córdoba, España

Abstract

A new microfluidic approach using hybrid magnetoliposomes (h-MLs) containing hydrophobic magnetic NPs ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs-C12SH}$) and N-acetylcysteine encapsulated has been developed in this research for the determination of aminoglycoside antibiotic (AAG) residues in food samples using o-phthalaldehyde. Four AAGs, kanamycin, streptomycin, gentamicin, and neomycin, have been used as model analytes. The h-MLs have been used for reagent preconcentration and were retained using an external electromagnet device in the reaction/detection zone in a microfluidic system, inserted into the sample chamber of a conventional fluorimeter. The formation of a fluorescent isoindole derivate caused an increase in the luminescence signal proportional to the analyte concentration. The dynamic range of the calibration graph was 0.1-1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, expressed as AAG concentration, with a limit of detection of 8.7 nmol L^{-1} for kanamycin and a sampling frequency of 8 h^{-1} . The method was applied to determining AAGs residues in milk and meat samples with recovery values between 87.2 and 107.4%

Keywords: hybrid magnetoliposomes; microfluidic system; aminoglycoside antibiotic detection; spectrofluorometric

Introduction

The development of analytical methods using microfluidic systems has grown in the last years due to their system miniaturization characteristics, such as decreasing the reagent and sample volumes, decreasing the analysis time, or increasing portability. Microfluidic systems allow the integration of several stages of the analytical process. The maximum level of integration is the total microanalysis systems (μ TAS) of “Lab-On-A-Chip” systems.¹⁻³

The evolution of these embedded systems passes through integrating different stages, such as the detection stage. Different platforms have been used to integrate this step, based on an “on-chip” or “off-chip” coupling. “On-chip” coupling was supposed to a high cost with a high level of the development process. Inside the “off-chip” coupling, several approaches have been described. Using bifurcated optical fiber guides or x-y-z alignment devices to place the microfluidic chip involved studying a high number of variables, apart from the requirement of voluminous and costly equipment for the coupling.^{4,5} An alternative is an “off-chip” option involving integrating the microfluidic chip focused on the optical pathway of a conventional detector thanks to 3D printed alignment devices.⁶

The integration of sensing zones in the microfluidic system improved the sensitivity, selectivity, accuracy, and reliability of miniaturized biosensing systems. This integration has been one of the most critical tasks for the development of μ TAS. For this purpose, the use of materials with magnetic properties to be retained in the reaction/detection zone of the microfluidic system has increased, such as materials deposited, aptamers, or enzymes

immobilized in magnetic nanoparticles or magnetoliposomes with encapsulated reagents.

Regarding magnetoliposomes (MLs), they were a type of hybrid liposome loaded with magnetic nanoparticles. Liposomes were self-assembled bilayer vesicles formed by phospholipids and cholesterol, which were amphiphilic molecules that entrapped several compounds in different parts due to their nature. Hybrid MLs (h-MLs) can be used as analytical tools as microcontainers in which the entrapped reagents were protected and transported to the in-situ reaction/detection zone to start the reaction. The analytical usefulness of h-MLs as amplification systems has been shown to determine several compounds in foods.⁷⁻⁹

The proposed analytical method has been described to determine aminoglycoside antibiotic (AAG) residues in food samples. **Figure 1** shows the chemical structures of the four AAGs assayed in this study, kanamycin, streptomycin, gentamicin, and neomycin. Their antibacterial properties lied in their irreversible binding to the bacterial ribosomes. These compounds were highly polar and water-soluble, but they induced membrane disorder in liposomes due to their strong binding ability to phospholipids phosphate groups.¹⁰⁻¹² Liposome disruption to release the encapsulated reagents was done mainly by changes in membrane structure, surfactants, or pH changes. The fact that AAGs bound to the phosphate group of liposomes caused their disruption, releasing the encapsulated reagent, joined to the fact that the pH in which the reaction took place caused the liposome lysis, was helpful in the development of the analytical method.

In recent years, AAGs have been studied, and their use in veterinary medicine has been regulated due to the severe adverse effects in humans caused by their misuse and overdose, such as oto- and neurotoxicity, antibiotic resistance, and allergic reactions. Since residual AAGs can be found in animal-

derived foods, the European Union has established maximum residue limits (MLRs) for these drugs; as shown in **Table 1**.¹³ Several methods have been described to determine AAGs in food, mainly using chromatography, capillary electrophoresis, and immunoassay.^{14–18} However, there are few methods using flow or microflow techniques.^{4,19–22} Fluorimetry is frequently used as a detection method, but these compounds do not present native fluorescence. Diverse derivative reagents have been used for this purpose.²³ The most common derivative reagents used in AAGs are a mixture of a compound with a carboxyl group, such as o-phthalaldehyde (OPA), together with a compound with a sulfhydryl group, such as N-acetylcysteine (NAC).

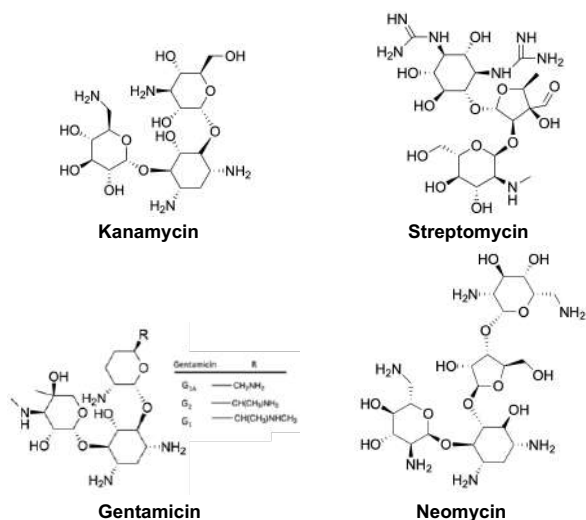


Figure 1. Chemical structures of the aminoglycoside antibiotics assayed.

The method presented is based on the formation of a fluorescent derivate between OPA, NAC, and the AAG in the sensing detection zone, to form an integrated platform based on a microfluidic system fluorometric detection.

Table 1. MRL of aminoglycoside antibiotics assayed in the studied animal-derived foods¹³

Antibiotic	Food origin (animal species)	MRL, $\mu\text{g kg}^{-1}$	Target
Kanamycin	All producing species	150	Milk
		100	Muscle
Streptomycin	Bovine	200	Milk
	Porcine	500	Muscle
Gentamicin	Bovine	100	Milk
	Porcine	50	Muscle
Neomycin	All producing species	1500	Milk
		500	Muscle

Experimental

Reagents and solutions. All chemicals used were of analytical grade. 1,2-Diacylsn-glycerol-3-phosphatidylcholine (DSPC), 3-sn-phosphatidylethanolamine (DOPE), (type II-S from sheep brain), cholesterol (CH), tetrachloroauric acid (HAuCl_4) trihydrate, 1-dodecylthiol (C_{12}SH), boric acid, N-acetyl-L-cysteine (NAC), o-phthalaldehyde (OPA), kanamycin sulfate, streptomycin sulfate, gentamicin sulfate, and neomycin trisulfate and methanol were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany, www.sigmaaldrich.com). Iron (III) chloride and chloroform were purchased from Panreac (Montplet and Esteban SA, Barcelona-Madrid, www.panreac.es). Iron (II) chloride, disodium hydrogen phosphate, hydrochloric acid, and sodium hydroxide were purchased from Merck (Darmstadt, Germany, www.merckgroup.com). All solutions were prepared using deionized water purified with a Milli-Q system (Millipore S.A.S., Molsheim, France, www.millipore.com). The pH of the reaction was adjusted to 9.5, with a buffer containing 50 mmol L^{-1} boric acid.

Apparatus and instruments. The measures were carried out in a Horiba Scientific Fluorolog-3P spectrofluorimeter (Horiba Scientific, France,

www.horiba.com/scientific/). This spectrofluorimeter was equipped with two signal acquisition modes according to the type of sample used. When using a microfluidic system placed at the optical pathway of the spectrofluorimeter, the front-face operation mode acquired the emission signal with an angle of 22.5° concerning the excitation beam is recommended, which was adequate to measure with special optical cuvettes or solid-samples. All measurements were performed using FluoroScan application software (Horiba Scientific) compatible with Origin, Software for OriginPro 9.1.0 (OriginLab Co. 2013, Northampton, MA, USA). The flow was driven to the detector through the microfluidic reactor using a KDS220 syringe pump (KD Scientific Inc., MA, USA, www.kdscientific.com). A glass microreactor model FC_R150.676.2 with 12×24 mm dimensions and an internal volume of $13 \mu\text{L}$ was assembled to a fluidic chip holder (FC-PRO-CH4515) (Micronit, The Netherlands, www.micronit.com). The beam was reduced with a pinhole located at $9 \mu\text{L}$ from the merging zone. Two Cheminert VA-CN2 injection valves (Valco, Teknokroma, Barcelona, Spain, www.teknokroma.es) were used to inject the h-MLs, sample, and reagents solution.

A Büchi rotavapor R-205 (Flawil, Switzerland, www.buchi.com) was used to evaporate the organic solvent to form the h-MLs. A VorTemp 56 LA-S2056 shaking incubator (Labnet International, Woodbridge, NJ, USA) and an ultrasound bath were used. An MPW-350R centrifuge (MPW Med. Instrument, Warsaw, Poland, <http://www.mpw.pl>) with a cooling chamber of rotating, equipped with an angle rotor HSL-11199 (45° , $12 \times 2.2/1.5$ mL, max. speed = 18,000 rpm, 24,088 RCF, and $r_{\text{max}} = 6.65$ cm) was used for the MDGC separation of h-MLs. Transmission electron microscopy (TEM) images for h-MLs characterization were obtained using a CM-10 Philips microscope (Philips Research, Eindhoven, The Netherlands; <http://www.research.philips.com>) with $0.5 \text{ \AA} \sim 0.34$ nm resolution and equipped with a digital megaview III camera. Copper grids (200C-FC) coated with a Formvar carbon film 200 mesh supplied

by Aname (Madrid, Spain; <http://www.aname.es>) were used as support in TEM experiments.

Synthesis of hybrid magnetoliposomes. The synthesis of h-MLs involved incorporating the structure of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@AuNPs-C12SH}$ and the encapsulation of NAC, which is required to obtain the analytical signal inside them. The NAC encapsulation in liposomes has been demonstrated previously.²⁴⁻²⁶ The h-MLs were carried out for the magnetic retention in the reaction/ detection zone. Hydrophobic magnetic-gold nanoparticles ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@AuNPs-C12SH}$) were obtained using a procedure previously described, in which the first step was the synthesis of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ by the co-precipitation method, and then the nanoparticles were coated with gold nanoparticles, and their surface was coated with C12SH.²⁷ Briefly, 25 mL of an aqueous solution containing 0,4 mol L⁻¹ iron (III) chloride, 0,4 mol L⁻¹ iron (II) chloride, and 40 mmol L⁻¹ hydrochloric acid was dropwise added into 250 mL of 1.5 mol L⁻¹ sodium hydroxide solution under vigorous stirring using a non-magnetic stirrer. Black-brown $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ were immediately formed, separated using a commercial neodymium magnet (NdFeB), and washed 3-times with deionized water. The NPs were collected by centrifugation at 17920×g for 15 min and dispersed again in 100 mL deionized water. Then, 0.75 mL of this solution were added to a solution containing 2.5 mL of $\text{HAuCl}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (2 mg mL⁻¹) in 22.5 mL of deionized water, which was previously heated to boiling for 40 min, followed by the addition of 0.5 mL of sodium citrate (500 mmol L⁻¹) and 5 mL of C12SH. The mixture was vigorously mixed and boiled under stirring for 15 min. The color of the solution gradually changed from brown to burgundy.

The rapid solvent evaporation (RSE) method was used to synthesized h-MLs containing $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@AuNPs-C12SH}$ and NAC.[49] Briefly, 100 μL of a lipid mixture containing DSPC, DOPE, and CH (75:12.5:12.5) was diluted to 1 mL with a chloroform/methanol (880:120) mixture and was put into a 50 mL round-bottom flask. Then, a mixture containing 0.25 mL of about 20 mg mL⁻¹

Fe₃O₄@AuNPs-C12SH suspension, 2 mL of 10 mmol L⁻¹ NAC solution, and 7.75 mL of phosphate buffer (10 mmol L⁻¹, pH 7.4) was carefully added along the flask wall. The organic solvent was removed in the rotary evaporator at 40 °C and 300 rpm under vacuum pressure. After 20 min, a pale brown opalescent fluid was obtained, which contained a wide variety of liposomes. The liposome population size was homogenized by sonication for 10 min, stopping each 2 min for 10 s.

The separation of filled h-MLs from empty liposomes, untrapped NPs, and other residues was carried out using the MDGC system.[160] A sucrose gradient (10, 20, 30, 40, 50, 55, and 100 %) with ficoll (30 %) and percoll (15 %) was performed by centrifugation at a relative centrifuge force (RCF) value of 4480×g for 30 min. Then, 500 μL of h-MLs synthesized were added and centrifugated at an RCF of 2520×g for 20 min. The h-MLs with encapsulated NAC were located in the intermediate layers and were collected and washed four times with 100 mL of 10 mmol L⁻¹ phosphate buffer (pH 7.4) to eliminate residues from layer components. These liposomes were stable for at least 30 days, maintaining them refrigerated at 4 °C until use.

Microfluidic system. Figure 2 depicts a scheme of the microfluidic system used, which was integrated by the microfluidic device with the magnet device in the optical luminescence detector. It was composed of the fluidic propel pumps, the injection valves, and the microfluidic platform, which was integrated by the chip-holder microfluidic devices with the microchip, the electromagnet, and the optical system. The fluidic propel pumps consisted of a syringe-driven system (SDS), which propelled all solutions from four 5 mL syringes (Terumo, Madrid, Spain, www.terumo.es), at a flow rate of 25 μL min⁻¹. Polytetrafluoroethylene (PTFE) tubes (i.d. 0.25 mm) connected the different parts of the microfluidic system. Injection valves had loops of 150 and 50 μL to introduce h-MLs and reagent and analyte solution, respectively. The integration of the microfluidic

platform into a conventional spectrofluorimeter was performed as previous works,⁶ including the microfluidic device into the sample chamber through a "lab-built" 3D-printing alignment device to obtain the correct alignment of the microfluidic chip observation zone with the optical pathway of the spectrofluorimeter detector, performed at the front-face acquisition mode. This observation zone consisted of a "pinhole" located at 9 μL from the merging zone to observe the provided signal, which was enough to eliminate the laminar regime and facilitate diffusion between both fluids. The electromagnet device for the magnetic retention of h-MLs was coupled on the back of the "pinhole".

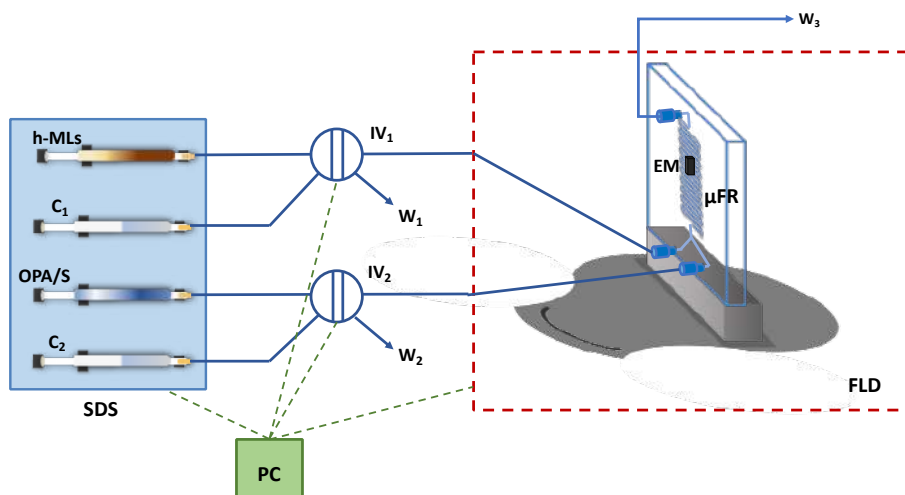


Figure 2. Scheme of the microfluidic system. h-MLs: denotes liposome suspension with NAC, C_1 : carrier solution to introduce h-MLs (phosphate buffer), OPA/S: OPA 2 mmol L^{-1} solution with AAG standards or sample solutions, C_2 : carrier solution to introduce reagents (borate buffer), SDS: syringe driven system, IV_1 and IV_2 : injection valves, W_1 , W_2 , and W_3 : wastes, μFR : microfluidic reactor, EM: electromagnet device, FLD: fluorimetric detector, PC: computer control device and interfaces.

Procedure for the AG antibiotics determination. The developed microfluidic system allows the preconcentration of h-MLs with NAC in the reaction zone using electromagnetic retention to minimize the reaction bolus dispersion, providing an effective reagents/analyte mixture in the observation zone of the microfluidic chip. A scheme of the potential reaction mechanism for the

determination of AAGs with the microfluidic system is shown in **Figure 3**. First, a suspension of h-MLs containing 2 mmol L⁻¹ NAC, prepared in phosphate buffer (10 mmol L⁻¹, pH 7.4) was injected through the injection valve IV₁ and retained immediately before the pinhole, using an external electromagnet device, for a time (retention time, Δt₁) of 300 s. A solution containing OPA (2 mmol L⁻¹) and the AAG standard, or the sample solution, prepared in borate buffer (50 mmol L⁻¹, pH 9.5), was then injected using the injection valve IV₂. The AAG bound to phospholipids, as mentioned previously, favoring the binding of reagents with the encapsulated NAC, which promoted the reaction producing a fluorescence signal that was monitored at λ_{exc} 345 nm and λ_{em} 445 nm, using a 5/5 slit ratio and a detector gain of 950 V. The system takes about 150 s (release time, Δt₂) to achieve the baseline. The difference in the peak area obtained in the absence and the presence of the analyte was used as the analytical parameter, which was plotted versus the AAG concentration to obtain the calibration graph. Each standard or sample solution was injected in triplicate. The AAG concentration in the samples was determined by interpolation in the calibration graph.

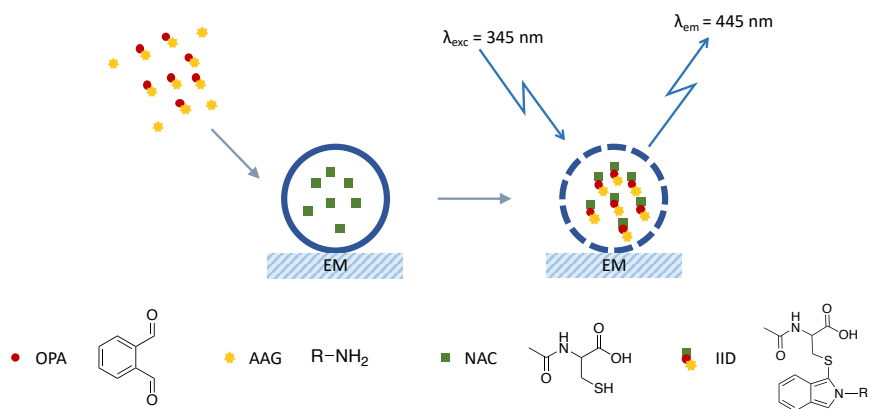


Figure 3. Scheme of the reaction mechanism involved in the AAG determination, where AAG and OPA reached MLs with NAC encapsulated, a fluorescent isoindole derivate (IID) is formed and measured at its excitation and emission wavelengths (λ_{exc} = 345 nm, λ_{em} = 445 nm).

Analysis of food samples. The method was applied to determining AAGs in whole milk and edible animal muscle samples obtained from local supermarkets. The milk samples were pretreated by mixing 20 mL of each sample with 20 mL of 20% trichloroacetic acid solution, stirring for 40 min, and centrifugation at 4 °C for 15 min at 11830×g, collecting supernatants and filtering them through a 0.2-µm membrane, followed by diluting them five-fold with borate buffer (50 mmol L⁻¹, pH 9.5).^{9,29} The edible pork and chicken muscles (5 g) were mixed with 10 mL of the extraction solution (8.3 g L⁻¹ trichloroacetic acid, 0.0083 % Tween 20, 16.7 % methanol, and 0.05 % mercaptoethanol) and centrifugated at 11830×g for 10 min, collecting the supernatant and diluting five-fold with borate buffer (50 mmol L⁻¹, pH 9.5).³⁰ The solutions acquired by pretreating foods were analyzed using the developed method.

Results and discussion

Synthesis and characterization of h-MLs. The variables affecting the synthesis of h-MLs containing hydrophobic magnetic NPs and NAC were studied using the univariate method. Hydrophobic magnetic NPs (Fe₃O₄@AuNPs-C12SH) were prepared using a previously described method.^{7,27} The use of magnetic NPs coated with AuNPs improves their chemical stability and allows their surface to be hydrophobic by modification with C12SH, required to increase their encapsulation efficiency in the liposomes phospholipid bilayer. The characterization of these NPs has been widely studied.^{7,27} TEM showed spherical structures with an average diameter of 30 ± 10 nm. Morphology and elemental composition were studied by scanning electron microscopy, equipped with an energy dispersive detector (SEM-EDX), infrared (FTIR), and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS).

The h-MLs containing Fe₃O₄@AuNPs-C12SH in the lipid bilayer and NAC in the aqueous phase were prepared using the rapid solvent evaporation

(RSE) method homogenized using agitation and ultrasonic treatments.⁷ The best results were obtained using a phospholipid mixture (100 μL) composed of DSPC (0.68 mmol L^{-1}), DOPE (0.11 mmol L^{-1}) and CH (0.11 mmol L^{-1}) (72:12.5:12.5) diluted to 1 mL with chloroform/methanol (880:120) and mixed with a solution containing 0.5 mL of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@AuNPs-C12SH}$ (7 mg mL^{-1}), 2 mL of NAC (10 mmol L^{-1}), and 7.5 mL of phosphate buffer (10 mmol L^{-1} , pH 7.4). The temperature at which there was the highest percentage of h-MLs formed was 40 °C, due to obtain the critical temperature to form liposomes.

Filled h-MLs were separated from empty liposomes, un-trapped NPs, and residues from the synthesis by multiphase density gradient centrifugation (MDGC) system as described elsewhere.²⁸ The h-MLs with NAC encapsulated were located in the intermediate layers, whereas non-encapsulated NPs and h-Ls with NAC stayed at the bottom layers and non-encapsulated NAC at the upper layer. The h-MLs were collected and washed with 100 mL of 10 mmol L^{-1} phosphate buffer (pH 7.4) four times. The h-MLs suspension stability was increased maintained refrigerated at 4 °C until use.

The h-MLs have been widely characterized by different techniques, such as TEM and asymmetric flow-field flow fractionation coupled with multi-angle light scattering (AF4-MALS) in previous researches.^{8,28,31} The direct use of TEM for the liposome characterization was not possible because they were disrupted in the evaporation step required in the sample preparation. However, a procedure consisted of embedding the MLs into an epoxy resin, similar to that used for the characterization of cells in biological materials.³² **Figure 4** shows a TEM image in which it can be seen that the hydrophobic magnetic-gold NPs were retained into the phospholipid bilayer of the h-MLs. The encapsulation efficiency (EE) of NAC in liposomes was determined by measuring using the fluorimetric method. Value ranges of EE from 60 to 70 % were found, with an estimated average value of 65 %.

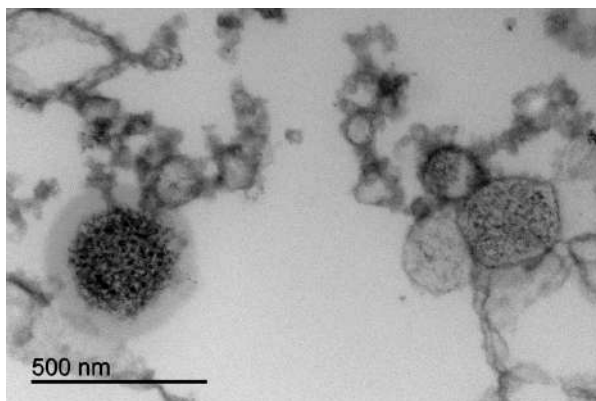


Figure 4. TEM image of h-MLs containing $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@AuNPs-C12SH}$ and NAC included in an epoxy-resin.

Study of the variables affecting the developed method. As indicated above, an SDS was used to propel reagents into the microfluidic device to monitor the luminescence signal from NAC, OPA, and the AAG reaction. Kanamycin was chosen as a model analyte to follow the optimization of the system using the univariate method. **Table 2** summarizes the hydrodynamic, instrumental, and chemical variables studied by applying the univariate method, range assayed, and chosen values. All the assays were carried out at 25 °C to avoid the degradation of h-MLs and using two different kanamycin concentrations: 0.1 and 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

The alignment of the “pinhole” with the incident beam to measure the signal from the microfluidic device was a critical variable to obtain the maximum signal. A 1 mmol L^{-1} fluorescein solution was introduced into the system to obtain the rotation angle of the 3D-printing alignment device at which the signal was maximum. The excitation and emission wavelengths chosen corresponded to the isoindole derivate produced in the reaction. Regarding the hydrodynamic variables, the flow rate was chosen to introduce the h-MLs suspension and the reagent mixture using the injection valves IV_1 and IV_2 , respectively, and buffers were 30 $\mu\text{L min}^{-1}$. The distribution of the reactants and liposomes in the syringes was studied to ensure the maximum amount of luminescent product formation.

The reagent and analyte solutions were pre-mixed sequentially to select the best way to obtain the maximum signal difference in the absence and presence of the analyte. The results showed that the signal difference was slightly higher when OPA and AAG solutions were pre-mixed and injected into the flow system. This behavior can be ascribed to the fact that this distribution enhances the formation of the fluorescent reaction product. This fact supposed that NAC could be encapsulated in the liposomes without affecting the course of the reaction to improve the sensitivity of the proposed method.

Table 2. Optimization of variables affecting the system

Type of variable	Variable	Range studied	Optimal value
Instrumental	Rotary angle, degree	30 – 60	45
	λ_{exc} , nm	200 – 800	345
	λ_{em} , nm	200 – 800	445
	Excitation slit, nm	1 – 10	5
	Emission slit, nm	1 – 10	5
	PMT gain, V	800 – 950	950
Hydrodynamic	Flow rate, $\mu\text{L min}^{-1}$	10 – 100	25
	h-MLs injection, μL	1 – 250	150
	Reagent injection, μL	1 – 250	50
	Retention time, s	60 – 600	300
	Measurement time, s	60 – 600	150
	Microreactor volume, μL	6 – 13	13
Chemical	pH	7 – 10	9.5
	[Borate buffer], mmol L^{-1}	10 – 250	50
	[OPA], mmol L^{-1}	1 – 10	2
	[NAC], mmol L^{-1}	1 – 10	2

The first step of the method was the injection of h-MLs with NAC in phosphate buffer through the valve (IV_1) to preconcentrate them before the observation zone and then inject the other reagents in borate buffer through the

other valve (IV_2) to raise the contact between reactants and form the fluorescent isoindole derivate. The study of the injection volumes was studied, obtaining good results injecting 150 μL of h-MLs. This volume was enough to execute three sample injections without removing the power of the electromagnet or reintroducing liposomes into the system, but no affecting the repeatability of the method. Introducing 50 μL of OPA and AAG supposed a peak signal of 150 s.

Figure 5a shows the influence of the ratio between the NAC and OPA concentration in a 2D-response chart. With both kanamycin concentrations assayed, the best response was obtained with 2 mmol L^{-1} NAC and 2 mmol L^{-1} OPA. For this reason, h-MLs were synthesized, considering that the final concentration of NAC in them was this. The influence of the pH on the system is shown in **Figure 5b**, observing no signal variation at higher values than 9.5. A borate buffer was assayed to fit this pH with a concentration of 50 mmol L^{-1} .

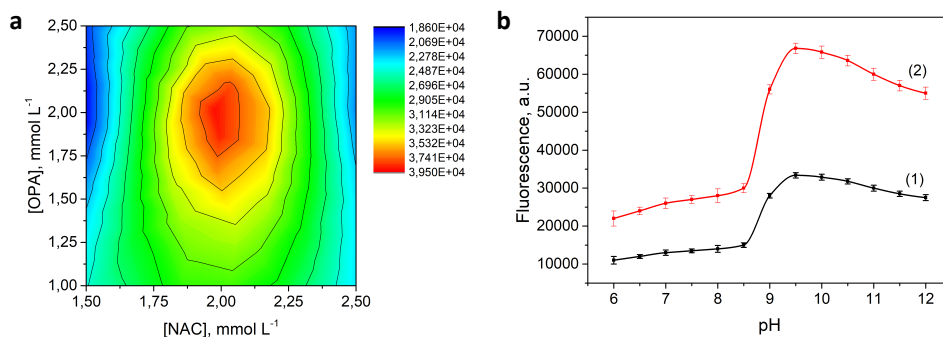


Figure 5. Influence of experimental variables of the method: (a) surface response of the concentration ratio between NAC and OPA, and (b) pH of the reaction at two kanamycin concentrations, (1) 0.1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and (2) 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Analytical features of the method. The calibration graphs of the method for the determination of four AAG were obtained under the optimum experimental conditions and using the difference in the peak area obtained in the absence and the presence of the analyte, measured at λ_{exc} 345 nm and λ_{em} 445 nm, as the analytical parameter (y). **Table 3** summarizes the figures of merit of the method,

including the equation parameters of the calibration graphs, dynamic ranges, limits of detection (LOD), calculated according to IUPAC recommendations,³³ and the precision of the method, expressed as a percentage of relative standard deviation (RSD%), studied at two concentrations levels, corresponding to the maximum and minimum error zones of the calibration graph. The estimated sampling frequency under the working conditions was about 8 h⁻¹, which mean a measurement time of 7.5 min per sample.

A comparison of the proposed method features with those of other previously reported methods for AAG determination is shown in **Table 4**. As can be seen, few methods used microfluidic systems^{4,19} or liposomes,^{20,34} and no methods used the combination of both methods for the AAGs determination. The LOD reached using a microfluidic system with liposomes magnetically retained is lower than those obtained using these methodologies separately. The described method presented the same or lower LOD than other methodologies using luminescence detection, such as fluorimetry,^{4,19,30,34,35} colorimetry,^{16,20} or ultraviolet (UV)¹⁸ detection. The analysis time of this method was significant lower than those found in other previous cited methods in the literature (see the cited references in **Table 4**).

Table 3. Analytical features of the method.

Analyte	Kanamycin			Streptomycin			Gentamicin			Neomycin		
	Calibration graph	With liposomes	Without liposomes	With liposomes	Without liposomes	Without liposomes	With liposomes	Without liposomes	With liposomes	Without liposomes	With liposomes	Without liposomes
Equation parameters												
a ($\pm s_a$)		26.37 (± 0.39)	8.92 (± 0.13)	27.57 (± 0.73)	7.22 (± 0.21)	20.08 (± 0.49)	2.15 (± 0.33)	29.71 (± 0.34)	9.09 (± 0.11)			
b ($\pm s_b$)		128.62 (± 2.14)	0.65 (± 0.004)	180.49 (± 4.96)	0.69 (± 0.002)	104.32 (± 0.15)	1.079 (± 0.005)	117.66 (± 4.73)	0.766 (± 0.001)			
r ²		0.998	0.997	0.992	0.991	0.990	0.993	0.997	0.996			
LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		0.009	0.59	0.012	0.92	0.014	0.92	0.008	0.43			
Linear range ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		0.03 – 1000	2 – 1000	0.04 – 1000	3 – 1000	0.05 – 1000	3 – 1000	0.03 – 1000	1.5 – 1000			
RSD (%) ^a												
A		5.47	5.43	4.04	5.59	6.98	5.78	5.26	6.21			
B		0.95	0.88	1.18	0.91	1.25	1.96	1.01	0.98			

^a RSD% values ($n = 7$, $r = 3$) was achieved at two concentration levels, which correspond to the LOQ (low level) and the middle of the linear range (high level), respectively.

Table 4. Comparison of analysis features for AG antibiotics determination with different methods

Method/ Chemical system	AAG	Linear range, $\mu\text{mol L}^{-1}$	LOD, $\mu\text{mol L}^{-1}$	RSD %	Measurement time, min	Sample / Pretreatment	Recovery, %	Reference
Kinetic stopped-flow method with fluorimetry detection	Amikacin	0.10 – 5.12	0.034	4.8 – 6	0.083	Serum / Protein precipitation with acetone/nitrile	89.4 – 104.7	35
	Neomycin	0.3 – 3.3	0.09	4.4 – 5.0	4	Water / Filtered with a 0.45- μm syringe filter	80 – 120	4
Chemiluminescence microfluidic system	Streptomycin	0.9 – 13.7	0.28	0.8 – 2.5				
	Amikacin	0.8 – 8.5	0.24	1.1 – 4.6				
Aptamer microfluidic device with fluorimetric detection	Neomycin	0 – 2	0.153	N/A	10	Water / No pretreatment	87.5 – 116	19
	Kanamycin	$1.7 \cdot 10^{-3}$ – 0.086	$1.6 \cdot 10^{-3}$	3.43 – 7.38	80	Pork, milk, and honey / Protein precipitation with trichloroacetic acid and/or extraction, followed by a dilution	77.8 – 93.1	30
Liposome colorimetric and fluorimetric sensor	Neomycin	0.1 – 50	0.1	N/A	20	N/A	N/A	34
	Kanamycin	1.1 – 110	1.1	N/A	60	N/A	N/A	20
Visual dot ELISA	Streptomycin	$6 \cdot 10^{-4}$ – 0.066	$5 \cdot 10^{-3}$	N/A	131	Milk / Centrifugation and dilution	84.2 – 119.8	16
	Genamycin	$5 \cdot 10^{-3}$ – 0.07	0.027	N/A			93.3 – 124.5	
CZE-UV	Paromomycin	64.5 - 1290	6.99	0.9 – 8.9	13	Pharma-ceutical solutions / Dilution or extraction with dichloromethane followed by dilution	96 – 106	18
	Kanamycin	54.9 – 1096.4	17.9	1.5 – 9.7			96 – 104	
Liposome-based microfluidic system with fluorescence detection	Kanamycin	0.03 – 1000	$9 \cdot 10^{-3}$	0.95 – 5.47	7.5	Milk, chicken, and pork muscles / Protein precipitation with trichloroacetic acid and/or extraction, followed by filtration through a 0.2- μm membrane and dilution	87.2 – 107.4	This work
	Streptomycin	0.04 – 1000	0.012	1.18 – 4.04				
	Genamycin	0.05 – 1000	0.014	1.25 – 6.98				
	Neomycin	0.03 – 1000	$8 \cdot 10^{-3}$	1.01 – 5.26				

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; LC-MS/MS, liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry; CZE, capillary zone electrophoresis; UV, ultraviolet; ESI-MS, electrospray ionization mass spectrometry; OPA, o-phthalaldehyde; NAC, N-acetylcysteine

Application of the method. The method was applied to the determination of AAGs in foods, such as milk and animal muscles (pork and chicken), to establish the applicability of the microfluidic system developed using the procedure described above. The pretreated and diluted samples were first analyzed to verify the presence of AAGs. However, none of the samples studied contained analyte. Therefore, a recovery study was carried out by adding two different amounts of kanamycin to each sample so that the final analyte concentrations were 0.1 and 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$. **Table 5** shows the recovery values obtained, which ranged between 87.2 and 107.4 %. The results confirmed that the developed method was highly reliable and applicable to kanamycin detection in real samples.

Table 5. Application of the method to the determination of kanamycin in food samples

Sample	Added, $\mu\text{mol L}^{-1}$	Found $\mu\text{mol L}^{-1}$	^a , Recovery ^a , %	RSD, % (n = 3)
Milk	0.1	0.107	107.4	2.87
	1	0.998	99.8	3.21
Chicken muscle	0.1	0.095	94.7	4.63
	1	0.954	95.4	5.21
Pork muscle	0.1	0.087	87.2	4.12
	1	0.976	97.6	3.97

^a Mean value of three experiments

The usefulness of h-MLs as amplification tools combined with a microfluidic system has been demonstrated to determine AAGs. The encapsulation of one reagent into h-MLs allows its preconcentration in the observation zone using an electromagnet device, reaching a very low LOD and increasing the sensitivity of the method. This reagent preconcentration, joined to using a microfluidic system, provides several advantages, such as low consumption of reagents and samples, cost-effective and straightforward equipment.

The method has been satisfactorily applied to the analysis of different food samples, obtaining similar results to those obtained using other methods, as shown in **Table 4**.

Acknowledgments

The authors thank J.I. Calero Gutiérrez for designing and manufacturing the 3D printed alignment prototype for the MFS and FLD coupling system. The authors also thank the Central Service for Research Support (SCAI) of the University of Córdoba for the service provided for NPs and h-MLs characterization. This study is financially supported by the Operative Framework Funding FEDER-Andalucía 2014-2020 Program (ref. UCO-1263679).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- (1) Whitesides, G. M. The Origins and the Future of Microfluidics. *Nature* **2006**, *442*, 368–373. <https://doi.org/10.1038/nature05058>.
- (2) Weibel, D. B.; Whitesides, G. M. Applications of Microfluidics in Chemical Biology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 584–591. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.10.016>.
- (3) Kuswandi, B.; Nuriman; Huskens, J.; Verboom, W. Optical Sensing Systems for Microfluidic Devices: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *601* (2), 141–155. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.08.046>.

- (4) Sierra-Rodero, M.; Fernández-Romero, J. M.; Gómez-Hens, A. Determination of Aminoglycoside Antibiotics Using an On-Chip Microfluidic Device with Chemiluminescence Detection. *Microchim. Acta* **2012**, *179*, 185–192. <https://doi.org/10.1007/s00604-012-0878-2>.
- (5) Sierra-Rodero, M.; Fernández-Romero, J. M.; Gómez-Hens, A. Determination of Fluoroquinolone Antibiotics by Microchip Capillary Electrophoresis along with Time-Resolved Sensitized Luminescence of Their Terbium(III) Complexes. *Microchim. Acta* **2014**, *181* (15–16), 1897–1904. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1266-x>.
- (6) Écija-Arenas, Á.; Román-Pizarro, V.; Fernández-Romero, J. M. Integration of a Microfluidic System into a Conventional Luminescence Detector Using a 3D Printed Alignment Device. *Microchim. Acta* **2020**, *187* (11). <https://doi.org/10.1007/s00604-020-04597-w>.
- (7) Román-Pizarro, V.; Fernández-Romero, J. M.; Gómez-Hens, A. Fluorometric Determination of Alkaline Phosphatase Activity in Food Using Magnetoliposomes as On-Flow Microcontainer Devices. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62* (8), 1819–1825. <https://doi.org/10.1021/jf5004804>.
- (8) Román-Pizarro, V.; Fernández-Romero, J. M.; Gómez-Hens, A. Automatic Determination of Coenzyme Q10 in Food Using Cresyl Violet Encapsulated into Magnetoliposomes. *Food Chem.* **2017**, *221*, 864–870. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.085>.
- (9) Román-Pizarro, V.; Gómez-Hens, A.; Fernández-Romero, J. M. Applicability of Fluorescent Hybrid Magnetoliposomes for the Determination of Reactive Oxygen Compounds in Food. *Food Anal. Methods* **2018**, *11* (9), 2376–2383. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1220-3>.

- (10) Kaloyanides, G. J. Drug-Phospholipid Interactions: Role in Aminoglycoside Nephrotoxicity. *Ren. Fail.* **1992**, *14* (3), 351–357. <https://doi.org/10.3109/08860229209106642>.
- (11) John, T.; Thomas, T.; Abel, B.; Wood, B. R.; Chalmers, D. K.; Martin, L. L. How Kanamycin A Interacts with Bacterial and Mammalian Mimetic Membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2017**, *1859* (11), 2242–2252. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.08.016>.
- (12) Khondker, A.; Bider, R. C.; Passos-Gastaldo, I.; Wright, G. D.; Rheinstädter, M. C. Membrane Interactions of Non-Membrane Targeting Antibiotics: The Case of Aminoglycosides, Macrolides, and Fluoroquinolones. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2021**, *1865* (1), 183448. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183448>.
- (13) *Council Regulation (EEC) No 2577/90 of 26 June 1990 Laying down a Community Procedure for the Establishment of Maximum Residue Limits of Veterinary Medicinal Products in Foodstuffs of Animal Origin*; Vol. L 269, pp 1–15.
- (14) Yu, C. Z.; He, Y. Z.; Fu, G. N.; Xie, H. Y.; Gan, W. E. Determination of Kanamycin A, Amikacin and Tobramycin Residues in Milk by Capillary Zone Electrophoresis with Post-Column Derivatization and Laser-Induced Fluorescence Detection. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877* (3), 333–338. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.12.011>.
- (15) Tölgyesi, Á.; Barta, E.; Sohn, M.; Sharma, V. K. Determination of Antimicrobial Residues in Honey by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Food Anal. Methods* **2018**, *11* (8), 2043–2055. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1166-5>.

- (16) Wei, D.; Meng, H.; Zeng, K.; Huang, Z. Visual Dual Dot Immunoassay for the Simultaneous Detection of Kanamycin and Streptomycin in Milk. *Anal. Methods* **2019**, *11* (1), 70–77. <https://doi.org/10.1039/c8ay02006j>.
- (17) Wei, D.; Zhang, X.; Chen, B.; Zeng, K. Using Bimetallic Au@Pt Nanozymes as a Visual Tag and as an Enzyme Mimic in Enhanced Sensitive Lateral-Flow Immunoassays: Application for the Detection of Streptomycin. *Anal. Chim. Acta* **2020**, *1126*, 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.06.009>.
- (18) Donegatti, T. A.; Lobato, A.; Duek, E. A. R.; Moreira Gonçalves, L.; Alves Pereira, E. Derivatization-Free Determination of Aminoglycosides by CZE–UV in Pharmaceutical Formulations. *Electrophoresis* **2020**, *41* (18–19), 1576–1583. <https://doi.org/10.1002/elps.202000160>.
- (19) Zhang, Y.; Zuo, P.; Ye, B. C. A Low-Cost and Simple Paper-Based Microfluidic Device for Simultaneous Multiplex Determination of Different Types of Chemical Contaminants in Food. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *68*, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.12.042>.
- (20) Kang, D. H.; Kim, K.; Son, Y.; Chang, P. S.; Kim, J.; Jung, H.-S. Design of a Simple Paper-Based Colorimetric Biosensor Using Polydiacetylene Liposomes for Neomycin Detection. *Analyst* **2018**, *143* (19), 4623–4629. <https://doi.org/10.1039/c8an01097h>.
- (21) Zhang, K.; Gan, N.; Hu, F.; Chen, X.; Li, T.; Cao, J. Microfluidic Electrophoretic Non-Enzymatic Kanamycin Assay Making Use of a Stirring Bar Functionalized with Gold-Labeled Aptamer, of a Fluorescent DNA Probe, and of Signal Amplification via Hybridization Chain Reaction. *Microchim. Acta* **2018**, *185* (3). <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2635-z>.

- (22) He, L.; Shen, Z.; Wang, J.; Zeng, J.; Wang, W.; Wu, H.; Wang, Q.; Gan, N. Simultaneously Responsive Microfluidic Chip Aptasensor for Determination of Kanamycin, Aflatoxin M1, and 17 β -Estradiol Based on Magnetic Tripartite DNA Assembly Nanostructure Probes. *Microchim. Acta* **2020**, *187* (3). <https://doi.org/10.1007/s00604-020-4155-5>.
- (23) Fernández-Romero, J. M.; Aguilar-Caballos, M. P. *Fluorescence | Food Applications*, 3rd ed.; Elsevier Inc., 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.00156-6>.
- (24) Ourique, A. F.; Chaves, P. D. S.; Souto, G. D.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; Beck, R. C. R. Redispersible Liposomal-N-Acetylcysteine Powder for Pulmonary Administration: Development, in Vitro Characterization and Antioxidant Activity. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2014**, *65*, 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.09.017>.
- (25) Buonocore, C.; Alipour, M.; Omri, A.; Pucaj, K.; Smith, M. G.; Suntres, Z. E. Treatment of Ricin A-Chain-Induced Hepatotoxicity with Liposome- Encapsulated N-Acetylcysteine. *J. Drug Target.* **2011**, *19* (9), 821–829. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2011.582645>.
- (26) Alipour, M.; Mitsopoulos, P.; Smith, M. G.; Bolger, G.; Pucaj, K.; Suntres, Z. E. Safety and Pharmacokinetic Studies of Liposomal Antioxidant Formulations Containing N-Acetylcysteine, α -Tocopherol or γ -Tocopherol in Beagle Dogs. *Toxicol. Mech. Methods* **2013**, *25* (6), 419–431. <https://doi.org/10.3109/15376516.2013.774079>.
- (27) Écija-Arenas, Á.; Román-Pizarro, V.; Fernández-Romero, J. M.; Gómez-Hens, A. Separation and Purification of Hydrophobic Magnetite-Gold Hybrid Nanoparticles by Multiphase Density Gradient Centrifugation. *Microchim. Acta* **2016**, *183* (6), 2005–2012. <https://doi.org/10.1007/s00604-016-1838-z>.

- (28) Écija-Arenas, Á.; Román-Pizarro, V.; Fernández-Romero, J. M. Luminescence Continuous Flow System for Monitoring the Efficiency of Hybrid Liposomes Separation Using Multiphase Density Gradient Centrifugation. *Talanta* **2020**. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135577>.
- (29) Wang, C.; Chen, D.; Wang, Q.; Tan, R. Kanamycin Detection Based on the Catalytic Ability Enhancement of Gold Nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *91* (October 2016), 262–267. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.12.042>.
- (30) Liu, C.; Lu, C.; Tang, Z.; Chen, X.; Wang, G.; Sun, F. Aptamer-Functionalized Magnetic Nanoparticles for Simultaneous Fluorometric Determination of Oxytetracycline and Kanamycin. *Microchim. Acta* **2015**, *182* (15–16), 2567–2575. <https://doi.org/10.1007/s00604-015-1628-z>.
- (31) Écija-arenas, Á.; Román-pizarro, V.; Fernández-romero, J. M. Separation and Characterization of Liposomes Using Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation with Online Multi-Angle Light Scattering Detection. *J. Chromatogr. A* **2021**, *1636*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461798>.
- (32) *Electron Microscopy Methods and Protocols*; Hajibagheri, M. A. N., Ed.; Humana Press Inc., 1999. <https://doi.org/10.1385/1-59259-201-5:31>.
- (33) Long, G. L.; Winefordner, J. D. Limit of Detection: A Closer Look at the IUPAC Definition. *Anal. Chem.* **1983**, *55* (7), 712A-724A. <https://doi.org/10.1021/ac00258a001>.
- (34) Kang, D. H.; Jung, H. S.; Ahn, N.; Lee, J.; Seo, S.; Suh, K. Y.; Kim, J.; Kim, K. Biomimetic Detection of Aminoglycosidic Antibiotics Using Polydiacetylene-Phospholipids Supramolecules. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (43), 5313–5315. <https://doi.org/10.1039/c2cc31466e>.

- (35) Sánchez-Martínez, M. L.; Aguilar-Caballos, M. P.; Gómez-Hens, A. Selective Kinetic Determination of Amikacin in Serum Using Long-Wavelength Fluorimetry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *34* (5), 1021–1027. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2003.11.015>.

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS



DISCUSSION OF THE RESULTS



En este apartado se aborda una discusión detallada y crítica de los resultados más relevantes obtenidos a lo largo de esta Tesis Doctoral. Dado que la Memoria es una recopilación de artículos (publicados o próximos a publicarse) y los resultados específicos de cada artículo han sido discutidos previamente, el objetivo de esta parte es poner de manifiesto las ventajas y limitaciones de las metodologías desarrolladas, así como la comparación con otras metodologías empleadas en el ámbito científico para dicha finalidad. Este apartado se divide en tres secciones, de acuerdo con los objetivos planteados:

- **Síntesis, separación y caracterización de las nanoestructuras utilizadas.** Se presentan los métodos de síntesis de nanopartículas y liposomas, así como su separación y caracterización con diversas plataformas analíticas separativas basadas en la centrifugación en gradiente multifase de densidad acoplada a sistemas continuos de análisis y la técnica de fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico acoplada con detección de dispersión de la radiación multiángulo.
- **Propuesta de plataformas analíticas microfluídicas integradas en sistemas de detección convencionales.** Se aborda el acoplamiento de un sistema microfluídico en un espectrofluorímetro convencional y la monitorización de la eficacia separativa utilizando un método previamente descrito, comparando los resultados obtenidos con ambos métodos.
- **Aplicación de plataformas analíticas para la determinación de residuos de antibióticos aminoglucósidos de utilidad en la evaluación de la seguridad agroalimentaria.** Se estudian dos plataformas analíticas determinativas microfluídicas para la determinación de residuos de antibióticos aminoglucósidos como modelo de compuestos xenobióticos en alimentos.

1. Síntesis, separación y caracterización de las nanoestructuras utilizadas

Como se ha comentado en la introducción, la síntesis de los nanomateriales (NMs) implica el uso de diferentes procedimientos que permiten obtener variabilidad en la forma, tamaño, polidispersidad, aunque también aparecen residuos de reactivos que interesa eliminar. Esta situación conlleva desarrollar nuevos métodos de separación y purificación posteriores a la síntesis de estos NMs. De esta forma se obtienen NMs con las características físicas y químicas adecuadas para su aplicación analítica. En esta sección se comentan las investigaciones realizadas para la propuesta de dos métodos de separación y caracterización de NMs posterior a su síntesis. Estos métodos se basan en el uso de plataformas analíticas separativas en las que se combinan las etapas de separación y detección en un mismo proceso analítico. El objetivo de estas metodologías es separar las nanoestructuras (NEs) para así aislar el tipo que se desee para su uso analítico y evitar que otras NEs presentes en el resultado de la síntesis interfieran en la reacción y/o en la señal analítica originada. Paralelamente, el acoplamiento de sistemas de detección a estas metodologías separativas permite obtener información adicional de las NEs sintetizadas.

La primera de las plataformas de separación propuesta está basada en la centrifugación en gradiente multifase de densidad (MDGC) y se ha utilizado en la separación de dos tipos de NMs sintetizados: nanopartículas (NPs) (**Capítulo I.1**) y liposomas (**Capítulo I.2**). La distinta naturaleza de los NMs separados implica la adaptación del método para ambos NMs. También se ha propuesto otra metodología basada en la técnica de fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF4) y se ha aplicado para la separación de diferentes poblaciones de liposomas originadas en un mismo proceso de síntesis (**Capítulo I.3**).

Esta sección se ha organizado en función del tipo de NMs separado, diferenciando entre NPs y liposomas, y se han comentado las ventajas e inconvenientes del empleo de las distintas plataformas de separación para cada uno de los NMs. A continuación, se discuten los resultados más relevantes obtenidos según las NEs sintetizadas.

1.1. Síntesis, purificación y caracterización de nanopartículas

La síntesis de NPs híbridas magnéticas hidrófobas ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs-C12SH}$) se ha optimizado previa a su separación con la plataforma analítica de separación propuesta con fundamento en MDGC. Estas NPs híbridas han sido utilizadas en diversas determinaciones analíticas facilitando su incorporación dentro de la bicapa lipídica de liposomas, dando lugar a magnetoliposomas (MLs) [1–3]. Después del proceso de síntesis es necesaria una etapa de purificación, ya que durante este proceso también se pueden obtener otras NPs, como NPs de oro (AuNPs), de oro hidrofóbicas (AuNPs-C12SH), magnéticas ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$) y tipo *core-shell* ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs}$), que no siempre son de utilidad en el proceso analítico. También se ha aplicado el método de separación a cada una de las NPs antes comentadas con el fin de comparar los resultados de la separación global de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs-C12SH}$.

Previas a la metodología que aquí se presenta, y como ya se ha comentado, se han descrito otras metodologías para la separación y purificación de NPs. Estas se basan en distintas técnicas, incluyendo técnicas cromatográficas y no cromatográficas. Dentro de las técnicas cromatográficas, han sido extensivamente estudiadas la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y la cromatografía hidrodinámica (HDC). Sin embargo, estas técnicas presentan una baja resolución separativa y el rendimiento de la separación depende del tamaño de poro de la matriz de separación, por lo que su efectividad disminuye para mezclas multicomponentes de NPs. Por otro lado, la aplicación de estas técnicas es dependiente del tamaño de las NPs y además se pueden

producir interacciones inespecíficas con la fase estacionaria [4–7]. Las técnicas basadas en diálisis y filtración por membrana son aptas para eliminar disolventes y otros productos de la síntesis de los NMs [8]. Otra limitación que presentan es la posible obturación de la membrana o que las NPs queden adsorbidas en ella [9].

También se han descrito otras técnicas de separación aprovechando las propiedades magnéticas o la carga superficial de las NPs, como la cromatografía magnética, la separación magnética de alto gradiente (HGMS) y la electroforesis capilar (CE, CZE) [7,10–12]. Una técnica que aúna la capacidad de separación de NPs según su tamaño y según sus propiedades o composición es la técnica de fraccionamiento en flujo mediante campo (FFF). Sin embargo, su principal limitación es la necesidad de tiempos elevados, del estudio de gran cantidad de variables y no permite distinción entre NPs, agregados o aglomerados, o entre NPs con distintas formas de igual tamaño, ya que la información que se obtiene es de radio hidrodinámico [13].

Con objeto de abordar las limitaciones presentadas con estas técnicas, en esta investigación se ha propuesto la separación de NPs basada en la centrifugación en gradiente de densidad. Como se ha explicado, en esta técnica se crea un gradiente con disoluciones de densidad creciente dentro de un tubo de centrifugación, se añade la muestra a separar encima del gradiente y se somete a centrifugación. Si se usa la variante de centrifugación zonal, como es el caso de la investigación descrita, las NPs se separan según su tamaño, forma y densidad. Hasta la fecha se han descrito métodos para separar distintos tipos de NPs usando gradientes de sacarosa, glicerol o polímeros orgánicos [7,14–17]. Además, se ha evidenciado que la adición de ciertas sustancias al gradiente de densidad, coadyuvan a la estabilización de las capas del gradiente [18].

En esta investigación se destaca como novedad la elección de un gradiente multifase de densidad con el fin de conseguir capas del gradiente bien

estabilizadas. Para ello, se ha realizado la separación de NPs con un gradiente de distintas concentraciones de sacarosa, al que se le han añadido concentraciones constantes de los agentes estabilizantes ficoll y percoll. Para la adecuada separación de las NPs híbridas, se ha estudiado la formación del gradiente, encontrando que la mejor separación de las NPs se obtiene con un gradiente en 7 capas de 150 μL cada una en concentraciones crecientes de sacarosa de 5 a 50 % (v/v), excepto la capa inferior que tiene un volumen de 100 μL con una concentración de sacarosa de 55 % (v/v), alcanzando así un gradiente con un volumen de 1 mL. En todas las capas se han mantenido constantes las concentraciones de ficoll y percoll en 30 y 15 % (v/v), respectivamente.

Otra de las novedades de esta metodología de separación es la aplicación de una etapa previa a la introducción de la muestra, en la que se preestablece la forma del gradiente multifase para asegurar la mayor estabilidad entre las capas del medio de centrifugación. De la optimización de esta etapa se obtiene que la mejor separación se consigue usando una fuerza centrífuga relativa (RCF) de $4480\times g$ durante 30 min. Una vez preformado el gradiente, se depositan 500 μL de la disolución resultante de la síntesis de NPs y se produce la separación final usando una RCF de $2520\times g$ durante 40 min. En la **Figura 1** se observan diferentes tubos de separación de los diferentes tipos de NPs estudiadas. Seguidamente, se ha caracterizado cada una de las NPs, tomando la fracción que corresponde a cada una y se han realizado estudios espectroscópicos (FTIR y XPS) y microscópicos (TEM y SEM-EDX). En la **Figura 1** también se muestran imágenes TEM de las NPs estudiadas.

Una vez realizada la separación y la caracterización de las fracciones separadas, se ha acoplado en continuo el tubo de separación a un sistema de flujo continuo (CFS) para monitorizar cada una de las fracciones separadas a su paso por un detector fluorimétrico. Como las NPs no exhiben fluorescencia nativa, este detector se ha utilizado para realizar medidas de dispersión de la radiación

resonante (RLS). Para realizar la monitorización, se aspira el contenido del tubo de separación entre dos burbujas de aire que delimitan el inicio y el fin del contenido del tubo y se bombea con un caudal de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ hasta el detector.

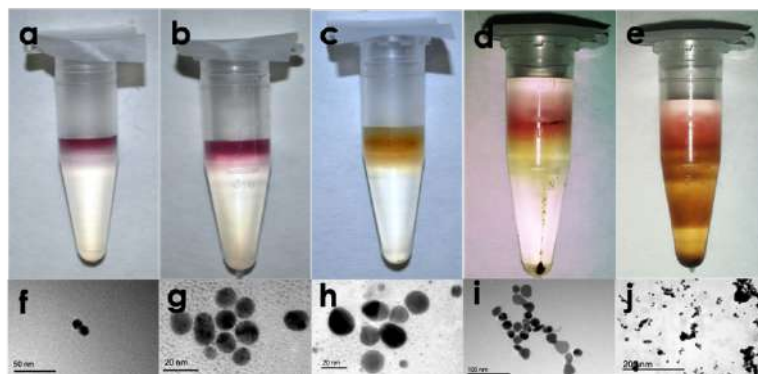


Figura 1. Fotografías de los tubos de centrifugación posterior a la separación de todos los tipos de NPs estudiados e imágenes TEM de ellas. Fotografías de la separación de **a** AuNPs, **b** AuNPs-C12SH, **c** Fe_3O_4 NPs, **d** Fe_3O_4 @AuNPs y **e** Fe_3O_4 @AuNPs-C12SH. Imágenes TEM de **f** AuNPs, **g** AuNPs-C12SH, **h** Fe_3O_4 NPs, **i** Fe_3O_4 @AuNPs y **j** Fe_3O_4 @AuNPs-C12SH

Una vez estudiados los perfiles de separación obtenidos con las señales RLS, se evidencia no sólo la separación de Fe_3O_4 @AuNPs-C12SH, sino también de otras NPs que han podido originarse en el proceso de síntesis. Se ha observado que las distintas NPs aparecen a diferentes tiempos: AuNPs en la última capa del gradiente (130 s), AuNPs-C12SH en la sexta capa (120 s), Fe_3O_4 NPs en la quinta capa (100 s), Fe_3O_4 @AuNPs en la tercera capa (50 s) y Fe_3O_4 @AuNPs-C12SH en la segunda capa (30 s). Como la introducción del vial de separación ha sido por aspiración de abajo a arriba, se puede deducir que cuanto más grande es la NP, ésta queda retenida en las capas con más densidad del gradiente de separación.

1.2. Síntesis, separación y caracterización de liposomas

Como ya se ha indicado, es necesaria una etapa de separación de los liposomas posterior al proceso de síntesis. Esta separación se puede realizar

persiguiendo dos objetivos iniciales, bien conseguir la separación de los liposomas sintetizados del resto de ingredientes del proceso de síntesis, o separar las diferentes poblaciones de liposomas en función de su tamaño y estructura. En la investigación realizada se han propuesto dos plataformas de separación y caracterización de liposomas mediante el acoplamiento de una técnica de separación con otra de detección. Estas plataformas se basan en el acoplamiento del vial de separación MDGC a un CFS y el acoplamiento del resultado de la separación por AF4 con un detector de dispersión de luz multiángulo (MALS).

Para la separación de los liposomas con aplicación en el desarrollo de métodos determinativos con respecto al resto de liposomas y reactivos, se ha desarrollado una modificación de la plataforma analítica MDGC-CFS aplicada a la separación y monitorización de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@AuNPs-C12SH}$. La técnica de separación mediante centrifugación en gradiente de densidad ha sido usada previamente, por ejemplo, para la separación de exosomas con un gradiente salino en medio orgánico [19] o en la separación de liposomas con violeta de cresilo encapsulado utilizando un gradiente de sacarosa [20]. Para realizar la separación y caracterización de distintas poblaciones de liposomas según su tamaño, se ha propuesto un método AF4-MALS. Como se ha comentado, es una técnica en la que se necesita estudiar un gran número de variables, aunque se trata de una técnica con aplicaciones significativas en la separación de liposomas [21–23].

Teniendo en cuenta que los liposomas pueden considerarse como herramientas dentro del proceso analítico o como analitos cuyo objetivo es su caracterización, en este apartado se aborda esta segunda opción. Todos los liposomas utilizados en el desarrollo experimental se han sintetizado siguiendo el método de evaporación rápida de disolvente (RSE), que consiste en disolver una mezcla de fosfolípidos en un disolvente orgánico al que se le añade una fase acuosa y evaporar el disolvente orgánico a la temperatura de transición de los fosfolípidos, los cuales se asocian formando una doble capa lipídica para originar

vesículas de diferente estructura. Así, en la fase acuosa se atrapan diferentes compuestos, como por ejemplo fluoróforos, dando lugar a la formación de liposomas híbridos. Si durante el proceso de síntesis se incorporan compuestos de naturaleza hidrofóbica, como por ejemplo Fe_3O_4 @AuNPs-C12SH, estos quedan retenidos en la bicapa lipídica dando lugar MLs. Cuando en una misma estructura liposomal se introducen tanto reactivos como NMs magnéticos se consiguen MLs híbridos (h-MLs).

El sistema de separación basado en MDGC se ha aplicado en la separación de liposomas originados durante el proceso de síntesis de h-MLs, en los que se han encapsulado NPs previamente sintetizadas y distintos fluoróforos (HPTS, rodamina B, violeta de cresilo y naftofluoresceína). También se ha establecido un gradiente multifase de densidad formado por concentraciones crecientes de sacarosa, a las que se les ha añadido concentraciones constantes de ficoll y percoll, de 30 y 15 % (v/v) respectivamente. El mejor resultado respecto a la separación se ha conseguido con un gradiente con un perfil similar al utilizado en la separación de NPs. Sin embargo, se diferencia en la concentración parcial de sacarosa en cada capa, resultando un gradiente de arriba a abajo de 10 a 100 % (v/v). La etapa de preformación del gradiente de densidad se mantiene igual, centrifugando a una RCF de $4840\times g$ durante 30 min. Sin embargo, la etapa de separación es sustancialmente diferente a la aplicada en el método anterior, ya que, aunque se realiza a la misma RCF de $2520\times g$, el tiempo se ha reducido a 20 min. De esta forma, se ha conseguido minimizar la posible lisis de los liposomas por centrifugación a altas velocidades si se mantiene durante un tiempo elevado.

Una vez realizado el proceso de separación de los liposomas mediante MDGC, el tubo de separación se ha acoplado usando un sistema de aspiración al CFS con detección luminiscente, constituyendo así una plataforma separativa similar a la propuesta anteriormente para la monitorización de la separación de NPs. Mediante el acoplamiento en continuo del detector fluorimétrico es posible

medir tanto la dispersión debida a las NPs atrapadas, como la señal luminiscente debida a la presencia de los fluoróforos encapsulados. Para cada tipo de liposoma separado, las señales se recogen a las longitudes de onda de máxima excitación y emisión de cada fluoróforo encapsulado. En todos los casos, se ha facilitado la monitorización de la señal instrumental mediante la adición de un surfactante característico para cada fluoróforo, ya que este surfactante produce un doble efecto de lisis del liposoma y de aumento de luminiscencia del fluoróforo. Se ha realizado un estudio de diferentes surfactantes (catiónicos, aniónicos y no iónicos). Se ha encontrado que el surfactante no iónico Tritón X-100 produce el mayor aumento de la fluorescencia para los fluoróforos violeta de cresilo y rodamina B, produciendo similar efecto el surfactante catiónico CTAB para los fluoróforos HPTS y naftofluoresceína. Sin embargo, no se han encontrado mejoras significativas cuando se usan surfactantes aniónicos tipo SDS, posiblemente debido a que la carga superficial negativa del liposoma dificulta el efecto de lisis y liberación del fluoróforo. En este estudio, el efecto del aumento de la fluorescencia por la presencia del surfactante ocurre a concentraciones superiores a la concentración micelar crítica descrita para cada uno de ellos.

Por un lado, tanto el flujo del contenido del vial de separación, como el flujo de surfactante, han sido introducidos a un caudal de $0,75 \text{ mL min}^{-1}$. Por otra parte, se ha establecido una longitud del reactor de mezcla de 85 cm como compromiso entre la longitud mínima necesaria para la lisis de los liposomas con la mínima dispersión de los segmentos de la separación de liposomas.

Como resultado de la monitorización de la separación se han observado 5 zonas en la que aparecen los distintos tipos de liposomas según la especie encapsulada. Los MLs aparecen siempre en la zona 1 (10–20 s), correspondiente a la primera capa del gradiente. Los liposomas híbridos con distintos fluoróforos encapsulados aparecen en la zona 2 (18–42 s), que incluye la segunda y tercera capa del gradiente. Sin embargo, los h-MLs aparecen en distintas zonas, según el fluoróforo encapsulado. Así, los h-MLs con violeta de cresilo, rodamina B y

naftofluoresceína, se observan en la zona 3 (54–66 s); mientras que los h-MLs con HPTS, se observan en la zona 4 (66–90 s). En todos los casos, también aparece una señal en la zona 5 (90–130 s), que corresponde con la zona de muestra, la que se presupone que contiene la porción no encapsulada de los fluoróforos y/o restos de la síntesis. El resultado de la separación se ha confirmado mediante microscopía confocal tomando porciones de la zona en la que aparecen los h-MLs en cada vial. En las imágenes de microscopía confocal se observa que los liposomas presentan los fluoróforos descritos anteriormente y que las NPs hidrofóbicas aparecen en la bicapa lipídica.

Respecto al segundo método de separación y caracterización de diferentes poblaciones de liposomas mediante el acoplamiento AF4-MALS, se ha estudiado la separación de distintos tipos de liposomas después de su síntesis, tales como liposomas vacíos (e-Ls), MLs y liposomas con violeta de cresilo (Ls-CV). Una limitación del método propuesto presupone que no se pueden introducir liposomas de un tamaño relativamente grande, como es el caso de los unilamelares gigantes (GUVs) y multivesiculares (MVVs). Para ello, después del proceso de síntesis, las muestras se han sometido a un proceso de ultrasonidos para reducir las poblaciones a un tamaño acorde al intervalo de fraccionamiento de las NEs. Se han estudiado las variables más significativas en la separación por esta técnica, obteniendo los valores óptimos de separación que se muestran en la **Tabla 1**. Dada la influencia significativa del flujo cruzado en AF4, el desarrollo de esta parte del proceso se ha dividido en tres perfiles de gradiente de flujo, que suponen el uso de una primera etapa con un flujo constante a $2,5 \text{ mL min}^{-1}$ durante 5 min, una segunda con un flujo linealmente decreciente de $2,5$ a 1 mL min^{-1} durante 5 min y una tercera con un flujo cruzado exponencialmente decreciente de 1 a 0 mL min^{-1} con un exponente de $0,1$ durante 60 min. En la bibliografía se ha descrito que el uso de modificadores iónicos en la fase móvil facilita el proceso separativo [24]. En este método se ha utilizado una disolución reguladora HEPES (10 mmol L^{-1} , pH 8) con 50 mmol

L⁻¹ de NaCl, consiguiendo un efecto favorable en la separación sin producir la lisis de los liposomas.

Tabla 1. Variables involucradas en la separación por AF4 para los distintos tipos de liposomas

Etapa de la separación	Variable	Intervalo estudiado	Valor elegido
Etapa de inyección	Modo de inyección	Manual, automático	Manual
	Volumen de inyección, μL	1 – 100	21
	Caudal de inyección, mL min^{-1}	0,2 – 2	1
	Tiempo de inyección, min	1 – 5	2
Etapa de enfoque	Caudal de enfoque, mL min^{-1}	0,8 – 3	2
	Tiempo de enfoque, min	1 – 15	4
Etapa de elución	Flujo cruzado isocrático		
	Caudal, mL min^{-1}	0,1 – 3,5	2,5
	Tiempo, min	1 – 50	5
	Flujo cruzado linealmente decreciente		
	Caudal, mL min^{-1}	0,1 – 3	2,5 a 1
	Tiempo, min	1 – 100	5
	Flujo cruzado exponencialmente decreciente		
	Caudal, mL min^{-1}	0,15 – 1,5	1 a 0
	Exponente	0,05 – 1,4	0,1
Tiempo, min	1 – 100	60	

La incorporación en línea del detector MALS facilita información que permite conocer los tamaños de las poblaciones de liposomas separadas mediante AF4. En general, se observan tres señales correspondientes a tres poblaciones de liposomas para cada una de las suspensiones de liposomas estudiadas (e-Ls, MLs y Ls-CV). Dos de estas tres poblaciones son similares en las tres suspensiones: una de 60 nm y otra de 250 nm. La primera población corresponde a vesículas unilamelares pequeñas (SUVs) y la segunda, vesículas unilamelares grandes (LUVs). Sin embargo, la tercera población tiene un

tamaño distinto según la suspensión de liposomas utilizada. En el caso de separación de e-Ls aparece una población de 350 nm, en la separación de MLs aparece una población de 150 nm, mientras que en la separación de Ls-CV, aparece una población de 550 nm. Estas diferencias en el tamaño de las poblaciones obtenidas para los diferentes tipos de suspensiones de liposomas ponen de manifiesto diferencias significativas en función de la zona en la que se atrapa el NM o el tipo de compuesto que se encapsula. Así, si se atrapa el NM hidrofóbico en la bicapa lipídica, se disminuye el tamaño hidrodinámico en comparación con e-Ls. Sin embargo, si determinados compuestos, como el violeta de cresilo, se encapsulan en la cavidad acuosa, se produce un aumento del tamaño hidrodinámico respecto al de e-Ls. Los resultados respecto a los tamaños obtenidos con MALS se comparan con los obtenidos con otras técnicas, tales como DLS y TEM. La consideración de los liposomas como estructuras esféricas permite la comparación del radio geométrico (R_G) obtenido con AF4-MALS, el radio hidrodinámico (R_H) obtenido con DLS, y el radio medio medido en las imágenes de TEM.

Con la técnica DLS también es posible medir la carga superficial, expresada por el potencial Z , y el índice de polidispersidad (PdI) de las NEs para realizar su caracterización. Se ha medido estos valores para las NEs implicadas, tanto NPs como los distintos tipos de liposomas, y los valores obtenidos se observan en la **Tabla 2**. Cuanto más negativo es el valor del potencial Z , es decir, cuanto mayor sea su valor absoluto, mayor será la estabilidad de la estructura y menor el tamaño de la vesícula [25]. Además, cuanto más próximo a cero sea el valor de PdI significa que la distribución de tamaños es más parecida y cuanto más se aproxime este valor a la unidad, más distribución de tamaños hay en la muestra. Por ejemplo, en la suspensión de MLs, las tres poblaciones que aparecen tienen unos tamaños parecidos, por lo que el valor de PdI será bajo; sin embargo, en la suspensión de Ls-CV aparecen

tres poblaciones con tamaños muy diferenciados por eso el valor de PDI aumenta.

Tabla 2. Valores de potencial Z e índice de polidispersidad (PDI) de los NMs caracterizados

Nanomaterial	Potencial Z, mV	PDI
Fe ₃ O ₄ @AuNPs-C12SH	- 30,8	0,101
e-Ls	- 58,7	0,688
MLs	- 61,4	0,579
Ls-CV	- 42,9	0,719

Ambas plataformas separativas aportan resultados comparables respecto a la capacidad de separación de diferentes tipos de liposomas y su distribución por tamaños o estructuras, quedando demostrada su utilidad analítica en consonancia con los objetivos planteados. A pesar de que el desarrollo del método AF4-MALS requiere una mayor laboriosidad respecto a la optimización del proceso, ofrece más información sobre la separación de los liposomas siendo sus resultados más completos. Por su parte, la plataforma separativa basada en la integración de MDGC-CFS proporciona información relativa a la distribución en zonas de separación, aportando menos información numérica sobre los tamaños relativos de los liposomas. Sin embargo, esta última plataforma ofrece como ventajas el ser una metodología más rápida, ya que proporciona la separación de las vesículas lipídicas y la monitorización de sus señales instrumentales en un tiempo de 40 min, en comparación con los 80 min que se necesitan en AF4-MALS, aproximadamente en ambos casos.

Al comparar los resultados de las separaciones con ambas plataformas, puede decirse que la distribución de tamaños encontrados con ambos métodos guarda relación. En el caso de e-Ls, sus tamaños son relativamente pequeños, ya que sólo contienen el disolvente acuoso en su interior. Se debe señalar que estos liposomas no se pueden monitorizar mediante la plataforma MDGC-CFS, ya que tras la lisis del liposoma por el surfactante no existe ninguna especie

susceptible de ser monitorizada. Por su parte, cuando se encapsulan diferentes compuestos en la cavidad acuosa, el tamaño del liposoma aumenta para poder alojar cada especie en función de las posibles interacciones hidrodinámicas que ocurren en esa cavidad.

Otro factor que afecta al tamaño del liposoma es la densidad de carga superficial, expresada por el potencial Z , ya que, como se ha dicho, cuanto mayor sea su valor absoluto, mayor será su estabilidad y menor su tendencia a formar agregados [25]. Por otra parte, se ha demostrado que el atrapamiento de distintas especies en la estructura de la doble capa lipídica incide sobre la curvatura del liposoma, influyendo en su densidad, haciendo que cuanto más curvatura tenga la bicapa más densidad tiene el liposoma [26]. Si se encapsulan $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs-C12SH}$, al ser NPs cuya carga superficial es negativa según los valores de sus potenciales Z , el liposoma adquiere mayor carga superficial negativa y mayor estabilidad, resultando en definitiva en liposomas más pequeños. Además, las NPs hidrofóbicas quedan atrapadas en la parte hidrofóbica de la bicapa lipídica, condicionando el umbral de unión de estas NPs con los fosfolípidos para que los liposomas sean termodinámicamente estables. El aumento de densidad de estos liposomas queda explicado por la zona del gradiente (zona 1) donde aparecen en la monitorización mediante MDGC-CFS.

Sin embargo, cuando en el proceso de síntesis se encapsulan disoluciones acuosas que contienen fluoróforos solubles, estos quedan encapsulados en la cavidad acuosa del liposoma, no teniendo influencia sobre las interacciones de los fosfolípidos en la bicapa lipídica, por lo que no alteran la curvatura del liposoma y se pueden formar liposomas de tamaño más grande. Lo que sí puede alterar la carga superficial del fluoróforo encapsulado es el potencial Z de las vesículas, por lo que indirectamente influye en su tamaño. Por ejemplo, cuando se encapsula violeta de cresilo, que está cargado positivamente, hace que el potencial Z del liposoma sea más positivo, provocando una disminución en su estabilidad, lo que favorece el aumento de tamaño. Esta situación también se

observa en la monitorización mediante la plataforma MDGC-CFS, quedando estos liposomas retenidos en la zona 2 del gradiente de centrifugación. Cuando se sintetizan liposomas híbridos en los que se combina el atrapamiento de NPs y el encapsulamiento de fluoróforos, se origina una competencia entre la disminución relativa de la curvatura lipídica por efecto de las NPs y la variación del volumen de la cavidad acuosa por efecto de la carga del fluoróforo. Esto condiciona el tamaño final del liposoma sintetizado. La monitorización mediante la plataforma MDGC-CFS indica que estos liposomas híbridos aparecen entre las zonas 3 y 4 del gradiente de separación.

1.3. Comparación del uso de separación MDGC para materiales nanoestructurados

Como se ha indicado, se han desarrollado dos plataformas separativas basada en MDGC-CFS que se han aplicado a la separación de NPs y liposomas, respectivamente. En la **Tabla 3** se muestran las características de ambas metodologías cuyas similitudes y diferencias se comentan a continuación. En ambas plataformas se ha realizado un proceso de separación mediante MDGC en el que se establece un gradiente multifase formado por sacarosa, ficoll y percoll, siendo similares las concentraciones de los agentes estabilizantes, ficoll y percoll, y variando las concentraciones de sacarosa en las diferentes capas del gradiente preformado para cada NM. Para la separación de NPs la concentración de sacarosa presenta un intervalo que varía entre 5 y 55 % (v/v), mientras que cuando se separan h-MLs sintetizados el intervalo del gradiente tiene una amplitud de 10 a 100 % (v/v) de concentración de sacarosa. Esto se justifica porque los liposomas son estructuras más densas que las NPs y se necesita una capa más densa en el gradiente para igualar su densidad y así mejorar la separación. Por esto, se añade una capa final de 100 % (v/v) de sacarosa sin ficoll ni percoll y además se elimina la capa del 5 % (v/v) de sacarosa para que el gradiente quede con el mismo número de capas.

Tabla 3. Comparación de las variables involucradas en la separación de Fe₃O₄@AuNPs-C12SH y h-MLs

Variable	Separación de Fe ₃ O ₄ @AuNPs-C12SH	Separación de h-MLs
Gradiente de sacarosa, % (v/v)	5, 10, 15, 20, 30, 50 y 55	10, 20, 30, 40, 50, 55 y 100
Agentes estabilizantes		
Ficoll, % (v/v)	30	30
Percoll, % (v/v)	15	15
Etapa de estabilización		
RCF, ×g	4480	4480
Tiempo, min	30	30
Etapa de separación		
RCF, ×g	2520	2520
Tiempo, min	40	20

Otra diferencia son los tiempos necesarios para la separación de ambos tipos de NEs sintetizadas. Puesto que los liposomas son estructuras más sensibles al efecto que originan las RCF, ofrecen una mayor labilidad frente al tiempo de centrifugación. Con iguales condiciones experimentales de centrifugación, las NPs requieren un tiempo de centrifugación óptimo de 40 min, pero los liposomas necesitan reducir el tiempo óptimo de separación a 20 min, ya que tiempos mayores conllevan su práctica destrucción. De esta forma, se establece un compromiso respecto al tiempo de centrifugación entre una mejor separación de las NEs y la integridad de estas.

Las dos plataformas MDGC-CFS también se diferencian en la necesidad de incorporar un flujo de surfactante que facilite la lisis de los liposomas y el aumento de la intensidad de fluorescencia de los fluoróforos liberados cuando se alcanza la zona de detección. En la modalidad de separación de suspensiones de NPs no es necesaria esta incorporación de un flujo adicional en la configuración hidrodinámica del sistema.

2. Propuesta de plataformas analíticas microfluídicas integradas en detectores convencionales

Un aspecto innovador en la propuesta de nuevas plataformas analíticas determinativas de interés en el ámbito del análisis agroalimentario supone la integración de sistemas de flujo a escala micrométrica con detectores convencionales. En este apartado se comentan los resultados obtenidos en la propuesta de una nueva plataforma analítica integrada en el propio detector (**Capítulo II.1**). Como ya se ha comentado en la introducción, existen diferentes formas de integración de sistemas microfluídicos en sistemas de detección entre las que se incluyen las opciones *off-chip* y *on-chip*.

De forma general, en el caso de acoplamientos *off-chip*, se han usado dispositivos y aparatos que operan a escala macrométrica para proporcionar la infraestructura de acoplamiento con el sistema óptico. Por ejemplo, el uso de guías de fibra óptica bifurcadas que están focalizadas en la zona de reacción/detección y que conducen la radiación desde ese punto al detector. Otra opción es el uso de dispositivos de alineamiento x-y-z para situar los elementos de enfoque de la guía de fibra óptica en la zona adecuada del chip microfluídico, o bien, situar el propio chip microfluídico en la zona de focalización de un microscopio *up-converted* [27,28]. El empleo de estos dispositivos supone una mayor complejidad para conseguir el alineamiento del paso óptico en el sistema microfluídico, y además requiere el uso de equipamiento costoso y de mayor tamaño. La alternativa *on-chip* supone un mayor grado de integración y miniaturización del sistema, ya que incorpora los diferentes dispositivos en el propio chip microfluídico [29–31]. A pesar de representar la integración total entre sistemas de flujo y detector a escala micrométrica, supone el uso de dispositivos costosos con un alto grado de dependencia de las etapas de diseño y fabricación. Por ello, el acoplamiento desarrollado en esta investigación

supone un paso intermedio que trata de resolver algunas de las limitaciones encontradas en los acoplamientos previamente descritos.

Esta investigación se ha focalizado en el desarrollo de un dispositivo de acoplamiento del chip microfluídico en un detector convencional diseñado por el grupo de investigación. Este dispositivo de acoplamiento se obtiene mediante el uso de la técnica de impresión 3D. Se ha fabricado un dispositivo de anclaje que incluya el *chipholder* y el chip microfluídico en el compartimento de muestra de un espectrofluorímetro convencional. Este dispositivo, provisto con una unidad giratoria, permite el alineamiento del sistema microfluídico en el punto de enfoque del paso óptico del detector luminiscente.

La ventaja que se obtiene con el uso de estos dispositivos es el aprovechamiento de todo el potencial de las características instrumentales de estos detectores convencionales, integrando de forma asequible el sistema microfluídico. Para asegurar la adecuada focalización del haz de radiación sobre el canal microfluídico, se hace uso de un *pinhole*. Por su parte, el espectrofluorímetro Horiba Fluorolog-3P posee dos modos de adquisición de la señal instrumental, registrando el haz de emisión con un ángulo de 90° respecto del haz de excitación (modo *right-angle*) o con una diferencia de $22,5^\circ$ entre ambos haces (modo *front-face*), como se observa en la **Figura 2**. El modo *front-face* se utiliza cuando se realizan medidas de suspensiones de muestras turbias, ópticamente densas, sólidas o muy absorbentes, ya que los fenómenos de reabsorción limitan la capacidad de respuesta del detector en el modo *right-angle*. El chip microfluídico es una superficie que refleja la luz, lo que podría interferir en una adecuada adquisición de señal instrumental. La unidad giratoria del dispositivo de acoplamiento de impresión 3D facilita la optimización del ángulo de rotación del sistema microfluídico que proporcione la máxima señal instrumental. El máximo valor corresponde a un ángulo de rotación de 45° respecto del haz incidente.

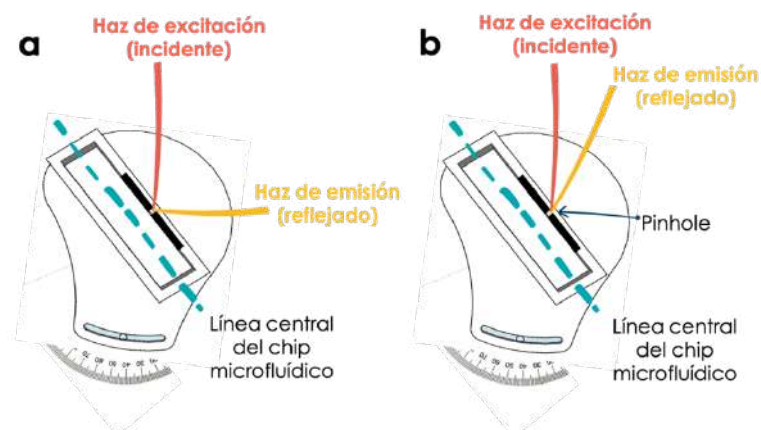


Figura 2. Esquema de los modos de medida usados en el espectrofluorímetro y explicación de la colocación del dispositivo de alineamiento fabricado con tecnología de impresión 3D y focalizado del haz de emisión en el *pinhole* en ambos modos: **a** *right-angle* y **b** *front-face*.

Para evaluar la utilidad de esta plataforma analítica integrada, se ha adaptado la plataforma separativa basada en MDGC-CFS para la separación de h-MLs previamente descrita, sustituyendo el sistema de flujo continuo a escala convencional por un sistema microfluídico. Por tanto, todos los dispositivos y aparatos usados en el sistema de flujo convencional han sido sustituidos por elementos similares que permiten trabajar a escala micrométrica, lo que ha supuesto una modificación de las características hidrodinámicas del sistema y el modo de introducción del contenido del vial de separación que incluye los h-MLs separados mediante MDGC. Respecto al caudal de trabajo del sistema, se ha producido una drástica reducción debido a las dimensiones de los canales más estrechos, pasando de un caudal de $500 \mu\text{L min}^{-1}$ a un caudal de $25 \mu\text{L min}^{-1}$. Por otra parte, este bajo caudal también favorece una mayor difusión entre los dos canales con flujo laminar que confluyen en el reactor microfluídico.

Al ser un sistema de impulsión, el contenido del tubo de separación no puede ser aspirado, por lo que se ha implementado un dispositivo de desplazamiento positivo disolvente orgánico/acuoso (O/W). El disolvente orgánico elegido ha sido hexano, ya que debe ser un disolvente inmiscible con

las disoluciones acuosas y menos denso que ellas. Este dispositivo, como se observa en la **Figura 3**, está constituido por dos agujas, una corta por la que se introduce el disolvente orgánico que queda por encima de la disolución contenida en el vial de separación y una aguja larga que llega hasta el fondo del vial, por la que se va desplazando el contenido hacia el reactor de mezcla microfluídico al ser empujado por el disolvente orgánico.

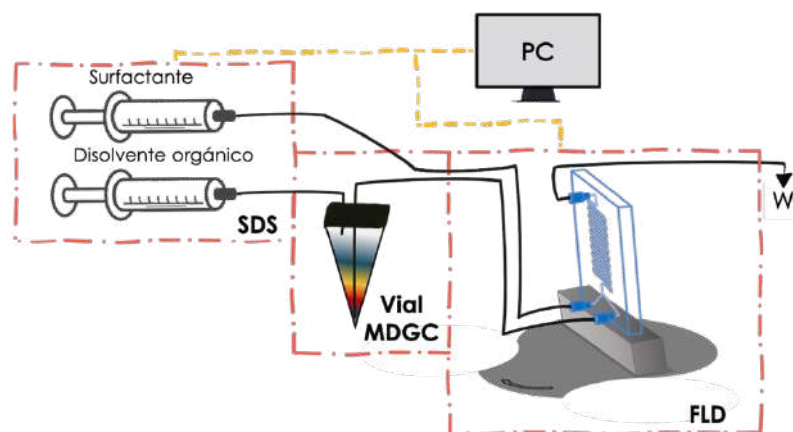


Figura 3. Esquema del sistema microfluídico integrado desarrollado para la monitorización de la separación de h-MLs. SDS: sistema de impulsión de jeringas, FLD: detector fluorimétrico, W: desecho

Como se ha comentado, los canales del sistema microfluídico son más estrechos (aproximadamente 250 μm), por lo que, además de los problemas derivados de la difusión en sistemas de flujo laminar, pueden ocasionarse problemas de obturación al paso de disoluciones muy densas. Esta situación obliga a tener que realizar una nueva optimización en la composición del gradiente de separación, de tal manera que se han readaptado los niveles de concentración de sacarosa en la séptima capa, reduciéndola hasta un 65 % (v/v), y reduciendo también la concentración de los agentes estabilizantes ficoll y percoll a 20 y 10 % (v/v), respectivamente, para obviar posibles problemas de obturación. Al igual que en la plataforma separativa de flujo convencional en la que se ha basado esta investigación, se ha incluido un flujo de surfactante para

romper los liposomas, liberar su contenido y monitorizar los fluoróforos encapsulados. Se ha mantenido el mismo surfactante, Tritón X-100, para la monitorización de suspensiones de h-MLs en los que se encapsularon por separado violeta de cresilo y rodamina B.

Los resultados de la monitorización de la señal instrumental en el sistema separativo integrado a escala microfluídica coinciden con los obtenidos con la monitorización a escala convencional, lo que pone de manifiesto la utilidad del acoplamiento desarrollado. Como se observa a continuación, los perfiles de separación coinciden respecto al tipo de liposomas separados en las diferentes zonas, pero varían respecto al tiempo en que se localizan cada una de las fracciones separadas. La señal instrumental proporcionada por los MLs se ha obtenido en la zona 1 de separación (6,7–11,3 min), correspondiente con la capa inferior del gradiente; los liposomas híbridos con ambos fluoróforos se han encontrado en la zona 2 (11,3–22,7 min), la segunda y tercera capa del gradiente; los h-MLs se han encontrado en la zona 4 (34,7–40,7 min), la sexta capa; y la señal de fluoróforos que quedan sin encapsular y restos del proceso de síntesis aparecen en la zona 5 (46,7–66,7 min), que se corresponde con la zona de muestra.

Estos resultados permiten ampliar el ámbito de aplicación de estas plataformas analíticas integradas a escala micrométrica para la propuesta de nuevas metodologías determinativas para la evaluación de la seguridad agroalimentaria. Sin embargo, también conviene destacar algunas limitaciones surgidas en esta aplicación concreta de plataformas analíticas microfluídicas integradas:

- Tiempos de monitorización más elevados derivados de la introducción al completo del vial de separación (1,5 mL). En una plataforma analítica microfluídica el volumen de muestra a introducir sería del orden de nL o μL .

- Problemas derivados de la posible obstrucción de los canales consecuencia de la alta densidad de las disoluciones introducidas. Posiblemente, en otras aplicaciones este problema podría obviarse.
- Requerimiento de un sistema de desplazamiento O/W para la introducción de la muestra. También podría obviarse en otras aplicaciones.

3. Aplicación de plataformas analíticas para la evaluación de la seguridad agroalimentaria

En el último bloque de la parte experimental de la Tesis Doctoral se explica el desarrollo de dos plataformas analíticas determinativas que permiten expandir su aplicabilidad en la evaluación de la seguridad agroalimentaria. Estas dos plataformas se fundamentan en el uso de dos sistemas de flujo en escala micrométrica con detección óptica para la determinación de residuos de antibióticos aminoglucósidos (AAGs) en diferentes muestras alimentarias. Ambas plataformas constituyen también un ejemplo de aplicación de metodologías analíticas microfluídicas para la tipificación de compuestos xenobióticos en alimentos. Las dos plataformas analíticas propuestas se fundamentan en el desarrollo de sistemas (bio)sensores integrados en la zona de reacción/detección, localizada en un dispositivo microfluídico integrado con detectores ópticos no espectroscópicos o espectroscópicos.

Para obtener la zona de reconocimiento biomolecular de los sensores, se han inmovilizado NMs bidimensionales de carbono o magnetoliposomas híbridos en la zona de reacción/detección dependiendo del tipo de plataforma analítica desarrollada. Como sistemas de detección, se ha utilizado un detector de plasmón de resonancia superficial (SPR) en la primera plataforma biosensora y un detector espectrofluorimétrico en la segunda. Se han desarrollado las siguientes plataformas analíticas biosensoras:

- Un aptasensor basado en la inmovilización del aptámero sobre una superficie activa de grafeno depositado sobre una monocapa de oro metálico colocado sobre la superficie de un detector de plasmón de resonancia superficial para la determinación de residuos de kanamicina en alimentos (**Capítulo III.1**).
- Una plataforma microfluídica sensora con detección fluorimétrica usando magnetoliposomas híbridos retenidos en la zona de reacción/detección del sistema microfluídico para la determinación de residuos de antibióticos aminoglucósidos en muestras alimentarias (**Capítulo III.2**).

3.1. Desarrollo de un aptasensor para la determinación de residuos de kanamicina en alimentos mediante medida de plasmón de resonancia superficial

La propuesta de nuevos biosensores basados en el uso de aptámeros para la determinación de antibióticos presenta un interés creciente debido especialmente a las ventajas que presenta su producción y características en comparación con el uso de inmunosensores, como ya se ha comentado en la introducción [32]. En la bibliografía se han descrito diferentes sistemas para la determinación de kanamicina basados en el uso de aptámeros con detección voltamétrica o luminiscente [33,34]. Sin embargo, no se han descrito aplicaciones con detección SPR para la determinación de kanamicina mediante el uso de aptasensores.

La fácil adaptación de la técnica SPR a sistemas miniaturizados permite el desarrollo de sensores en flujo de respuesta rápida, fáciles de usar, económicos y que ofrecen características adicionales, tales como escaso efecto matriz, bajo consumo de muestra y reactivos y portabilidad. La consecuencia más ventajosa de este tipo de sensores se traduce en que el tratamiento de muestra sea

innecesario. Sin embargo, presenta inconvenientes derivados de ser un detector que responde a cambios en su superficie, por lo que su sensibilidad depende de la distancia de la unión específica, el transporte de los analitos y la superficie específica de interacción.

Se han descrito diferentes aptasensores para la determinación de otros compuestos mediante detección SPR en los que la inmovilización del aptámero sobre la superficie activa del detector se realiza con diferente fundamento químico. Una de estas formas de inmovilización se fundamenta en la activación del aptámero con grupos tiólicos para así aprovechar la fuerte interacción Au-S para formar monocapas autoensambladas en la zona de reacción/detección del detector SPR. Sin embargo, conlleva la formación de capas muy densas de aptámeros produciéndose impedimentos estéricos y electrostáticos que impiden la interacción con el analito y por tanto afectan a la sensibilidad.

Por otra parte, una alternativa para la inmovilización del aptámero es su deposición por interacción con una lámina de grafeno previamente depositada sobre la superficie del detector SPR, siendo esta la modalidad seleccionada en esta investigación. Las estructuras basadas en grafeno presentan una serie de propiedades, tales como biocompatibilidad, alta relación superficial, interacciones π entre moléculas, facilidad en la modificación de su superficie e hidrofobicidad, que favorecen la aplicabilidad de estos NMs en el diseño de aptasensores. Con el objetivo de obtener la superficie de grafeno más adecuada para el aptasensor, en esta investigación se han comparado dos tipos de grafeno obtenidos por dos procedimientos distintos de síntesis. Así, se han comparado óxido de grafeno reducido (rGO) y grafeno obtenido por deposición química de vapores (CVD). La novedad del método propuesto reside en que por primera vez se ha utilizado láminas de grafeno CVD para la inmovilización del aptámero selectivo a kanamicina. Hasta la fecha sólo se habían inmovilizado aptámeros sobre láminas de rGO [35,36].

Se ha realizado un estudio sistemático de las etapas necesarias para la fabricación del aptasensor. En primer lugar, se ha llevado a cabo la limpieza de la superficie de la lámina de oro con etanol y el secado con un corriente de nitrógeno. Se han realizado dos procedimientos para la modificación de esta superficie de oro con los dos tipos de grafeno. Para la modificación con rGO, la superficie de oro debe hacerse más hidrofóbica, para lo que se ha sumergido durante 20 h en una disolución de ácido 16-mercaptohexadecanoico para favorecer la difusión y la adhesión del grafeno. Después se ha establecido la cantidad óptima de rGO depositado, realizando medidas mediante espectroscopía Raman para evaluar el resultado. La mayor adhesión se consigue por adición 50 μL ($\beta = 250 \mu\text{g mL}^{-1}$) dispersado en una disolución 1:1 (v/v) de agua e isopropanol, observando en los espectros Raman la proporción entre las bandas I_D/I_G características del grafeno es próxima a 1, lo que conlleva una capa homogénea de rGO.

Para la modificación con grafeno CVD, se parte de una lámina comercial de grafeno CVD sobre Cu a la que se le ha realizado una etapa de transferencia por vía húmeda para depositar el grafeno CVD sobre la lámina de oro del detector. En primer lugar, se elimina el Cu, seguido de la deposición del grafeno en la superficie de oro con un tratamiento térmico a 70 °C y posteriormente se elimina la capa superficial protectora de PMMA con acetona. La eficacia del proceso de deposición de grafeno CVD también se ha caracterizado con espectroscopía Raman, observando una proporción I_{2D}/I_G próxima a 2 y una proporción I_D/I_G entre 0,05 y 0,3, que son típicas de monocapas de grafeno.

Una vez depositado el grafeno, se procede a su modificación con ácido 1-pirenobutírico (PBA) para facilitar la inmovilización del aptámero por unión covalente a través de los grupos amino con los que se ha funcionalizado. Se añade una disolución de EDC-NHS para asegurar la unión eficiente del aptámero y finalmente, se añade una disolución del aptámero antikanamicina.

Las sucesivas modificaciones de la superficie se han caracterizado con espectroscopía Raman y la técnica SPR.

En la **Tabla 3** se muestran las características analíticas de la determinación de kanamicina con el aptasensor desarrollado, usando tanto rGO, como grafeno CVD. Se ha encontrado que la relación que hay entre la señal analítica, definida como el cambio en la respuesta expresada en unidades de índice de refracción (RIU), y la concentración de kanamicina presenta un ajuste sigmoideo, siguiendo un modelo similar a la ecuación de Hill ($y = \text{RIU}_{\text{max}} \cdot x / (\text{K}_D + x)$). Para facilitar los cálculos se ha realizado un ajuste lineal del modelo, representando la señal instrumental (RIU) frente al logaritmo de la concentración de kanamicina. Como se observa en la **Tabla 3**, se ha obtenido un intervalo dinámico de 1 – 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, con un LOD de 0,28 $\mu\text{mol L}^{-1}$ en el caso del uso de grafeno CVD. Para el aptasensor con superficie de rGO, el intervalo dinámico varía en 5,88 – 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ y un LOD de 1,79 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Por tanto, se observa que los valores de LOD son inferiores en el primer caso, debido a que la homogeneidad de la lámina de grafeno CVD es mayor, favoreciendo una mayor deposición del aptámero y, por tanto, una mayor interacción bioespecífica.

Se ha establecido una comparación de los resultados obtenidos con el aptasensor propuesto con los de otras técnicas. Si se comparan los resultados expresados en términos de LOD, se observa una diferencia significativa, ya que los alcanzados con este método son elevados, del orden de $\mu\text{mol L}^{-1}$, en comparación con otras metodologías que emplean aptasensores para la determinación de kanamicina, que están por debajo de nmol L^{-1} [32,34–36]. Esta menor sensibilidad se explica en base al sistema de detección utilizado, ya que han primado características analíticas complementarias, como facilidad de manejo, rapidez y portabilidad.

Tabla 3. Características analíticas del método de determinación basado en el uso de aptasensores

Curvas de calibración	Método con rGO		Método con grafeno CVD	
	Hill ^{a,b}	Linearización ^{a,c}	Hill ^{a,b}	Linearización ^{a,c}
Parámetros de la ecuación	RIU _{max} = 1,9·10 ⁻³ (± 6,5·10 ⁻⁵) K _D = 9,1 (± 0,5) r ² = 0,997	a = 7,6·10 ⁻⁴ (± 5,8·10 ⁻⁵) b = 1,5·10 ⁻⁴ (± 3,9·10 ⁻⁵) r ² = 0,967	RIU _{max} = 2,1·10 ⁻³ (± 3,4·10 ⁻⁵) K _D = 9,6 (± 0,3) r ² = 0,998	a = 9,1·10 ⁻⁴ (± 5,1·10 ⁻⁵) b = 1,4·10 ⁻⁴ (± 2,8·10 ⁻⁵) r ² = 0,982
LOD, μmol L ⁻¹ (r = 28)	1,79	1,53	0,28	0,81
LOQ, μmol L ⁻¹ (r = 28)	5,88	3,46	0,92	1,06
Intervalo lineal, μmol L ⁻¹ (n = 7, r = 4)	5,88 – 100 ^d	3,46 – 100	1 – 100 ^d	1 – 100
RSD, % (r = 4)	4,55		3,89	
1 μmol L ⁻¹				
50 μmol L ⁻¹	1,26		1,49	

^a y = diferencia de señal en unidades de índice de refracción (RIU); x = concentración de kanamicina (μ mol L⁻¹)

^b Ecuación de Hill: y = RIU_{max}·x/(K_D + x)

^c Linearización de la representación: y = a·log x + b

^d Intervalo dinámico para la relación de Hill

Por otra parte, se ha realizado un estudio de la selectividad del método, comparándolo con otros antibióticos (penicilina y estreptomicina), no encontrando diferencias significativas en la señal instrumental para ninguno de los antibióticos estudiados en comparación con el antibiótico kanamicina. El método se ha aplicado a la determinación de residuos de kanamicina en leche, mediante introducción directa de la muestra en la plataforma biosensora. Puesto que no se han detectado señales instrumentales correspondientes a la presencia de kanamicina en leche, se procede a realizar un estudio de recuperación a dos niveles de concentración de kanamicina, obteniéndose unos valores de porcentaje de recuperación entre 94,53 y 96,24 %.

3.2. Plataforma microfluídica basada en el uso de magnetoliposomas híbridos retenidos para la determinación de residuos de antibióticos aminoglucósidos con detección fluorimétrica

En esta sección de la Memoria se realiza una aplicación de la plataforma analítica previamente desarrollada en el **Capítulo II.1** para la determinación de residuos de AAGs como modelo para la evaluación de la seguridad agroalimentaria. Para ello, en la configuración de la plataforma analítica microfluídica se ha introducido una zona sensora dentro del reactor basada en la retención magnética de h-MLs con reactivos encapsulados involucrados en la reacción. El uso de h-MLs conlleva un aumento en la sensibilidad del método, ya que constituyen un ejemplo clásico de sistemas de amplificación de la señal al limitar el volumen de reacción al volumen de la cavidad acuosa del liposoma. Adicionalmente, el empleo de h-MLs ejerce un efecto protector de los componentes de la reacción analítica hasta su traslado a la zona de reacción/detección, donde tiene lugar o bien la lisis del liposoma para liberar su contenido, o la creación de canales que permitan la incorporación de otros componentes de la reacción teniendo lugar el desarrollo de esta en el interior de la vesícula. En esta investigación se ha llevado a cabo la determinación de

residuos de AAGs (kanamicina, estreptomina, gentamicina y neomicina) en muestras alimentarias, aprovechando que este tipo de compuestos son capaces de inducir un desorden en la bicapa lipídica, para así favorecer el transcurso de la reacción analítica. De esta forma, se puede obviar la necesidad de incorporar agentes surfactantes que provoquen la lisis del liposoma en la zona de reacción/detección, utilizado en aplicaciones anteriormente descritas.

El sistema químico propuesto se basa en la reacción de derivatización de AAGs con o-ftalaldehído (OPA) y N-acetilcisteína (NAC), dando lugar a un derivado fluorescente y que se monitoriza a las longitudes de onda máximas de excitación y emisión de 345 y 445 nm, respectivamente. Al igual que la plataforma analítica separativa ya descrita con anterioridad, hay que destacar la importancia del acoplamiento realizado mediante la incorporación de un dispositivo de alineamiento fabricado por impresión 3D que conlleva la integración del chip microfluídico en el compartimento de muestra de un espectrofluorímetro convencional. En la bibliografía se han descrito otras metodologías basadas en detección fluorescente para la determinación de AAGs en sistemas de análisis separativos/determinativos convencionales [37–41]. También se han descrito algunas aplicaciones de sistemas microfluídicos para la determinación de estos antibióticos con detección fotométrica y fluorimétrica [27,42–45].

Se ha realizado la síntesis de h-MLs, en los que se incluyen NPs magnéticas hidrofóbicas, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@AuNPs-C12SH}$, y se ha estudiado el encapsulamiento de alguno de los reactivos involucrados en la reacción analítica. Para decidir qué compuesto se incorpora en el liposoma, se ha estudiado el orden de adición de los reactantes. Por una parte, se ha observado que los liposomas más estables se corresponden con el encapsulamiento de NAC. Por otra parte, se obtienen mejores señales instrumentales cuando se realiza una mezcla previa del analito con una disolución de OPA y posteriormente la mezcla confluye en la zona de reacción/detección con la disolución de NAC. Previa a la

incorporación de los h-MLs en la plataforma microfluídica determinativa, la suspensión de liposomas se separa mediante MDGC para obtener la porción separada de h-MLs que interesa.

La plataforma microfluídica incluye un sistema SDS para la introducción de las disoluciones en el sistema de flujo que opera a un caudal de $25 \mu\text{L min}^{-1}$. En una primera etapa se introducen los h-MLs a través de una válvula de inyección con un bucle de $150 \mu\text{L}$ y se retienen magnéticamente en la zona de reacción/detección del reactor microfluídico, donde se encuentra el electroimán. Como se ha comentado, el reactor se encuentra dentro de la cámara de muestra de un espectrofluorímetro convencional, con la zona de observación alineada con el paso óptico del detector gracias al dispositivo de alineamiento fabricado por impresión 3D. En esta aplicación también se han realizado medidas de la señal luminiscente utilizando el modo de adquisición *front-face* del detector. Una vez se han retenido los h-MLs, se introduce por una segunda válvula de inyección con un bucle de $50 \mu\text{L}$ una disolución que contiene una mezcla del analito o la muestra con una disolución de OPA.

Una desventaja que puede presentar el método es la necesidad de realizar un pretratamiento de la señal, ya que, al introducir el electroimán dentro del compartimento de muestra del propio detector, se produce una deriva en la señal instrumental que se debe corregir. Esta deriva no influye en la señal analítica tenida en cuenta para la realización de la calibración del método propuesto si se realiza este pretratamiento de señal. Además, la señal adquirida presenta también bastante ruido, por lo que hay que realizar un proceso de suavizado de señal y así obviar el ruido aleatorio del instrumento. Para realizar el suavizado de la señal se ha usado el método de medias adyacentes, realizando la media de ventanas adyacentes de 21 puntos, que consigue este suavizado sin perder información de la señal instrumental.

Paralelamente al desarrollo del método basado en la plataforma analítica microfluídica, se ha desarrollado una metodología similar, pero sin hacer uso del sistema de amplificación con h-MLs para la determinación de los cuatro AAGs. En la **Tabla 4** se muestran las características analíticas encontradas con ambas metodologías. Como se puede observar, se obtienen mejores resultados en la modalidad que hace uso del sistema de amplificación con h-MLs si comparamos los parámetros de sensibilidad (pendiente de la ecuación de la recta de calibrado y valores de LOD).

También se ha realizado una comparación con otros métodos descritos de determinación de AAGs en los que se utilizan sistemas microfluídicos o liposomas como dispositivo de amplificación descritos en la bibliografía. Esta comparación se muestra en la **Tabla 5**. En primer lugar, no se han encontrado metodologías que reúnen ambas características, por lo que el método propuesto supone una novedad en el desarrollo de estas plataformas analíticas. La mayoría de los métodos descritos en la bibliografía describen metodologías determinativas para un único AAG o un grupo muy reducido de ellos, por lo que hay pocas técnicas que hagan uso de técnicas separativas para llevar a cabo la separación de los distintos tipos de AAG previa a su determinación. El AAG más estudiado para realizar su determinación es el antibiótico kanamicina, normalmente usado como modelo para la posterior aplicación del método determinativo a otros antibióticos. La plataforma analítica microfluídica determinativa propuesta facilita la determinación de AAGs en un intervalo lineal más amplio. Con esta plataforma se obtiene un intervalo lineal que contiene cinco órdenes de magnitud, en comparación con los dos o tres órdenes que permiten las demás técnicas. Además, los valores de LOD obtenidos haciendo uso de detección fluorimétrica han sido inferiores a aquellos que hacen uso de otras técnicas de detección [27,42,44]. La precisión, medida en términos de la desviación estándar relativa (DER%), de todos los métodos presenta valores similares, entrando dentro de los límites aceptados.

Tabla 4. Características analíticas de los métodos de determinación basados en el uso de h-MLs con detección fluorescente

Analito	Kanamicina		Estreptomicina		Gentamicina		Neomicina	
	de	Con h-MLs	Sin h-MLs	Con h-MLs	Sin h-MLs	Con h-MLs	Sin h-MLs	Con h-MLs
Curva de calibración								
Parámetros de la ecuación								
a ($\pm s_a$)	26,37 ($\pm 0,39$)	8,92 ($\pm 0,13$)	27,57 ($\pm 0,73$)	7,22 ($\pm 0,21$)	20,08 ($\pm 0,49$)	2,15 ($\pm 0,33$)	29,71 ($\pm 0,34$)	9,09 ($\pm 0,11$)
b ($\pm s_b$)	128,62 ($\pm 2,14$)	0,65 ($\pm 0,004$)	180,49 ($\pm 4,96$)	0,69 ($\pm 0,002$)	104,32 ($\pm 0,15$)	1,079 ($\pm 0,005$)	117,66 ($\pm 4,73$)	0,766 ($\pm 0,001$)
r ²	0,998	0,997	0,992	0,991	0,990	0,993	0,997	0,996
LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,009	0,59	0,012	0,92	0,014	0,92	0,008	0,43
Intervalo lineal ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,03 – 1000	2 – 1000	0,04 – 1000	3 – 1000	0,05 – 1000	3 – 1000	0,03 – 1000	1,5 – 1000
DER (%) ^a								
A	5,47	5,43	4,04	5,59	6,98	5,78	5,26	6,21
B	0,95	0,88	1,18	0,91	1,25	1,96	1,01	0,98

^a Valores de desviación estándar relativa ($n = 7$, $r = 3$) obtenidos a dos niveles de concentración, correspondientes al límite de detección (A) y la mitad del intervalo lineal (B), respectivamente.

Tabla 5. Comparación de las características analíticas para la determinación de AAGs con diferentes métodos

Método/ Sistema químico	AAG	Intervalo lineal, $\mu\text{mol L}^{-1}$	LOD, $\mu\text{mol L}^{-1}$	DER %	Tiempo de medida, min	Muestra / Pretratamiento	Recuperació n, %	Referencia
Método cinético de flujo parado con detección	Amikacina	0,10 – 5,12	0,034	4,8 – 6	0,083	Suero / Precipitación de proteínas con acetónitrilo	89,4 – 104,7	39
Sistema microfluídico quimioluminiscente	Neomicina	0,3 – 3,3	0,09	4,4 – 5,0	4	Agua / Filtrado con un filtro de jeringa de 0,45 μm	80 – 120	27
	Estreptomina	0,9 – 13,7	0,28	0,8 – 2,5				
Dispositivo microfluídico aptamérico con detección fluorimétrica	Amikacina	0,8 – 8,5	0,24	1,1 – 4,6				
	Neomicina	0 – 2	0,153	N/A	10	Agua / Sin pretratamiento	87,5 – 116	44
Fe_3O_4 NPs funcionalizadas con aptámeros y detección fluorimétrica	Kanamicina	$1,7 \cdot 10^{-3}$ – 0,086	$1,6 \cdot 10^{-3}$	3,43 – 7,38	80	Cerdo, leche y miel / Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético y/o extracción, seguido de una dilución	77,8 – 93,1	38
	Neomicina	0,1 – 50	0,1	N/A	20	N/A	N/A	46
Sensor liposomal colorimétrico y fluorimétrico	Neomicina	1,1 – 110	1,1	N/A	60	N/A	N/A	42
ELISA de punto visual	Kanamicina	$6 \cdot 10^{-4}$ – 0,066	$5 \cdot 10^{-3}$	N/A	131	Leche / Centrifugación y dilución	84,2 – 119,8	47
	Estreptomina	$5 \cdot 10^{-3}$ – 0,07	0,027	N/A			93,3 – 124,5	
CZE-UV	Gentamicina	64,5 - 1290	6,99	0,9 – 8,9	13	Disoluciones farmacéuticas / Dilución o extracción con diclorometano seguido de una dilución	96 – 106	48
	Paromomicina	54,9 – 1096,4	17,9	1,5 – 9,7			96 – 104	
Sistema microfluídico basado en liposomas con detección fluorimétrica	Kanamicina	0,03 – 1000	$9 \cdot 10^{-3}$	0,95 – 5,47	7,5	Leche y músculos de pollo y cerdo / Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético y/o extracción, seguida de una filtración por una membrana de 0,2 μm y una dilución	87,2 – 107,4	Este trabajo
	Estreptomina	0,04 – 1000	0,012	1,18 – 4,04				
	Gentamicina	0,05 – 1000	0,014	1,25 – 6,98				
	Neomicina	0,03 – 1000	$8 \cdot 10^{-3}$	1,01 – 5,26				

ELISA, ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas; LC-MS/MS, cromatografía líquida acoplada con un espectrómetro de masas en tándem; CZE, electroforesis capilar de zona; UV, ultravioleta; ESI-MS, espectrometría de masas con ionización por electrospray; OPA, o-ftalaldehído; NAC, N-acetilcisteína

Pocas técnicas hacen uso de metodologías basadas en medidas cinéticas [39], por lo que la mayoría de las metodologías requieren de un tiempo para realizar la reacción analítica y la señal producida sea monitorizada en el detector. Dentro de las metodologías que no hacen uso de metodologías cinéticas, la plataforma propuesta permite la monitorización de la señal instrumental para la determinación de los analitos en un tiempo inferior a otras establecidas con anterioridad [38,42,47]. Esto se debe a que al tratarse de una plataforma basada en el uso de sistemas microfluídicos, no es necesario el uso de volúmenes de muestra y reactivos muy elevada y los flujos llegan antes al reactor, produciéndose antes la detección de la señal instrumental. Además, la reacción analítica se produce con mucha rapidez, no siendo necesario el uso de tiempos elevados para la obtención del producto fluorescente, proporcional a la concentración de AAG.

El método se ha aplicado a la determinación de residuos de los AAGs en diferentes muestras alimentarias, como leche y músculos animales (de pollo y cerdo), pretratando y analizando dichas muestras, sin observar la presencia de dichos antibióticos. Por ello, se realizó un estudio de recuperación, añadiendo dos cantidades de uno de los antibióticos, kanamicina, obteniendo valores entre el 87,2 y el 107,4 %. La mayoría de los métodos de determinación de AAGs descritos en la bibliografía se han aplicado a la determinación de éstos en muestras alimentarias o farmacológicas, por lo que estos métodos precisan de una etapa previa de tratamiento de estas muestras. Los porcentajes de recuperación obtenidos en todos los métodos descritos se encuentran dentro de los límites permitidos.

3.3. Comparación general de las dos metodologías propuestas para la determinación de antibióticos aminoglucósidos

El objetivo final de los métodos desarrollados ha sido proponer alternativas basadas en sistemas microfluídicos a los métodos que hay en la

actualidad de determinación de este tipo de analitos. Aunque ambas plataformas analíticas desarrolladas se basen en el uso de sistemas microfluídicos y se usa la inmovilización de especies en la zona de reacción/detección, se han abordado distintas opciones para conseguir dicho objetivo. En el primer método se hace uso de la capacidad de reconocimiento de moléculas de los aptámeros, inmovilizados formando un biosensor con monitorización del cambio en el plasmón de resonancia de la superficie al interaccionar los analitos. El segundo método se basa en la medida de fluorescencia originada al derivatizar los analitos, inmovilizando uno de los reactivos derivatizantes con el uso de MLs para amplificar la señal.

A continuación, se comparan las principales características analíticas que presenta cada plataforma analítica desarrollada. En la **Tabla 6** se muestran las características analíticas obtenidas para cada uno de los antibióticos ensayados usando el aptasensor (plataforma 1) y los MLs retenidos magnéticamente (plataforma 2). Como puede observarse, los valores de LOD alcanzados con la segunda plataforma son más bajos a los conseguidos con la primera. Esto es debido al detector utilizado y a las propiedades analíticas consideradas importantes en cada plataforma. En la primera plataforma prima más la portabilidad y en la segunda, la sensibilidad. En lo referente al intervalo dinámico ensayado, también es superior en la segunda plataforma. Sin embargo, los valores de precisión, expresada en DER%, son ligeramente mejores en la primera plataforma, aunque las diferencias no pueden considerarse significativas.

La frecuencia de muestreo es ligeramente superior con la primera plataforma, con un valor de 6 h^{-1} frente a 8 h^{-1} de la segunda. Aunque es de destacar que la plataforma 1 no precisa de tratamiento de muestra, a diferencia de la plataforma 2, que sí la necesita.

Tabla 6. Comparación de las características analíticas de las plataformas analíticas desarrolladas para la determinación de antibióticos aminoglucósidos

Plataforma analítica	Analitos determinados	LOD, $\mu\text{mol L}^{-1}$	Intervalo dinámico, $\mu\text{mol L}^{-1}$	Tiempo de medida, min	DER% ^d	
					A	B
Plataforma 1 (CVD) ^a	Kanamicina	0,28	1 – 100	10	3,89	1,49
Plataforma 1 (rGO) ^b	Kanamicina	1,79	5,88 – 1000		4,55	1,26
Plataforma 2 ^c	Kanamicina	0,009	0,03 – 1000	7,5	5,47	0,95
	Estreptomicina	0,012	0,04 – 1000		4,04	1,18
	Gentamicina	0,014	0,05 – 1000		6,98	1,25
	Neomicina	0,008	0,03 – 1000		5,26	1,01

^a Resultados del uso de grafeno CVD para inmovilizar el aptámero y usando el modelo de ajuste que sigue la ecuación de Hill

^b Resultados del uso de rGO para inmovilizar el aptámero y usando el modelo de ajuste que sigue la ecuación de Hill

^c Resultados del uso de MLs con ajuste lineal

^d Desviación estándar relativa a dos concentraciones de analito: próxima al límite de cuantificación (A) y en el centro del intervalo dinámico (B)

4. Ventajas y limitaciones de las plataformas analíticas separativas/determinativas desarrolladas

Como resumen de las investigaciones descritas en esta Memoria, en la **Tabla 7** se relacionan las principales ventajas y limitaciones de las plataformas analíticas desarrolladas.

Tabla 7. Ventajas y limitaciones de las plataformas analíticas propuestas

Ventajas	Limitaciones
Síntesis, separación y caracterización de las nanoestructuras utilizadas	
Separación, purificación y caracterización de nanopartículas usando MDGC-CFS	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Técnica sencilla, rápida y económica ✓ Separación de distintas nanopartículas obtenidas en el mismo proceso de síntesis 	<ul style="list-style-type: none"> × Necesidad de una etapa de preformación del gradiente

Separación y caracterización de liposomas usando MDGC-CFS	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Técnica sencilla, rápida y económica ✓ Separación de MLs, h-Ls y h-MLs obtenidos en el mismo proceso de síntesis ✓ Establecimiento de diferencias de tamaño, forma y densidad entre MLs, h-MLs y h-MLs 	<ul style="list-style-type: none"> × Necesidad de una etapa de preformación del gradiente × Limitación en la separación de h-MLs o h-Ls con diferentes fluoróforos encapsulados de forma conjunta × Limitaciones en la monitorización la separación de e-Ls
Separación y caracterización de liposomas usando AF4-MALS	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Establecimiento de diferencias de tamaño entre liposomas con distintas especies encapsuladas: e-Ls, MLs y Ls-CV 	<ul style="list-style-type: none"> × Necesidad de estudio de múltiples variables × Tiempos elevados de medida
Propuesta de plataformas analíticas microfluídicas integradas en detectores convencionales	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Aprovechamiento de las características instrumentales de los detectores convencionales ✓ Acoplamiento basado en el uso de dispositivos económicos y sencillos de obtener 	<ul style="list-style-type: none"> × Tiempos de monitorización elevados debidos al gran volumen introducido × Uso de disolventes orgánicos para el desplazamiento del contenido del tubo de separación × Obstrucción de los canales del sistema microfluídico con disoluciones muy densas, lo que conlleva tiempos elevados de medida
Aplicación de plataformas analíticas para la evaluación de la seguridad agroalimentaria	
Desarrollo de un biosensor con detección SPR basado en el uso de aptámeros para determinación de kanamicina	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Sistema portable, económico y de fácil manejo ✓ Elevada selectividad del método gracias al aptámero inmovilizado ✓ Bajo consumo de reactivos gracias a su inmovilización ✓ Determinación de kanamicina en 10 min ✓ Análisis directo de muestras sin tratamiento previo 	<ul style="list-style-type: none"> × Determinación de un único analito, debido a la selectividad del aptámero × Baja sensibilidad, debida al detector seleccionado

Uso de magnetoliposomas híbridos para la determinación de antibióticos aminoglucósidos usando un sistema microfluídico con detección luminiscente

✓ Mejores valores de LOD que en ausencia de liposomas	× Limitación en el análisis multianalito simultáneo
✓ Bajo consumo de reactivos y muestras gracias al uso de sistemas microfluídicos y la inmovilización de uno de los reactivos	× Necesidad de pretratamiento de señal por el ruido aleatorio instrumental y por la aparición de deriva en la señal debido al electroimán
✓ Determinación de los analitos en 7,5 min	

Referencias

- [1] V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Fluorometric Determination of Alkaline Phosphatase Activity in Food Using Magnetoliposomes as On-flow Microcontainer Devices, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 1819–1825. <https://doi.org/10.1021/jf5004804>.
- [2] V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Automatic determination of coenzyme Q10 in food using cresyl violet encapsulated into magnetoliposomes, *Food Chem.* 221 (2017) 864–870. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.085>.
- [3] V. Román-Pizarro, A. Gómez-Hens, J.M. Fernández-Romero, Applicability of Fluorescent Hybrid Magnetoliposomes for the Determination of Reactive Oxygen Compounds in Food, *Food Anal. Methods.* 11 (2018) 2376–2383. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1220-3>
- [4] E.P. Gray, T.A. Bruton, C.P. Higgins, R.U. Halden, P. Westerhoff, J.F. Ranville, Analysis of gold nanoparticle mixtures: A comparison of hydrodynamic chromatography (HDC) and asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) coupled to ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1532–1539. <https://doi.org/10.1039/c2ja30069a>.

-
- [5] S. Süß, C. Metzger, C. Damm, D. Segets, W. Peukert, Quantitative evaluation of nanoparticle classification by size-exclusion chromatography, *Powder Technol.* 339 (2018) 264–272. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.08.008>.
- [6] L. Pitkänen, A.M. Striegel, Size-exclusion chromatography of metal nanoparticles and quantum dots, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 80 (2016) 311–320. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.06.013>.
- [7] A.A. Kokorina, A. V. Sapelkin, G.B. Sukhorukov, I.Y. Goryacheva, Luminescent carbon nanoparticles separation and purification, *Adv. Colloid Interface Sci.* 274 (2019) 102043. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102043>.
- [8] N. Alele, R. Streubel, L. Gamrad, S. Barcikowski, M. Ulbricht, Ultrafiltration membrane-based purification of bioconjugated gold nanoparticle dispersions, *Sep. Purif. Technol.* 157 (2016) 120–130. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.11.033>.
- [9] M. Palencia, B.L. Rivas, H. Valle, Size separation of silver nanoparticles by dead-end ultrafiltration: Description of fouling mechanism by pore blocking model, *J. Memb. Sci.* 455 (2014) 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2013.12.051>.
- [10] C.R. Arlt, D. Brekel, M. Franzreb, Continuous fractionation of nanoparticles based on their magnetic properties applying simulated moving bed chromatography, *Sep. Purif. Technol.* 259 (2021) 118123. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.118123>.
- [11] S.N. Podoyntsyn, O.N. Sorokina, A.L. Kovarski, I.I. Levin, S.B. Simakin, High-Gradient Magnetic Separation of Nanoparticles with Ferromagnetic Track-Etched Membrane, *IEEE Trans. Magn.* 54 (2018) 2300508. <https://doi.org/10.1109/TMAG.2018.2797918>.
-

- [12] C.R. Arlt, A. Tschöpe, M. Franzreb, Size fractionation of magnetic nanoparticles by magnetic chromatography, *J. Magn. Magn. Mater.* 497 (2020) 165967. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2019.165967>.
- [13] C. Contado, Field flow fractionation techniques to explore the “nano-world,” *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 2501–2518. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0180-6>.
- [14] M. Li, V.I. Slaveykova, A density gradient centrifugation method for rapid separation of nanoTiO₂ and TiO₂ aggregates from microalgal cells in complex mixtures with mercury, *MethodsX.* 7 (2020) 101057. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.101057>.
- [15] B. Xiong, J. Cheng, Y. Qiao, R. Zhou, Y. He, E.S. Yeung, Separation of nanorods by density gradient centrifugation, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 3823–3829. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2013.12.051>
- [16] D. Steinigeweg, M. Schütz, M. Salehi, S. Schlücker, Fast and cost-effective purification of gold nanoparticles in the 20–250 nm size range by continuous density gradient centrifugation, *Small* 17 (2011) 2443–2448. <https://doi.org/10.1002/sml.201100663>
- [17] L. Bai, X. Ma, J. Liu, X. Sun, D. Zhao, D.G. Evans, Rapid separation of nanoparticles in organic density gradients, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 2333–2337. <https://doi.org/10.1021/ja908971d>
- [18] O. Akbulut, C.R. MacE, R. V. Martinez, A.A. Kumar, Z. Nie, M.R. Patton, G.M. Whitesides, Separation of nanoparticles in aqueous multiphase systems through centrifugation, *Nano Lett.* 12 (2012) 4060–4064. <https://doi.org/10.1021/nl301452x>.
- [19] M.K. Rasmussen, J.N. Pedersen, R. Marie, Size and surface charge characterization of nanoparticles with a salt gradient, *Nat. Commun.* 11 (2020) 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15889-3>.

-
- [20] V. Sánchez-López, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Evaluation of liposome populations using a sucrose density gradient centrifugation approach coupled to a continuous flow system, *Anal. Chim. Acta.* 645 (2009) 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.04.045>.
- [21] S. Hupfeld, D. Ausbacher, M. Brandl, Asymmetric flow field-flow fractionation of liposomes: optimization of fractionation variables, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 1465–1470, <https://doi.org/10.1002/jssc.200800626>.
- [22] A.H. Hinna, S. Hupfeld, J. Kuntsche, M. Brandl, The use of asymmetrical flow field-flow fractionation with on-line detection in the study of drug retention within liposomal nanocarriers and drug transfer kinetics, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 124 (2016) 157–163, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.02.037>.
- [23] D.R. Arifin, A.F. Palmer, Determination of size distribution and encapsulation efficiency of liposome-encapsulated hemoglobin blood substitutes using asymmetric flow field-flow fractionation coupled with multi-angle static light scattering, *Biotechnol. Prog.* 19 (2003) 1798–1811, <https://doi.org/10.1021/bp034120x>.
- [24] S. Hupfeld, H.H. Moen, D. Ausbacher, H. Haas, M. Brandl, Liposome fractionation and size analysis by asymmetrical flow field-flow fractionation/multi-angle light scattering: influence of ionic strength and osmotic pressure of the carrier liquid, *Chem. Phys. Lipids.* 163 (2010) 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2009.10.009>.
- [25] A. Kumar, C.K. Dixit, Methods for characterization of nanoparticles, *Adv. Nanomed. Delivery Ther. Nucleic Acids* (2017) 44–58, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100557-6.00003-1>.
-

- [26] E. Goormaghtigh, G.A. Scarborough, Density-based separation of liposomes by glycerol gradient centrifugation, *Anal. Biochem.* 159 (1986) 122–131. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90316-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90316-7).
- [27] M. Sierra-Rodero, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Determination of aminoglycoside antibiotics using an on-chip microfluidic device with chemiluminescence detection, *Microchim Acta* 179 (2012) 185–192. <https://doi.org/10.1007/s00604-012-0878-2>.
- [28] M. Sierra-Rodero, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Determination of fluoroquinolone antibiotics by microchip capillary electrophoresis along with time-resolved sensitized luminescence of their terbium(III) complexes. *Microchim Acta* 181 (2014) 1897–1904. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1266-x>.
- [29] Z. Ramshani, F. Fan, A. Wei, M. Romanello-Giroud-Joaquim, C.H. Gil, M. George, M.C. Yoder, D. Hanjaya-Putra, S. Senapati, H.C. Chang, A multiplexed immuno-sensor for on-line and automated monitoring of tissue culture protein biomarkers, *Talanta*. 225 (2021) 122021. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.122021>.
- [30] L. Xu, H. Qu, D.G. Alonso, Z. Yu, Y. Yu, Y. Shi, C. Hu, T. Zhu, N. Wu, F. Shen, Portable integrated digital PCR system for the point-of-care quantification of BK virus from urine samples, *Biosens. Bioelectron.* 175 (2021) 112908. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112908>.
- [31] A.M. Zeid, J.J.M. Nasr, F. Belal, M.I. Walash, Y. Baba, N. Kaji, Determination of three antiepileptic drugs in pharmaceutical formulations using microfluidic chips coupled with light-emitting diode induced fluorescence detection, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 246 (2021) 119021. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119021>.

-
- [32] H.Y. Song, T.F. Kang, N.N. Li, L.P. Lu, S.Y. Cheng, Highly sensitive voltammetric determination of kanamycin based on aptamer sensor for signal amplification, *Anal. Methods*. 8 (2016) 3366–3372. <https://doi.org/10.1039/c6ay00152a>.
- [33] L.S. Khabbaz, M. Hassanzadeh-Khayyat, P. Zaree, M. Ramezani, K. Abnous, S.M. Taghdisi, Detection of kanamycin by using an aptamer-based biosensor using silica nanoparticles, *Anal. Methods*. 7 (2015) 8611–8616. <https://doi.org/10.1039/c5ay01807b>.
- [34] N. Zhou, J. Zhang, Y. Tian, Aptamer-based spectrophotometric detection of kanamycin in milk, *Anal. Methods*. 6 (2014) 1569–1574. <https://doi.org/10.1039/c3ay41816b>.
- [35] N.R. Ha, I.P. Jung, I.J. La, H.S. Jung, M.Y. Yoon, Ultra-sensitive detection of kanamycin for food safety using a reduced graphene oxide-based fluorescent aptasensor, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep40305>.
- [36] R. Li, Y. Liu, L. Cheng, C. Yang, J. Zhang, Photoelectrochemical aptasensing of kanamycin using visible light-activated carbon nitride and graphene oxide nanocomposites, *Anal. Chem.* 86 (2014) 9372–9375. <https://doi.org/10.1021/ac502616n>.
- [37] C.Z. Yu, Y.Z. He, G.N. Fu, H.Y. Xie, W.E. Gan, Determination of kanamycin A, amikacin and tobramycin residues in milk by capillary zone electrophoresis with post-column derivatization and laser-induced fluorescence detection, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2009) 333–338. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.12.011>.
- [38] C. Liu, C. Lu, Z. Tang, X. Chen, G. Wang, F. Sun, Aptamer-functionalized magnetic nanoparticles for simultaneous fluorometric
-

- determination of oxytetracycline and kanamycin, *Microchim. Acta.* 182 (2015) 2567–2575. <https://doi.org/10.1007/s00604-015-1628-z>.
- [39] M.L. Sánchez-Martínez, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens, Selective kinetic determination of amikacin in serum using long-wavelength fluorimetry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 1021–1027. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2003.11.015>.
- [40] S.H. Chen, Y.C. Liang, Y.W. Chou, Analysis of kanamycin A in human plasma and in oral dosage form by derivatization with 1-naphthnyl isothiocyanate and high-performance liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 607–612. <https://doi.org/10.1002/jssc.200500450>.
- [41] M.L. Sánchez-Martínez, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens, Long-wavelength homogeneous enzyme immunoassay for the determination of amikacin in water samples, *Talanta.* 78 (2009) 305–309. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.11.014>.
- [42] D.H. Kang, K. Kim, Y. Son, P.S. Chang, J. Kim, H.-S. Jung, Design of a simple paper-based colorimetric biosensor using polydiacetylene liposomes for neomycin detection, *Analyst.* 143 (2018) 4623–4629. <https://doi.org/10.1039/c8an01097h>.
- [43] L. He, Z. Shen, J. Wang, J. Zeng, W. Wang, H. Wu, Q. Wang, N. Gan, Simultaneously responsive microfluidic chip aptasensor for determination of kanamycin, aflatoxin M1, and 17 β -estradiol based on magnetic tripartite DNA assembly nanostructure probes, *Microchim. Acta.* 187 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00604-020-4155-5>.
- [44] Y. Zhang, P. Zuo, B.C. Ye, A low-cost and simple paper-based microfluidic device for simultaneous multiplex determination of different types of chemical contaminants in food, *Biosens. Bioelectron.* 68 (2015) 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.12.042>.

-
- [45] K. Zhang, N. Gan, F. Hu, X. Chen, T. Li, J. Cao, Microfluidic electrophoretic non-enzymatic kanamycin assay making use of a stirring bar functionalized with gold-labeled aptamer, of a fluorescent DNA probe, and of signal amplification via hybridization chain reaction, *Microchim. Acta.* 185 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2635-z>.
- [46] D.H. Kang, H.S. Jung, N. Ahn, J. Lee, S. Seo, K.Y. Suh, J. Kim, K. Kim, Biomimetic detection of aminoglycosidic antibiotics using polydiacetylene-phospholipids supramolecules, *Chem. Commun.* 48 (2012) 5313–5315. <https://doi.org/10.1039/c2cc31466e>.
- [47] D. Wei, H. Meng, K. Zeng, Z. Huang, Visual dual dot immunoassay for the simultaneous detection of kanamycin and streptomycin in milk, *Anal. Methods.* 11 (2019) 70–77. <https://doi.org/10.1039/c8ay02006j>.
- [48] T.A. Donegatti, A. Lobato, E.A.R. Duek, L. Moreira Gonçalves, E. Alves Pereira, Derivatization-free determination of aminoglycosides by CZE–UV in pharmaceutical formulations, *Electrophoresis.* 41 (2020) 1576–1583. <https://doi.org/10.1002/elps.202000160>.

A detailed and critical discussion of the most relevant results obtained throughout this Doctoral Thesis is addressed in this section. Although the Thesis Book is a compilation of articles (published or about to be published) and the specific results of each article have been previously discussed, the objective of this part is to highlight the advantages and limitations of the methodologies developed, as well as the comparison with other methodologies used in the scientific field for this purpose. Therefore, this section is divided into three sections, according to the stated objectives:

- **Synthesis, separation, and characterization of the used nanomaterials.** The synthesis methods of nanoparticles and liposomes are presented. Their separation and characterization with various separative analytical platforms are based on the multiphase density gradient centrifugation coupled to continuous analysis systems and the asymmetric flow-field flow fractionation technique coupled to multiangle light scattering detection.
- **Proposal of microfluidic analytical platforms integrated into conventional detection systems.** The coupling of a microfluidic system in a conventional spectrofluorimeter and the monitoring of the separative efficiency using a previously described method are addressed, comparing the results obtained with both methods.
- **Application of the analytical platforms to the aminoglycoside antibiotic residues determination useful in the agri-food evaluation.** Two determinative microfluidic analytical platforms have been studied to determine aminoglycoside antibiotic residues as models of xenobiotic compounds in food.

1. Synthesis, separation, and characterization of the used nanomaterials

As mentioned in the introduction, the synthesis of nanomaterials (NMs) involves using different procedures that allow obtain variability in shape, size, and polydispersity, although reagents residues to be eliminated also appear. This situation entails developing new separation and purification methods after the NMs synthesis. In this way, NMs with physical and chemical characteristics adequate for their analytical application have been obtained. In this section, the research carried out to propose two NMs separation and characterization methods after their synthesis has been addressed. These methods are based on separative analytical platforms in which separation and detection steps are combined in the same analytical process. The objective of these methodologies is the separation of nanostructures (NEs) to isolate the desired type for analytical use and avoid that other NEs present in the synthesis result interfere in the reaction and/or in the analytical signal originated. At the same time, the coupling of detection systems to these separative methodologies allows obtaining additional information from the synthesized NEs.

The first of the proposed separation platform is based on the multiphase density gradient centrifugation (MDGC). Although it has been used in the separation of two types of synthesized NMs: nanoparticles (NPs) (**Chapter I.1**) and liposomes (**Chapter I.2**), the different nature of the separated NMs implies the adaptation of the method for both NMs. Furthermore, another methodology based on the asymmetric flow-field flow fractionation (AF4) technique has also been proposed and applied to the separation of different liposome populations originated in the same synthesis process (**Chapter I.3**).

This section has been organized according to the type of separated NMs, differentiating between NPs and liposomes, and the advantages and weaknesses of using the different separation platforms of each of the NMs have been

discussed. The most relevant results obtained according to the synthesized NEs are discussed below.

1.1. Synthesis, purification, and characterization of NPs

The synthesis of hybrid magnetic hydrophobic NPs ($\text{Fe}_3\text{O}_4@$ AuNPs-C12SH) has been optimized previously to their separation with the separative analytical platform proposed with an MDGC basis. These hybrid NPs have been used in various analytical determinations facilitating their incorporation into the lipid bilayer of liposomes, leading to magnetoliposomes (MLs) [1–3]. After the synthesis process, a purification step is necessary, since, during this process, other NPs can also be obtained, such as gold NPs (AuNPs), hydrophobic gold (AuNPs-C12SH), magnetic (Fe_3O_4 NPs), and a core-shell ($\text{Fe}_3\text{O}_4@$ AuNPs), which are not always helpful in the analytical process. Therefore, the separation method has also been applied to each NPs mentioned above to compare the results of the global separation of $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ AuNPs-C12SH.

Before the methodologies presented here, and as already mentioned, other methodologies have been described for NPs separation and purification. These have been based on distinct techniques, including chromatographic and non-chromatographic techniques. Within chromatographic techniques, size exclusion chromatography (SEC) and hydrodynamic chromatography (HDC) have been extensively studied. However, these techniques have a low separative resolution, and the separation performance depends on the pore size of the separation matrix, so their efficiency decreases for multicomponent mixtures of NPs. On the other hand, the application of these techniques depends on the NPs size, and, in addition, nonspecific interactions with the stationary phase can occur [4–7]. The techniques based on dialysis and membrane filtration are suitable for removing solvents and other products of the NMs synthesis [8]. Another restriction they present is the possible clogging of the membrane or the possible adsorption of the NPs in it [9].

Other separation techniques have also been described taking advantage of magnetic properties of the superficial charge of NPs, such as magnetic chromatography, high gradient magnetic separation (HGMS), and capillary electrophoresis (CE, CZE) [7,10–12]. A technique that combines the ability to separate NPs according to their size and their properties or composition is the flow field fractionation (FFF) technique. However, its main limitation is the need for long times, the study of a large number of variables and does not allow a distinction between NPs, aggregates, and agglomerates, or between NPs with different shapes but with the same size, since the information obtained is of hydrodynamic radius [13].

In order to address the drawbacks presented with these techniques, the separation of NPs based on density gradient centrifugation has been proposed in this research. As mentioned, in this technique, a gradient is created with increasing density inside a centrifugation tube, the sample to be separated is added to the top of the gradient, and the tube is subjected to centrifugation. If the zonal centrifugation variant is used, as is the case of the described research, NPs have been separated according to their size, shape, and density. To date, methods to separate different NPs types have been described using sucrose, glycerol, or organic polymers gradients [7, 14–17]. Furthermore, it is evidenced that adding certain substances to the density gradient contributes to the gradient layers stabilization [18].

In this research, the choice of a multiphase density gradient stands out as a novelty to obtain gradient layers well stabilized. NPs were separated with a gradient with different sucrose concentrations, to which constant concentrations of stabilizing agents, ficoll and percoll, have been added. For the adequate separation of the hybrid NPs, the formation of the gradient has been studied, obtaining the best NPs separation with a gradient in 7 layers of 150 μL each in increasing sucrose concentrations from 5 to 50 % (v/v), except the lower layers which have a volume of 100 μL with a sucrose concentration of 55 % (v/v), thus

reaching a gradient with 1 mL volume. In all the layers, concentrations of ficoll and percoll have been kept constant to 30 and 15 % (v/v), respectively.

Another novelty of this separation methodology is applying a step before the sample introduction, in which the shape of the multiphase gradient is preset to ensure significant stability between the layers of the centrifugation medium. The best separation is achieved from the optimization of this step using a relative centrifugal force (RCF) of $4480\times g$ for 30 min. Once the gradient is preformed, 500 μL of the solution from the NPs synthesis is deposited, and the final separation occurs using an RCF of $2520\times g$ for 40 min. In **Figure 1**, different separation tubes of the different NPs types studied are shown. Subsequently, each one of the NPs has been characterized, taking the corresponding fraction and spectroscopic (FTIR and XPS) and microscopic (TEM and SEM-EDX) studies have been carried out. **Figure 1** also shows TEM images of the studied NPs.

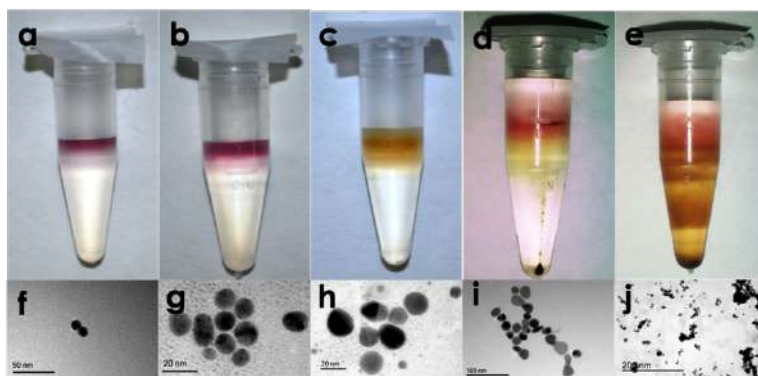


Figure 1. Images of the centrifugation tubes after separating all types of studied NPs and TEM images of them. Separation images of **a** AuNPs, **b** AuNPs-C12SH, **c** Fe_3O_4 NPs, **d** Fe_3O_4 @AuNPs, and **e** Fe_3O_4 @AuNPs-C12SH. TEM images of **f** AuNPs, **g** AuNPs-C12SH, **h** Fe_3O_4 NPs, **i** Fe_3O_4 @AuNPs, and **j** Fe_3O_4 @AuNPs-C12SH

Once the separation and characterization of the separated fractions have been carried out, the separation tube has been coupled online to a continuous flow system (CFS) to monitor each of the separated fractions through a

fluorimetric detector. As NPs do not exhibit native fluorescence, this detector has been used to perform resonant light scattering (RLS) measurements. The content of the separation tube has been aspirated between two air bubbles that delimit the beginning and the end of the tube content to carry out the monitoring, pumping the solutions at a flow rate of 0.5 mL min^{-1} to the detector.

Once the obtained separation profiles with RLS signals have been studied, the separation of $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs-C12SH}$ is evidenced, and the signal from other NPs originated in the synthesis process. Thus, different NPs appear at different times: AuNPs in the last gradient layer (130 s), AuNPs-C12SH in the sixth layer (120 s), $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ in the fifth layer (100 s), $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs}$ in the third layer (50 s), and $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs-C12SH}$ in the second layer (30 s). the introduction of the separation vial content has been carried out by aspiration from bottom to top, and it can be deduced that the larger the NP, it is retained in the layers with more density of the separation gradient.

1.2. Synthesis, separation, and characterization of liposomes

As already mentioned, a step for the liposome separation after their synthesis process is necessary. This separation can be carried out pursuing two initial objectives: to separate the synthesized liposomes from the rest of the ingredients of the synthesis process or to separate different liposome populations according to their size and structure. In the research, two liposome separation and characterization platforms have been proposed by coupling a separation technique with a detection one. These platforms are based on coupling the MDGC separation vial to a CFS and the coupling of the separation result by AF4 with a multiangle light scattering (MALS) detector.

For the liposome separation with application in the development of determinative methods regarding the rest of liposomes and reagents, a modification of the analytical platform MDGC-CFS applied to the

$\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs-C12SH}$ separation and monitoring has been developed. The separation technique by density gradient centrifugation has been used previously, for example, for the separation of exosomes with a saline gradient in organic medium [19] or in separating liposomes with cresyl violet encapsulated using a sucrose gradient [20]. In addition, an AF4-MALS method has been proposed to perform the separation and characterization of different liposome populations according to their size. As mentioned, it is a technique in which a large number of variables need to be studied, although it is a technique with significant applications in liposome separation [21–23].

Considering that liposomes can be considered tools within the analytical process or as analytes whose objective is their characterization, this second option is addressed in this section. All liposomes used in the experimental development have been synthesized following the rapid solvent evaporation (RSE) method, which consists of dissolving a mixture of phospholipids in an organic solvent to which an aqueous phase is added and evaporating the organic solvent at the phospholipid transition temperature, which associate to form a double lipid layer to produce vesicles with a different structure. Thus, different compounds, such as fluorophores, remain encapsulated in the aqueous phase, leading to hybrid liposomes. If hydrophobic compounds, such as $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs-C12SH}$, have been included during the synthesis process, they are entrapped in the lipid bilayer, giving rise to MLs. When both reagents and magnetic NMs are introduced in the same liposomal structure, hybrid MLs (h-MLs) are achieved.

The separation system based on MDGC has been applied in the separation of liposomes originated during the h-MLs synthesis process, in which the NPs previously synthesized and different fluorophores (HPTS, rhodamine B, cresyl violet, and naphthofluorescein) have been encapsulated. A multiphase density gradient has also been established with increasing sucrose concentrations, to which constant concentrations of ficoll and percoll, 30 and 15

% (v/v), respectively, have been added. The best result regarding the separation has been achieved with a gradient with a profile similar to the NPs separation. However, it differs in the partial sucrose concentration in each layer, resulting in a gradient from top to bottom of 10 to 100 % (v/v). The density gradient preformation step remains equal, centrifuging at an RCF of 4840×g for 30 min. However, the separation step is substantially different from the applied in the previous method since, although the same RCF of 2520×g is used, the time has been reduced to 20 min. In this way, the minimization of the possible liposome lysis by centrifugation at high rates, if kept for a long time, has been achieved.

Once the separation process of the liposomes by MDGC has been completed, the separation tube has been coupled using an aspiration system to the CFS with luminescent detection, constituting a separative platform similar to the one previously monitoring of NPs separation. Both the measurement of the dispersion due to the entrapped NPs, and the luminescent signal due to the presence of encapsulated fluorophores is possible by a continuous coupling of the fluorimetric detector. The signals are collected at the maximum excitation and emission wavelengths of each encapsulated fluorophore for each liposome type separated. In all cases, the monitoring of the instrumental signal has been facilitated by adding a surfactant characteristic for each fluorophore since this surfactant produces a dual effect of liposome lysis and fluorophore luminescence increase. A study with different surfactants (cationic, anionic, and non-ionic) has been carried out. The non-ionic surfactant Triton X-100 has been found to produce the most significant fluorescence increase for cresyl violet and rhodamine B fluorophores, producing a similar effect to the cationic surfactant CTAB for HPTS and naphthofluorecein. However, no significant improvements have been found when using anionic surfactants such as SDS, possibly because the negative, superficial charge of liposomes hinders the lysis and fluorophore release effect. In this study, the increasing effect of the fluorescence due to the

presence of the surfactant occurs at concentrations higher than the critical micellar concentration described for each of them.

On the one hand, both the flow from the separation vial content, as well as the surfactant flow, have been introduced at a flow rate of $0,75 \text{ mL min}^{-1}$. On the other hand, a mixture reactor length of 85 cm has been established as a compromise between the minimum length necessary for liposome lysis with the minimum dispersion of the liposome separation segments.

As the result of monitoring the separation, 5 zones in which different types of liposomes appear according to the encapsulated species have been observed. MLs always appear in zone 1 (10–20 s), corresponding to the first layer of the gradient. Hybrid liposomes with different encapsulated fluorophores appear in zone 2 (18–42 s), including the second and third layers of the gradient. However, h-MLs appear in different zones, according to the encapsulated fluorophore. Thus, h-MLs with cresyl violet, rhodamine B, and naphthofluorescein are observed in zone 3 (54–66 s), while h-MLs with HPTS are observed in zone 4 (66–90 s). In all cases, a signal also appears in zone 5 (90–130 s), corresponding to the sample zone, which is assumed to contain the non-encapsulated portion of the fluorophores and/or residues of the synthesis. The result of the separation has been confirmed by confocal microscopy, taking portions from the area where h-MLs appear in each vial. Two items are observed in the confocal microscopy images: liposomes present the fluorophores described above, and hydrophobic NPs appear in the lipid bilayer.

Regarding the second method for separation and characterization of different liposome populations by AF4-MALS coupling, the separation of different types of liposomes after their synthesis has been studied, such as empty liposomes (e-Ls), MLs, and cresyl violet liposomes (Ls-CV). A limitation of the proposed method assumes that liposomes of a relatively large size, like giant unilamellar ones (GUVs) and multivesicular ones (MVs), cannot be

introduced. After the synthesis process, the samples have been subjected to an ultrasound process to reduce the populations to size according to the fractionation interval of the NEs. The most significant variables in the separation with this technique have been studied, obtaining the optimal values for the separation shown in **Table 1**. Given the significant influence of the cross-flow in AF4, the development of this part of the process has been divided into three flow gradient profiles that suppose the use of the first step with a constant flow at 2.5 mL min^{-1} for 5 min, a second one with a linearly decreasing flow from 2.5 to 1 mL min^{-1} for 5 min and the third one with an exponentially decreasing cross flow from 1 to 0 mL min^{-1} with a 0.1 exponent for 60 min. The use of ionic modifiers in the mobile phase has been described in the literature to facilitate the separative process [24]. A HEPES buffer solution (10 mmol L^{-1} , pH 8) with 50 mmol L^{-1} NaCl has been used in this method, achieving a favorable effect in the separation without producing liposome lysis.

The online incorporation of the MALS detector provides information that allows knowing the sizes of the liposome populations separated by AF4. In general, three signals corresponding to three liposome populations for each of the studied liposome suspensions (e-Ls, MLs and Ls-CV) have been observed. Two of these three populations are similar in the three suspensions: one of 60 nm and another of 250 nm. The first population corresponds to small unilamellar vesicles (SUVs) and the second one, large unilamellar vesicles (LUVs). However, the third population has a different size according to the liposome suspension used. In the case of the e-Ls separation, a population of 350 nm appears. In the MLs separation, a population of 150 nm appears, while in the Ls-CV separation, a population of 550 nm appears. These differences in the size of the populations obtained for the different types of liposome suspensions reveal significant differences according to the zone in which the NM is entrapped, or the compound encapsulated. Thus, the hydrodynamic size is decreased if the hydrophobic NM is entrapped in the lipid bilayer, compared to e-Ls. However,

an increase in the hydrodynamic size relative to e-Ls is produced if certain compounds, such as cresyl violet, are encapsulated in the aqueous cavity. The results regarding sizes obtained with MALS are compared with those obtained with other techniques, such as DLS and TEM. The consideration of liposomes as spherical structures allows the comparison of geometric radius (R_G) obtained by AF4-MALS, the hydrodynamic radius (R_H) obtained by DLS, and the mean radius measured in TEM images.

Table 1. Variables involved in the separation by AF4 for the different types of liposomes

Separation step	Variable	Range studied	Selected value
Injection step	Injection mode	Manual, automatic	Manual
	Injection volume, μL	1 – 100	21
	Injection flow-rate, mL min^{-1}	0.2 – 2	1
	Injection time, min	1 – 5	2
Focus step	Focus flow-rate, mL min^{-1}	0.8 – 3	2
	Focusing time, min	1 – 15	4
Elution step	Isocratic cross-flow		
	Flow-rate, mL min^{-1}	0.1 – 3.5	2.5
	Time, min	1 – 50	5
	Lineal decreasing cross-flow		
	Flow-rate, mL min^{-1}	0,1 – 3	2,5 a 1
	Time, min	1 – 100	5
	Exponential decreasing cross-flow		
	Flow-rate, mL min^{-1}	0,15 – 1,5	1 a 0
	Power	0,05 – 1,4	0,1
Time, min	1 – 100	60	

With the DLS technique, the measure of the superficial charge expressed as Z potential and polydispersity index (PdI) of the NEs is also possible to carry out their characterization. These values have been measured for the involved NEs, either NPs or the different types of liposomes, and the

values obtained are shown in **Table 2**. The more negative the Z potential value, the higher its absolute value, the more excellent stability of the structure, and the smaller the vesicle size [25]. Furthermore, the closer to zero of the PDI value, the more similar is the size distribution, but the closer to the unity, the higher the size distribution has the sample. For example, in the MLs suspension, the three appeared populations have similar sizes, so the PDI value is low; however, in the Ls-CV suspension appears three populations with very different sizes; therefore the PDI is higher.

Table 2. Z potential values and polydispersity index (PDI) of the characterized NMs.

Nanomaterial	Z potential, mV	PDI
Fe ₃ O ₄ @AuNPs-C12SH	- 30,8	0,101
e-Ls	- 58,7	0,688
MLs	- 61,4	0,579
Ls-CV	- 42,9	0,719

Both separative platforms provide comparative results regarding the capacity to separate different types of liposomes and their distribution by size or structure, demonstrating their analytical utility in line with the objective set. Despite the development of the AF4-MALS method requires a higher laboriousness regarding the process optimization, this method offers more information about the liposome separation, and its results are more comprehensive. For its part, the separative platform based on the MDGC-CFS integration provides information about the distribution in separation zones, providing less numerical information about the liposome relative sizes. However, this last platform offers the advantages of being a faster methodology since it provides the separation of lipid bilayers and monitors their instrumental signals in 40 min, compared to the 80 min required in AF4-MALS, approximately in both cases.

When comparing the separations results with both platforms, the size distribution found with both methods is related. In the case of e-Ls, their sizes are relatively small because they only contain aqueous solvent. It should be noted that these liposomes cannot be monitored by the MDGC-CFS platform since there are no species capable of being monitored after the liposome lysis by the surfactant. On the other hand, the liposome size increases when different compounds are encapsulated in the aqueous cavity to host each specie according to the possible hydrodynamic interactions in that cavity.

Another factor affecting the liposome size is the surface charge density, expressed as Z potential, since, as has been said, the higher its absolute value, the greater its stability, and the lower its tendency to form aggregates [25]. On the other hand, the incidence of the different species entrapment in the lipid bilayer structure in the curvature of the liposome has been demonstrated, affecting their density because the more curvature in the curvature of the bilayer, the higher density in the liposomes [26]. $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs-C12SH}$ encapsulation, since they are NPs with a negative superficial charge according to their Z potential values, the liposome acquires more negative superficial charge, and their stability increases, ultimately resulting in smaller liposomes. Furthermore, the hydrophobic NPs remain entrapped in the hydrophobic part of the lipid bilayer, conditioning the binding threshold of these NPs with phospholipids to form thermodynamically stable liposomes. The increase in the density of these liposomes is explained by the gradient zone (zone 1), where they appear in the monitoring by MDGC-CFS.

However, when aqueous solutions containing soluble fluorophores are encapsulated in the synthesis process, they remain encapsulated in the aqueous cavity of the liposome, not influence the interactions of the phospholipids in the lipid bilayer, so the curvature of the liposome has not been altered, and higher liposomes can be formed. What can alter the surface charge of the vesicles, and so their Z potential is the fluorophore encapsulated; thus, it indirectly influences

the size of the vesicles. For example, when cresyl violet is encapsulated, positively charged, the Z potential of the liposome becomes more positive, causing a decrease in the liposome stability, which favors the size increase. This situation can also be observed in the monitoring by the MDGC-CFS platform, being these liposomes retained in zone 2 of the centrifugation gradient. When hybrid liposomes, in which the entrapment of NPs is combined with the encapsulation of fluorophores, are synthesized, a competition arises between the relative decrease in lipid curvature by the NPs effect and the variation of the aqueous cavity volume by the fluorophore charge effect. This determines the final size of the synthesized liposome. The monitoring by the MDGC-CFS platform indicates that these hybrid liposomes appear between zone 3 and 4 of the separation gradient.

1.3. Comparison in the use of MDGC for the separation of nanostructured materials

As indicated, two separative platforms based on MDGC-CFS have been developed and applied to the separation of NPs and liposomes, respectively. The characteristics of both methodologies are shown in **Table 3**, which similarities and differences are discussed below. A separation process by MDGC has been carried out in both platforms in which a multiphase gradient formed by sucrose, ficoll, and percoll has been established, being similar to the concentrations of the stabilizing agents, ficoll and percoll, varying the concentrations of sucrose in the different layers of the preformed gradient for each NM. For the separation of NPs, the sucrose concentration presents a range varying from 5 to 55 % (v/v), while the range of the gradient has an amplitude from 10 to 100 % (v/v) in sucrose concentration when synthesized h-MLs are separated. This is justified because liposomes are structures with a higher density than NPs and a denser layer in the gradient is necessary to equalize the density and thus improve the separation. For this, a final layer with a 100 % (v/v) sucrose concentration

without ficoll and percoll is added, so the layer with a 5 % (v/v) sucrose concentration is removed, so the gradient remains with the same number of layers.

Table 3. Comparison between the variables involved in the separation of Fe₃O₄@AuNPs-C12SH and h-MLs

Variable	Fe ₃ O ₄ @AuNPs-C12SH separation	h-MLs separation
Sucrose gradient, % (v/v)	5, 10, 15, 20, 30, 50 y 55	10, 20, 30, 40, 50, 55 y 100
Stabilizing agents		
Ficoll, % (v/v)	30	30
Percoll, % (v/v)	15	15
Stabilization step		
RCF, ×g	4480	4480
Time, min	30	30
Separation step		
RCF, ×g	2520	2520
Time, min	40	20

Another difference is the time required to achieve the separation of both types of synthesized NEs. Since liposomes are structures more sensitive to the effect originated by RCF, they offer higher lability against the centrifugation time. Thus, with the same experimental centrifugation conditions, the NPs require an optimal centrifugation time of 40 min, but liposomes require a reduction of the optimal separation time to 20 min because longer times involve their practical destruction. In this way, a compromise regarding the centrifugation time is established between a better separation of the NEs and their integrity.

Both MDGC-CFS platforms also differ in need to incorporate a surfactant flow that facilitates the liposome lysis and increases the fluorescence intensity of the released fluorophores when they reach the detection zone. However, this incorporation of an additional flow in the hydrodynamic

configuration of the system is not necessary for the method for NPs suspensions separation.

2. Proposal of microfluidic analytical platforms integrated into conventional detectors

An innovative aspect in the proposal of new determinative analytical platforms of interest in agri-food analysis involves integrating flow systems at a micrometric scale with conventional detectors. In this section, the results obtained in the proposal of a new analytical platform integrated into the detector are discussed (**Chapter II.1**). As already mentioned in the introduction, different forms for integrating microfluidic systems into detection systems are available, including off-chip and on-chip options.

In general, in the case of off-chip couplings, devices and apparatus operating on a macrometric scale have been used to provide the infrastructure of the coupling with the optical system. For example, bifurcated optical fiber guides focused on the reaction/detection zone and in which the radiation is carried from this point to the detector. Another option is using x-y-z alignment devices to place the focusing elements of the optical fiber in the appropriate area of the microfluidic chip, or else, to place the microfluidic chip itself in the focusing area of an up-converted microscope [27,28]. The use of these devices supposes a greater complexity to achieve the alignment of the optical pathway in the microfluidic system and requires more expensive and larger equipment. The on-chip alternative supposes a higher integration and miniaturization grade in the system since the different devices are incorporated in the microfluidic chip itself [29–31]. Despite representing the total integration between flow systems and detectors at a micrometric scale, it involves using expensive devices with a high degree of dependence on the design and manufacturing stages. For this

reason, the coupling developed in this research represents an intermediate step trying to resolve some limitations found in the previously described couplings.

This research has focused on developing a device designed by the research group to couple the microfluidic chip with a conventional detector. This coupling device is obtained by the use of the 3D printing technique. An anchoring device including the chipholder and the microfluidic chip has been manufactured to be inserted in the sample compartment of a conventional spectrofluorimeter. This device, provided with a rotary unity, allows the alignment of the microfluidic system in the focus point of the luminescent detector optical pathway.

The advantage obtained using these devices is the efficient use of the full potential of the instrumental features of these conventional detectors, affordably integrating the microfluidic system. A pinhole has been used to ensure the adequate focusing of the radiation beam on the microfluidic channel. For its part, the Horiba Fluorolog-3P spectrofluorimeter has two modes to acquire the instrumental signal, recording the emission beam with a 90° angle from the excitation beam (right-angle mode) or with a 22.5° difference between both beams (front-face mode), as can be seen in **Figure 2**. The front-face mode is used when the measurement of cloudy suspensions, optically dense, solid, or highly absorbent samples are carried out since reabsorption phenomena limit the responsiveness of the detector using the right-angle mode. The microfluidic chip is a surface that reflects light, which could interfere with adequate instrumental signal acquisition. The rotary unity of the 3D printed coupling device enables the optimization of the rotary angle of the microfluidic system that provides the maximum instrumental signal. The maximum value corresponds to a rotation angle of 45° regarding the incident beam.

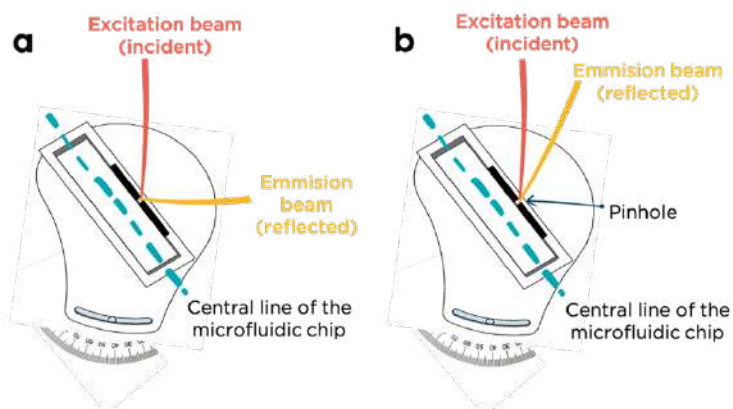


Figure 2. Scheme of the measurement modes used in the spectrofluorimeter and explain the location of the alignment device manufactured with 3D printed technology and focusing on the emission beam in the pinhole in both modes: **a** right-angle and **b** front-face.

The separative platform based on MDGC-CFS for the separation of h-MLs previously described has been adapted to assess the utility of this integrated analytical platform, replacing the continuous flow system on a conventional scale with a microfluidic system. Therefore, all devices and apparatus used in the conventional flow system have been replaced by similar elements that allow working at a micrometric scale, which has supposed a modification of the hydrodynamic features of the system and the mode to introduce the separation vial content, which include the h-MLs separated by MDGC. Regarding the working flow rate of the system, a drastic reduction has been produced due to the dimensions of the narrower channels, going from a flow rate of $500 \mu\text{L min}^{-1}$ to a flow rate of $25 \mu\text{L min}^{-1}$. On the other hand, this low flow also favors greater diffusion between channels with a laminar flow that converges in the microfluidic reactor.

Being an impulsion system, the content of the separation tube cannot be aspirated, so an organic solvent/aqueous (O/W) positive displacement system has been implemented. The organic solvent chosen has been hexane since it must be an immiscible solvent with aqueous solutions and less dense. This device, as

shown in **Figure 3**, is made up of two needles, a short one through the organic solvent is introduced above the solution contained in the separation vial and a long needle that reaches the bottom of the vial, through which the content moves towards the microfluidic mixing reactor as the organic solvent pushes it.

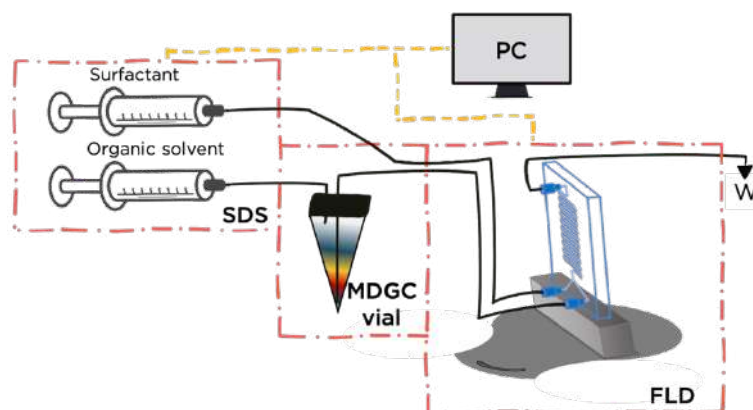


Figure 3. Scheme of the integrated microfluidic system developed for the monitoring of the h-MLs separation. SDS: syringe driven solution, FLD: fluorimetric detector, W: waste

As mentioned, the channels of the microfluidic system are narrower (approximately 250 μm), so, in addition to the problems from the diffusion in laminar flow systems, clogging problems can be caused by the passage of very dense solutions. This situation forces to carry out a new optimization in the composition of the separation gradient in such a way that the concentration levels of sucrose in the seventh layer have been readapted, reducing it to 65 % (v/v), and the concentration of the stabilizing agents ficoll and percoll has also been reduced to 20 and 10 % (v/v), respectively, to obviate the possible clogging problems. Similar to the separative platform working at a conventional flow in which this research has been based, a surfactant flow has been introduced to disrupt the liposomes, release their content and monitor the encapsulated fluorophores. The same surfactant, Triton X-100, has been kept to monitor the h-MLs suspension in which cresyl violet and rhodamine B were encapsulated separately.

The results of the instrumental signal monitoring in the integrated separative system at a microfluidic scale accord with those obtained with the monitoring at a conventional scale, highlighting the utility of the developed coupling. As seen below, the separation profiles match the different zones regarding the type of separated liposomes, but the time at which each of the separate fractions is located varies. The instrumental signal provided by the MLs has been obtained in zone 1 of the separation (6.7–11.3 min), corresponding to the lower layer of the gradient; hybrid liposomes with both fluorophores encapsulated have been found in zone 2 (11.3–22.7 min), the second and third layer; h-MLs have been found in zone 4 (34.7–40.7 min), the sixth layer; and the signal from the fluorophores not encapsulated and residues from the synthesis process appear in zone 5 (46.7–66.7 min), the sample zone.

These results allow broadening the scope of these integrated analytical platforms at a micrometric scale to propose new determination methods for evaluating agri-food safety. However, it is also worth highlighting some limitations that have arisen in this specific application of integrated microfluidic analytical platforms:

- Higher monitoring times derived from the introduction of the whole separation vial (1.5 mL). Therefore, the sample volume to be introduced in a microfluidic analytical platform would be of the nL or μ L order.
- Problems derived from the possible clogging of the channels due to the high density of the introduced solutions. Possibly, this can be avoided in other applications.
- Requirement of an O/W displacement device to introduce the sample. This can also be ignored in other applications.

3. Application of the analytical platforms for the evaluation of the agri-food safety

The last block of the experimental part of the Doctoral Thesis explains the development of two determinative analytical platforms that allow expanding their applicability in evaluating agri-food safety. These two platforms are based on two flow systems at a micrometric scale with optical detection to determine aminoglycoside antibiotic (AAG) residues in different food samples. Both platforms also constitute an example of applying microfluidic analytical methodologies to classify xenobiotic compounds in food. Both analytical platforms proposed are based on the development of (bio)sensor systems integrated into the reaction/detection zone, located in a microfluidic device integrated with spectroscopic or non-spectroscopic optical detectors.

Regarding the developed analytical platform, bidimensional NMs or hybrid magnetoliposomes have been immobilized in the reaction/detection zone to obtain the biomolecular recognition zone of the sensors. Furthermore, a surface plasmon resonance (SPR) detector in the first biosensor platform and a spectrofluorimetric detector in the second one have been used as detection systems. As a result, the following biosensor analytical platforms have been developed:

- An aptasensor based on the immobilization of the aptamer on an active surface of graphene deposited on a metallic gold monolayer placed on the surface of a surface plasmon resonance detector to determine kanamycin residues in food (**Chapter III.1**).
- A microfluidic sensor platform with fluorimetric detection using hybrid magnetoliposomes retained in the reaction/detection zone of the microfluidic system to determine aminoglycoside antibiotic residues in food samples (**Chapter III.2**).

3.1. Development of an aptasensor to determine kanamycin residues in food by surface plasmon resonance measurement

The proposal of new biosensors based on the use of aptamers to determine antibiotics is of growing interest, mainly due to the advantages of their products and features compared to the use of immunosensors, as already mentioned in the introduction [32]. Different systems to determine kanamycin based on aptamers with voltametric or luminescent detection have been described in the literature [33,34]. However, applications with SPR detection for the kanamycin determination by using aptasensors have not been described.

The easy adaptation of the SPR technique to miniaturized systems allows the development of flow sensors with fast response, easy to use, inexpensive, and additional features, such as low matrix effect, low sample, and reagents consumption and portability. The most advantageous consequence of this type of sensor results in unnecessary sample treatment. However, it has drawbacks derived from being a detector that responds to surface changes, so its sensitivity depends on the distance of the specific union, the transport of the analytes, and the specific interaction surface.

Different aptasensors have been described to determine other compounds by SPR detection in which the aptamer immobilization on the active surface of the detector is carried out with different chemical principles. One of these immobilization forms is based on the activation of the aptamer with thiolic groups to leverage the strong interaction Au-S to form self-assembled monolayers in the reaction/detection zone of the SPR detector. However, this involves forming very dense layers with aptamers, which produces steric and electrostatic hindrance, blocking the interaction with the analyte and affecting the sensitivity.

On the other hand, an alternative to immobilize the aptamer is its deposition by interaction with a graphene layer, previously deposited on the

SPR detector surface, being this mode selected in this research. The structures based on graphene offer a series of properties, such as biocompatibility, high surface ratio, π interactions between molecules, easy modification of the surface, and hydrophobicity, which favor the applicability of these NMs in the design of aptasensors. Two types of graphene obtained by two different synthesis procedures have been compared in this research to obtain the most suitable graphene surface. Thus, reduced graphene oxide (rGO) and graphene obtained by chemical vapor deposition (CVD) have been compared. The novelty of the proposed method lies in the use of CVD graphene layers for the first time to immobilize the aptamer selective to kanamycin. Until now, the immobilization of the aptamers was carried out only on rGO layers [35,36].

A systematic study of the previous steps needed for the fabrication of the aptasensor has been carried out. First, the surface of the gold layer is cleaned with ethanol and rinsed with a nitrogen stream. Then, two procedures for modifying this gold surface with two types of graphene have been carried out. For the modification with rGO, the gold surface has to be more hydrophobic, for which it has been immersed for 20 h in a 16-mercaptohexadecanoic acid solution to facilitate the diffusion and the adhesion of graphene. Afterward, the optimal amount of rGO deposited has been established, measuring by Raman spectroscopy to evaluate the result. Finally, the higher adhesion is achieved by adding 50 μL ($\beta = 250 \mu\text{g mL}^{-1}$) dispersed in a 1:1 (v/v) water and isopropanol solution, obtaining in Raman spectra the ratio between I_D/I_G characteristic bands of graphene with a value close to 1, which leads to a homogeneous layer of rGO.

For the modification with CVD graphene, the starting point is a commercial layer of CVD graphene on Cu foil that has undergone a wet transfer step to deposit CVD graphene on the detector gold surface. First, the Cu foil is removed, followed by the deposition of the graphene on the gold surface with a thermal treatment at 70 °C, and then the protective PMMA superficial layer is etched with acetone. The efficiency of the deposition process of CVD graphene

has also been characterized by Raman spectroscopy, obtaining an I_{2D}/I_G ratio close to 2 and an I_D/I_G ratio between 0.05 and 0.3, which are typical from graphene monolayers.

Once the graphene is deposited, the modification with 1-pyrenebutyric acid (PBA) has been carried out to facilitate the aptamer immobilization by covalent binding through the amino groups with which it has been functionalized. Next, an EDC-NHS solution is added to ensure the efficient binding of the aptamer, and finally, a solution with the antikanamycin aptamer was added. The successive surface modifications have been characterized by Raman spectroscopy and the SPR technique.

Table 3 shows the analytical features of the kanamycin determination with the developed aptasensor, using both rGO and CVD graphene. The relation between the analytical signal, defined by the change in response expressed in refractive index units (RIU), and the kanamycin concentration shows a sigmoidal fit, following a model similar to the Hill equation ($y = RIU_{max} \cdot x / (K_D + x)$). In addition, a linear fit has been carried out to facilitate the calculations, plotting the instrumental signal (RIU) versus the logarithm of the kanamycin concentration. As shown in **Table 3**, a dynamic range of 1 – 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, with a LOD of 0.28 $\mu\text{mol L}^{-1}$ in the case of CVD graphene, has been obtained. On the other hand, for the aptasensor with rGO in its surface, the dynamic range varies in 5.88 – 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, with a LOD of 1.79 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Therefore, the LOD values are lower in the first case due to the higher homogeneity of the CVD graphene layer, favoring a greater aptamer deposition and a more significant biospecific interaction.

Tabla 3. Características analíticas del método de determinación basado en el uso de aptasensores

Calibration curves	rGO method		CVD graphene method	
	Hill ^{a,b}	Linearization ^{a,c}	Hill ^{a,b}	Linearization ^{a,c}
Equation parameters	RIU _{max} = 1,9·10 ⁻³ (± 6,5·10 ⁻⁵) K _D = 9,1 (± 0,5) r ² = 0,997	a = 7,6·10 ⁻⁴ (± 5,8·10 ⁻⁵) b = 1,5·10 ⁻⁴ (± 3,9·10 ⁻⁵) r ² = 0,967	RIU _{max} = 2,1·10 ⁻³ (± 3,4·10 ⁻⁵) K _D = 9,6 (± 0,3) r ² = 0,998	a = 9,1·10 ⁻⁴ (± 5,1·10 ⁻⁵) b = 1,4·10 ⁻⁴ (± 2,8·10 ⁻⁵) r ² = 0,982
LOD, μmol L ⁻¹ (r = 28)	1,79	1,53	0,28	0,81
LOQ, μmol L ⁻¹ (r = 28)	5,88	3,46	0,92	1,06
Linear range, μmol L ⁻¹ (n = 7, r = 4)	5,88 – 100 ^d	3,46 – 100	1 – 100 ^d	1 – 100
RSD, % (r = 4)	4,55		3,89	
1 μmol L ⁻¹			1,49	
50 μmol L ⁻¹				

^a y = signal difference in refractive index units (RIU); x = kanamycin concentration (μmol L⁻¹)^b Hill equation: $y = \text{RIU}_{\text{max}} \cdot x / (\text{K}_D + x)$ ^c Linearization of the plotting: $y = a \cdot \log x + b$ ^d Dynamic range for Hill relation

A comparison between the results obtained with the proposed aptasensor and other techniques is established. A significant difference is shown if the results expressed in LOD terms are compared since those achieved with this method are high, in the $\mu\text{mol L}^{-1}$ order, compared with other methodologies using aptasensors kanamycin determination are below nmol L^{-1} [32,34–36]. This lower sensitivity is explained based on the detection system used since complementary analytical features have prevailed, such as ease of use, fast and portability.

On the other hand, a selectivity study of the method has been carried out, comparing the results with other antibiotics (penicillin and streptomycin), finding no significant differences in the instrumental signal for any of the antibiotics studied compared with kanamycin antibiotic. The method has been applied to kanamycin residues determination in milk by directly introducing the sample in the biosensor platform. Since no instrumental signals corresponding to the kanamycin presence in milk have been detected, a recovery study has been carried out at two kanamycin concentration levels, obtaining percentage recovery values between 94,53 and 96,24 %.

3.2. Microfluidic platform based in the use of hybrid magnetoliposomes retained to determine aminoglycoside antibiotics with fluorimetric detection

In this section of the Thesis Book, an application of the analytical platform previously developed in **Chapter II.1** is carried out to determine AAG residues as a model for evaluating agri-food safety. For that, a sensor zone has been introduced in the configuration of the microfluidic analytical platform inside the reactor, based on the magnetic retention of h-MLs with encapsulated reagents involved in the reaction. The use of h-MLs involves an increase in the sensitivity of the method since they constitute a classic example of signal

amplification systems because they limit the reaction volume to the available in the aqueous cavity of liposomes. Additionally, the use of h-MLs exerts a protective effect on the components of the analytical reaction until their transfer to the reaction/detection zone, where either the lysis of liposomes or the creation of channels that allows the incorporation of other reagents taking place the reaction within the vesicle. In this research, the determination of AAGs (kanamycin, streptomycin, gentamicin, and neomycin) has been carried out in food samples, taking advantage of the fact that this type of compound can lead to a lipid bilayer disorder, to favor this way the analytical reaction process. This has led to the need to obviate the introduction of surfactant agents to produce the liposome lysis in the reaction/detection zone used in previously described applications.

The chemical system proposed is based on the derivatization reaction of AAGs with o-phthalaldehyde (OPA) and N-acetylcysteine (NAC), giving rise to a monitored fluorescent derivate at the maximum excitation and emission wavelengths of 345 and 445 nm, respectively. Like the separative analytical platform already described previously, the importance of the coupling by incorporating an alignment device manufactured by 3D printing has to be highlighted, integrating the microfluidic chip in the sample compartment of a conventional spectrofluorimeter. Other methodologies based on fluorescent detection to determine AAGs in conventional separative/determinative analytical systems have been described in the literature [37–41]. In addition, some applications of microfluidic systems have also been described to determine these antibiotics with photometric and fluorimetric detection [27,42–45].

The synthesis of h-MLs, including hydrophobic magnetic NPs, $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs-C12SH}$, has been carried out, and the encapsulation of some of the reagents involved in the analytical reaction has been studied. To decide which compound is incorporated into the liposome, the order of addition of the reactants has been studied. On the one hand, the most stable liposomes are

formed with NAC encapsulated. On the other hand, better instrumental signals are obtained when the analyte is pre-mixed with an OPA solution, and the mixture subsequently flows to into the reaction/detection zone with the NAC solution. Before incorporating h-MLs in the determinative microfluidic platform, the liposome suspension is separated by MDGC to obtain the separated portion of h-MLs of interest.

The microfluidic platform includes an SDS system to introduce the solutions in the flow system operating at a flow rate of $25 \mu\text{L min}^{-1}$. The introduction of h-MLs through an injection valve with a $150 \mu\text{L}$ loop is carried out in a first step, followed by their magnetic retention in the reaction/detection zone of the microfluidic reactor, where the electromagnet is located. As already mentioned, the reactor is located inside the sample chamber of a conventional spectrofluorimeter, with the observation zone aligned with the optical pathway of the detector, thanks to the alignment device manufactured by 3D printing. Luminescent signal measurements have also been carried out in this application using the front-face acquisition mode of the detector. Once retained h-MLs, a solution containing a mixture of the analyte or the sample with the OPA solution is introduced by a second injection valve with a $50 \mu\text{L}$ loop.

One drawback that the method can present is the need to carry out a signal pretreatment, since, when the electromagnet is inserted into the sample chamber of the detector itself, a drift in the instrumental signal has been produced, and it must be corrected. However, this drift does not influence the analytical signal taken into account for the calibration of the proposed method if this signal pretreatment is carried out. Furthermore, the acquired signal also present noise, so signal smoothing has to be carried out to obviate the random noise from the instrument. An adjacent average method has been used to carry out the signal smoothing, taking the mean of every 21 points, which achieves this smoothing without losing information about the instrumental signal.

Parallel to the development of the method based on the microfluidic analytical platform, a similar methodology has been developed, but without using the amplification system with h-MLs to determine the four AAGs. **Table 4** shows the analytical features found with both methodologies. As can be observed, better results are obtained in the mode using the amplification system with h-MLs, if the sensitivity parameters (slope of the calibration curve and LOD values) are compared.

A comparison with other described methods has also been carried out for AAGs determination in which microfluidic systems or liposomes as amplification devices described in the literature have been used. This comparison is shown in **Table 5**. In the first place, no methodologies have been found that combine both characteristics, so the proposed method supposes a novelty in developing these analytical platforms. Most of the methods described in the literature describe determination methods for a single AAG or a significantly reduced group from them, so few techniques are using separative techniques to carry out the separation of the different AAG types previous to their determination. The most studied AAG to determine is kanamycin antibiotic, commonly used as a model for applying the determinative method to other antibiotics. The microfluidic analytical platform proposed facilitates the AAGs determination in a more comprehensive linear range. Five orders of magnitude linear range are obtained with this platform, compared with the two or three orders of magnitude allowed by other techniques. Furthermore, the LOD values obtained using fluorimetric detection have been lower than those using other detection techniques [27,42,44]. The precision, measured in terms of relative standard deviation (RSD%), of all the methods have similar values, being within the accepted limits.

Table 4. Analytical features of the method.

Analyte	Kanamycin		Streptomycin		Gentamicin		Neomycin	
	With h-MLs	Without h-MLs	With h-MLs	Without h-MLs	With h-MLs	Without h-MLs	With h-MLs	Without h-MLs
Equation parameters								
a ($\pm s_a$)	26.57 (± 0.39)	8.92 (± 0.13)	27.57 (± 0.73)	7.22 (± 0.21)	20.08 (± 0.49)	2.15 (± 0.33)	29.71 (± 0.34)	9.09 (± 0.11)
b ($\pm s_b$)	128.62 (± 2.14)	0.65 (± 0.004)	180.49 (± 4.96)	0.69 (± 0.002)	104.32 (± 0.15)	1.079 (± 0.005)	117.66 (± 4.73)	0.766 (± 0.001)
r ²	0.998	0.997	0.992	0.991	0.990	0.993	0.997	0.996
LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0.009	0.59	0.012	0.92	0.014	0.92	0.008	0.43
Linear range ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0.03 – 1000	2 – 1000	0.04 – 1000	3 – 1000	0.05 – 1000	3 – 1000	0.03 – 1000	1.5 – 1000
RSD (%) ^a								
A	5.47	5.43	4.04	5.59	6.98	5.78	5.26	6.21
B	0.95	0.88	1.18	0.91	1.25	1.96	1.01	0.98

^a RSD% values ($n = 7$, $r = 3$) was achieved at two concentration levels, which correspond to the LOQ (low level) and the middle of the linear range (high level), respectively.

Table 5. Comparison of analytical features for AAGs determination with different methods

Method/ Chemical system	AAG	Linear range, $\mu\text{mol L}^{-1}$	LOD, $\mu\text{mol L}^{-1}$	RSD %	Measurement time, min	Sample / Pretreatment	Recovery, %	Reference
Kinetic stopped-flow method with fluorimetry detection	Amikacin	0.10 – 5.12	0.034	4.8 – 6	0.083	Serum / Protein precipitation with acetonitrile	89.4 – 104.7	39
Chemiluminescence microfluidic system	Neomycin	0.3 – 3.3	0.09	4.4 – 5.0	4	Water / Filtered with a 0.45- μm syringe filter	80 – 120	27
	Streptomycin	0.9 – 13.7	0.28	0.8 – 2.5				
	Amikacin	0.8 – 8.5	0.24	1.1 – 4.6				
Aptamer microfluidic device with fluorimetric detection	Neomycin	0 – 2	0.153	N/A	10	Water / No pretreatment	87.5 – 116	44
Aptamer-functionalized $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ with fluorimetric detection	Kanamycin	$1.7 \cdot 10^{-3}$ – 0.086	$1.6 \cdot 10^{-3}$	3.43 – 7.38	80	Pork, milk, and honey / Protein precipitation with trichloroacetic acid and/or extraction, followed by a dilution	77.8 – 93.1	38
Liposome colorimetric and fluorimetric sensor	Neomycin	0.1 – 50	0.1	N/A	20	N/A	N/A	46
	Kanamycin	1.1 – 110	1.1	N/A	60	N/A	N/A	42
Visual dot ELISA	Streptomycin	$6 \cdot 10^{-4}$ – 0.066	$5 \cdot 10^{-3}$	N/A	131	Milk / Centrifugation and dilution	84.2 – 119.8	47
	Gentamicin	$5 \cdot 10^{-3}$ – 0.07	0.027	N/A			93.3 – 124.5	
CZE-UV	Paromomycin	64.5 – 1290	6.99	0.9 – 8.9	13	Pharma-ceutical solutions / Dilution or extraction with dichloromethane followed by dilution	96 – 106	48
	Neomycin	54.9 – 1096.4	17.9	1.5 – 9.7			96 – 104	
Liposome-based system with fluorescence detection	Kanamycin	0.03 – 1000	$9 \cdot 10^{-3}$	0.95 – 5.47	7.5	Milk, chicken, and pork muscles / Protein precipitation with trichloroacetic acid and/or extraction, followed by filtration through a 0.2- μm membrane and dilution	87.2 – 107.4	This work
	Streptomycin	0.04 – 1000	0.012	1.18 – 4.04				
	Gentamicin	0.05 – 1000	0.014	1.25 – 6.98				
	Neomycin	0.03 – 1000	$8 \cdot 10^{-3}$	1.01 – 5.26				

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; LC-MS/MS, liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry; CZE, capillary zone electrophoresis; UV, ultraviolet; ESI-MS, electrospray ionization mass spectrometry; OPA, o-phthalaldehyde; NAC, N-acetyl-cysteine

Few techniques use methodologies based on kinetic measurements [39], so most of the methodologies require time to carry out the analytical reaction and monitor the produced signal in the detector. However, within the methodologies that do not use kinetic methodologies, the proposed platform allows monitoring of the instrumental signal to determine the analytes in a shorter time than others previously established [38,42,47]. This is because the platform is based in the use of microfluidic systems and the use of a high volume of sample and reagents is not necessary and the flows reach the detector earlier, detecting the instrumental signal earlier. Furthermore, the analytical reaction occurs quickly, not being necessary to use high times to obtain the fluorescent product, proportional to the AAG concentration.

The method has been applied to determine aminoglycoside antibiotic residues in different food samples, such as milk and animal muscles (from chicken and pork), pretreating and analyzing those samples without observing the presence of mentioned antibiotics. Therefore, a recovery study was carried out, adding two antibiotic concentrations, kanamycin, obtaining values between 87.2 and 107.4 %. Most of the AAGs determination methods described in the literature have been applied to their determination in food and pharmaceuticals, so these methods require a previous step to treat these samples. Nevertheless, the recovery percentages obtained in all described methods are within the permitted limits.

3.3. General comparison of both proposed methodologies to determine aminoglycoside antibiotics

The final aim of the developed methods has been proposing alternatives based on microfluidic systems to the methods that currently exist to determine this type of analytes. Different options have been approached to reach this objective, although both analytical platforms developed are based on microfluidic systems and immobilization of species in the reaction/detection

zone. In the first method, the molecular recognition ability of the immobilized aptamers is used to form a biosensor monitoring the change in the resonance plasmon of the surface when the analytes interact. The second method is based on the measurement of the fluorescence originating when the analytes are derivatized, immobilizing one of the derivatizing agents with MLs to achieve a signal amplification.

The main analytical features of each analytical platform developed are compared below. **Table 6** shows the analytical features obtained for each assayed analyte using the aptasensor (platform 1) and the magnetically retained MLs (platform 2). As can be observed, the LOD values achieved with the second method are lower than the ones achieved with the first method. This is due to the used detector and the analytical features considered necessary in each method. In the first method, portability is more important, but in the second, sensitivity is. Regarding dynamic range assayed, this feature is higher in the second method. However, the precision values expressed in RSD% are slightly better in the first method, although the differences cannot be considered significant.

The sampling frequency is slightly higher with the first platform, with a 6 h^{-1} compared to the 8 h^{-1} of the second one. Although it is noteworthy that platform 1 does not require sample treatment, unlike platform 2, which does require it.

Table 6. Comparison of the analytical features of the analytical platforms developed to determine aminoglycoside antibiotics

Analytical platform	Determined analytes	LOD, $\mu\text{mol L}^{-1}$	Dynamic range, $\mu\text{mol L}^{-1}$	Measurement time, min	RSD% ^d	
					A	B
Plataform 1 (CVD) ^a	Kanamycin	0.28	1 – 100	10	3.89	1.49
Plataform 1 (rGO) ^b	Kanamycin	1.79	5.88 – 1000		4.55	1.26
Plataform 2 ^c	Kanamycin	0.009	0.03 – 1000	7,5	5.47	0.95
	Estreptomycin	0.012	0.04 – 1000		4.04	1.18
	Gentamicin	0.014	0.05 – 1000		6.98	1.25
	Neomycin	0.008	0.03 – 1000		5.26	1.01

^a Results for the use of CVD graphene to immobilize the aptamer and using the fit model with the Hill equation

^b Results for the use of rGO to immobilize the aptamer and using the fit model with the Hill equation

^c Results for the use of MLs with a linear fit

^d Relative standard deviation at two analyte concentrations: close to the limit of quantification (A) and y the center of the dynamic range (B)

4. Advantages and constraints of the developed methods

As a summary of the research described in this Thesis Book, **Table 7** lists the main advantages and constraints of the analytical methodologies developed.

Table 7. Advantages and constraints of the proposal platforms

Advantages	Constraints
Synthesis, separation, and characterization of the used nanostructures	
Separation, purification, and characterization of nanoparticles using MDGC-CFS	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Simple, fast, and inexpensive technique ✓ Separation of different nanoparticles obtained in the same synthesis process 	<ul style="list-style-type: none"> × Need for a gradient preform step

Separation and characterization of liposomes using MDGC-CFS	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Simple, fast, and inexpensive technique ✓ Separation of MLs, h-Ls, and h-MLs obtained in the same synthesis process ✓ Establishment of differences in size, shape, and density between MLs, h-MLs, and h-MLs 	<ul style="list-style-type: none"> × Need for a gradient preform step × Limit in the separation of h-MLs or h-Ls with different fluorophores jointly encapsulated × Limit in monitor of the separation of e-Ls
Separation and characterization of liposomes using AF4-MALS	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Establishment of differences in size between liposomes with different encapsulated species: e-Ls, MLs, and Ls-CV 	<ul style="list-style-type: none"> × Need for study high number of variables × High measurement times
Proposal of microfluidic analytical platforms integrated into conventional detectors	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Taking advantage of the instrumental features of conventional detectors ✓ Coupling based on the use of inexpensive and easy to obtain devices 	<ul style="list-style-type: none"> × High monitoring times due to the high volume introduced × Use of organic solvents for the displacement of the content of the separation tube × Clogging of the channels of the microfluidic system with very high dense solutions, which leads to high measurement times
Application of analytical platforms for the evaluation of the agri-food safety	
Development of a biosensor with SPR detection based on the use of aptamers to determine kanamycin	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Portable, inexpensive, and easy to use system ✓ High selectivity of the method thanks to the immobilized aptamer ✓ Low reagents consumption due to their immobilization ✓ Kanamycin determination in 10 min ✓ Direct analysis of samples without previous pretreatment 	<ul style="list-style-type: none"> × Determination of an only analyte, due to the high selectivity of the aptamer × Low sensitivity due to the selected detector

Use of hybrid magnetoliposomes to determine aminoglycoside antibiotics using a microfluidic system with luminescence detection

✓ Better LOD values than in the absence of liposomes	× Limit in the simultaneous multianalyte analysis
✓ Low reagents and samples consumption thanks to the use of microfluidic systems and the immobilization of one of the reagents	× Need for signal pretreatment due to the random instrumental noise and due to the appearance of a drift in the signal for the electromagnet
✓ Determination of the analytes in 7.5 min	

References

- [1] V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Fluorometric Determination of Alkaline Phosphatase Activity in Food Using Magnetoliposomes as On-flow Microcontainer Devices, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 1819–1825. <https://doi.org/10.1021/jf5004804>.
- [2] V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Automatic determination of coenzyme Q10 in food using cresyl violet encapsulated into magnetoliposomes, *Food Chem.* 221 (2017) 864–870. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.085>.
- [3] V. Román-Pizarro, A. Gómez-Hens, J.M. Fernández-Romero, Applicability of Fluorescent Hybrid Magnetoliposomes for the Determination of Reactive Oxygen Compounds in Food, *Food Anal. Methods.* 11 (2018) 2376–2383. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1220-3>
- [4] E.P. Gray, T.A. Bruton, C.P. Higgins, R.U. Halden, P. Westerhoff, J.F. Ranville, Analysis of gold nanoparticle mixtures: A comparison of hydrodynamic chromatography (HDC) and asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) coupled to ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1532–1539. <https://doi.org/10.1039/c2ja30069a>.

- [5] S. Süß, C. Metzger, C. Damm, D. Segets, W. Peukert, Quantitative evaluation of nanoparticle classification by size-exclusion chromatography, *Powder Technol.* 339 (2018) 264–272. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.08.008>.
- [6] L. Pitkänen, A.M. Striegel, Size-exclusion chromatography of metal nanoparticles and quantum dots, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 80 (2016) 311–320. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.06.013>.
- [7] A.A. Kokorina, A. V. Sapelkin, G.B. Sukhorukov, I.Y. Goryacheva, Luminescent carbon nanoparticles separation and purification, *Adv. Colloid Interface Sci.* 274 (2019) 102043. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102043>.
- [8] N. Alele, R. Streubel, L. Gamrad, S. Barcikowski, M. Ulbricht, Ultrafiltration membrane-based purification of bioconjugated gold nanoparticle dispersions, *Sep. Purif. Technol.* 157 (2016) 120–130. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.11.033>.
- [9] M. Palencia, B.L. Rivas, H. Valle, Size separation of silver nanoparticles by dead-end ultrafiltration: Description of fouling mechanism by pore blocking model, *J. Memb. Sci.* 455 (2014) 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2013.12.051>.
- [10] C.R. Arlt, D. Brekel, M. Franzreb, Continuous fractionation of nanoparticles based on their magnetic properties applying simulated moving bed chromatography, *Sep. Purif. Technol.* 259 (2021) 118123. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.118123>.
- [11] S.N. Podoynitsyn, O.N. Sorokina, A.L. Kovarski, I.I. Levin, S.B. Simakin, High-Gradient Magnetic Separation of Nanoparticles with Ferromagnetic Track-Etched Membrane, *IEEE Trans. Magn.* 54 (2018) 2300508. <https://doi.org/10.1109/TMAG.2018.2797918>.

- [12] C.R. Arlt, A. Tschöpe, M. Franzreb, Size fractionation of magnetic nanoparticles by magnetic chromatography, *J. Magn. Magn. Mater.* 497 (2020) 165967. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2019.165967>.
- [13] C. Contado, Field flow fractionation techniques to explore the “nano-world,” *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 2501–2518. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0180-6>.
- [14] M. Li, V.I. Slaveykova, A density gradient centrifugation method for rapid separation of nanoTiO₂ and TiO₂ aggregates from microalgal cells in complex mixtures with mercury, *MethodsX.* 7 (2020) 101057. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.101057>.
- [15] B. Xiong, J. Cheng, Y. Qiao, R. Zhou, Y. He, E.S. Yeung, Separation of nanorods by density gradient centrifugation, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 3823–3829. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2013.12.051>
- [16] D. Steinigeweg, M. Schütz, M. Salehi, S. Schlücker, Fast and cost-effective purification of gold nanoparticles in the 20–250 nm size range by continuous density gradient centrifugation, *Small* 17 (2011) 2443–2448. <https://doi.org/10.1002/sml.201100663>
- [17] L. Bai, X. Ma, J. Liu, X. Sun, D. Zhao, D.G. Evans, Rapid separation of nanoparticles in organic density gradients, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 2333–2337. <https://doi.org/10.1021/ja908971d>
- [18] O. Akbulut, C.R. MacE, R. V. Martinez, A.A. Kumar, Z. Nie, M.R. Patton, G.M. Whitesides, Separation of nanoparticles in aqueous multiphase systems through centrifugation, *Nano Lett.* 12 (2012) 4060–4064. <https://doi.org/10.1021/nl301452x>.
- [19] M.K. Rasmussen, J.N. Pedersen, R. Marie, Size and surface charge characterization of nanoparticles with a salt gradient, *Nat. Commun.* 11 (2020) 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15889-3>.

- [20] V. Sánchez-López, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Evaluation of liposome populations using a sucrose density gradient centrifugation approach coupled to a continuous flow system, *Anal. Chim. Acta.* 645 (2009) 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.04.045>.
- [21] S. Hupfeld, D. Ausbacher, M. Brandl, Asymmetric flow field-flow fractionation of liposomes: optimization of fractionation variables, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 1465–1470, <https://doi.org/10.1002/jssc.200800626>.
- [22] A.H. Hinna, S. Hupfeld, J. Kuntsche, M. Brandl, The use of asymmetrical flow field-flow fractionation with on-line detection in the study of drug retention within liposomal nanocarriers and drug transfer kinetics, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 124 (2016) 157–163, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.02.037>.
- [23] D.R. Arifin, A.F. Palmer, Determination of size distribution and encapsulation efficiency of liposome-encapsulated hemoglobin blood substitutes using asymmetric flow field-flow fractionation coupled with multi-angle static light scattering, *Biotechnol. Prog.* 19 (2003) 1798–1811, <https://doi.org/10.1021/bp034120x>.
- [24] S. Hupfeld, H.H. Moen, D. Ausbacher, H. Haas, M. Brandl, Liposome fractionation and size analysis by asymmetrical flow field-flow fractionation/multi-angle light scattering: influence of ionic strength and osmotic pressure of the carrier liquid, *Chem. Phys. Lipids.* 163 (2010) 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2009.10.009>.
- [25] A. Kumar, C.K. Dixit, Methods for characterization of nanoparticles, *Adv. Nanomed. Delivery Ther. Nucleic Acids* (2017) 44–58, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100557-6.00003-1>.

- [26] E. Goormaghtigh, G.A. Scarborough, Density-based separation of liposomes by glycerol gradient centrifugation, *Anal. Biochem.* 159 (1986) 122–131. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90316-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90316-7).
- [27] M. Sierra-Rodero, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Determination of aminoglycoside antibiotics using an on-chip microfluidic device with chemiluminescence detection, *Microchim Acta* 179 (2012) 185–192. <https://doi.org/10.1007/s00604-012-0878-2>.
- [28] M. Sierra-Rodero, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Determination of fluoroquinolone antibiotics by microchip capillary electrophoresis along with time-resolved sensitized luminescence of their terbium(III) complexes. *Microchim Acta* 181 (2014) 1897–1904. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1266-x>.
- [29] Z. Ramshani, F. Fan, A. Wei, M. Romanello-Giroud-Joaquim, C.H. Gil, M. George, M.C. Yoder, D. Hanjaya-Putra, S. Senapati, H.C. Chang, A multiplexed immuno-sensor for on-line and automated monitoring of tissue culture protein biomarkers, *Talanta*. 225 (2021) 122021. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.122021>.
- [30] L. Xu, H. Qu, D.G. Alonso, Z. Yu, Y. Yu, Y. Shi, C. Hu, T. Zhu, N. Wu, F. Shen, Portable integrated digital PCR system for the point-of-care quantification of BK virus from urine samples, *Biosens. Bioelectron.* 175 (2021) 112908. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112908>.
- [31] A.M. Zeid, J.J.M. Nasr, F. Belal, M.I. Walash, Y. Baba, N. Kaji, Determination of three antiepileptic drugs in pharmaceutical formulations using microfluidic chips coupled with light-emitting diode induced fluorescence detection, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 246 (2021) 119021. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119021>.

- [32] H.Y. Song, T.F. Kang, N.N. Li, L.P. Lu, S.Y. Cheng, Highly sensitive voltammetric determination of kanamycin based on aptamer sensor for signal amplification, *Anal. Methods*. 8 (2016) 3366–3372. <https://doi.org/10.1039/c6ay00152a>.
- [33] L.S. Khabbaz, M. Hassanzadeh-Khayyat, P. Zaree, M. Ramezani, K. Abnous, S.M. Taghdisi, Detection of kanamycin by using an aptamer-based biosensor using silica nanoparticles, *Anal. Methods*. 7 (2015) 8611–8616. <https://doi.org/10.1039/c5ay01807b>.
- [34] N. Zhou, J. Zhang, Y. Tian, Aptamer-based spectrophotometric detection of kanamycin in milk, *Anal. Methods*. 6 (2014) 1569–1574. <https://doi.org/10.1039/c3ay41816b>.
- [35] N.R. Ha, I.P. Jung, I.J. La, H.S. Jung, M.Y. Yoon, Ultra-sensitive detection of kanamycin for food safety using a reduced graphene oxide-based fluorescent aptasensor, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep40305>.
- [36] R. Li, Y. Liu, L. Cheng, C. Yang, J. Zhang, Photoelectrochemical aptasensing of kanamycin using visible light-activated carbon nitride and graphene oxide nanocomposites, *Anal. Chem.* 86 (2014) 9372–9375. <https://doi.org/10.1021/ac502616n>.
- [37] C.Z. Yu, Y.Z. He, G.N. Fu, H.Y. Xie, W.E. Gan, Determination of kanamycin A, amikacin and tobramycin residues in milk by capillary zone electrophoresis with post-column derivatization and laser-induced fluorescence detection, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2009) 333–338. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.12.011>.
- [38] C. Liu, C. Lu, Z. Tang, X. Chen, G. Wang, F. Sun, Aptamer-functionalized magnetic nanoparticles for simultaneous fluorometric

- determination of oxytetracycline and kanamycin, *Microchim. Acta.* 182 (2015) 2567–2575. <https://doi.org/10.1007/s00604-015-1628-z>.
- [39] M.L. Sánchez-Martínez, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens, Selective kinetic determination of amikacin in serum using long-wavelength fluorimetry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 1021–1027. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2003.11.015>.
- [40] S.H. Chen, Y.C. Liang, Y.W. Chou, Analysis of kanamycin A in human plasma and in oral dosage form by derivatization with 1-naphthnyl isothiocyanate and high-performance liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 607–612. <https://doi.org/10.1002/jssc.200500450>.
- [41] M.L. Sánchez-Martínez, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens, Long-wavelength homogeneous enzyme immunoassay for the determination of amikacin in water samples, *Talanta.* 78 (2009) 305–309. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.11.014>.
- [42] D.H. Kang, K. Kim, Y. Son, P.S. Chang, J. Kim, H.-S. Jung, Design of a simple paper-based colorimetric biosensor using polydiacetylene liposomes for neomycin detection, *Analyst.* 143 (2018) 4623–4629. <https://doi.org/10.1039/c8an01097h>.
- [43] L. He, Z. Shen, J. Wang, J. Zeng, W. Wang, H. Wu, Q. Wang, N. Gan, Simultaneously responsive microfluidic chip aptasensor for determination of kanamycin, aflatoxin M1, and 17 β -estradiol based on magnetic tripartite DNA assembly nanostructure probes, *Microchim. Acta.* 187 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00604-020-4155-5>.
- [44] Y. Zhang, P. Zuo, B.C. Ye, A low-cost and simple paper-based microfluidic device for simultaneous multiplex determination of different types of chemical contaminants in food, *Biosens. Bioelectron.* 68 (2015) 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.12.042>.

- [45] K. Zhang, N. Gan, F. Hu, X. Chen, T. Li, J. Cao, Microfluidic electrophoretic non-enzymatic kanamycin assay making use of a stirring bar functionalized with gold-labeled aptamer, of a fluorescent DNA probe, and of signal amplification via hybridization chain reaction, *Microchim. Acta.* 185 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2635-z>.
- [46] D.H. Kang, H.S. Jung, N. Ahn, J. Lee, S. Seo, K.Y. Suh, J. Kim, K. Kim, Biomimetic detection of aminoglycosidic antibiotics using polydiacetylene-phospholipids supramolecules, *Chem. Commun.* 48 (2012) 5313–5315. <https://doi.org/10.1039/c2cc31466e>.
- [47] D. Wei, H. Meng, K. Zeng, Z. Huang, Visual dual dot immunoassay for the simultaneous detection of kanamycin and streptomycin in milk, *Anal. Methods.* 11 (2019) 70–77. <https://doi.org/10.1039/c8ay02006j>.
- [48] T.A. Donegatti, A. Lobato, E.A.R. Duek, L. Moreira Gonçalves, E. Alves Pereira, Derivatization-free determination of aminoglycosides by CZE–UV in pharmaceutical formulations, *Electrophoresis.* 41 (2020) 1576–1583. <https://doi.org/10.1002/elps.202000160>.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONS



En la presente Memoria se han desarrollado diferentes plataformas analíticas separativas y/o determinativas con diferente grado de integración con sistemas dinámicos de flujo convencional o desarrollados a escala microfluídica, para la monitorización de la eficacia en la separación de los nanomateriales híbridos sintetizados, así como para la determinación de residuos de antibióticos aminoglucósidos en alimentos. A continuación, se resumen las conclusiones más relevantes de las investigaciones realizadas:

1. Se han sintetizado y caracterizado diferentes tipos de nanomateriales híbridos, mediante modificaciones innovadoras de métodos clásicos. Cabe destacar los siguientes nanomateriales:
 - Nanopartículas (NPs) híbridas con estructura *core-shell* con un núcleo de magnetita recubiertas con NPs de oro y haciendo su superficie hidrofóbica ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs-C12SH}$), que se han utilizado para su incorporación en la bicapa lipídica para formar magnetoliposomas (MLs).
 - Liposomas híbridos sintetizados mediante la metodología de evaporación rápida de disolvente (RSE), permitiendo la incorporación de materiales con diferente funcionalidad a lo largo del proceso analítico. El encapsulamiento de estos materiales diversos dentro de los liposomas ha aportado aspectos innovadores en las metodologías desarrolladas, aportando una gran utilidad como contenedores analíticos: a) como dispositivos de transporte y de protección del material encapsulado a lo largo del proceso analítico, especialmente de compuestos involucrados en las reacciones analíticas, b) como dispositivos con capacidad magnética que facilita su retención en zonas claves de reacción/detección del proceso (bio)analítico, y c) como dispositivo con funciones de

- amplificación de la señal instrumental, ya que permiten el atrapamiento/liberación de reactivos preconcentrados en el interior de la vesícula lipídica.
- Nanomateriales de carbono bidimensional (grafeno) utilizados como estructura base para la inmovilización de aptámeros selectivos en el diseño de un sensor aptamérico en continuo con detección mediante plasmón de resonancia superficial (SPR).
2. Se han desarrollado diferentes plataformas analíticas separativas que permiten monitorizar el rendimiento de la eficacia en la separación de los nanomateriales sintetizados y de los residuos originados después de los procesos de síntesis. El proceso de separación se ha llevado a cabo mediante el uso de la metodología de centrifugación en gradiente multifase de densidad (MDGC). Se ha estudiado el empleo de diferentes materiales con capacidad separativa en base a su efecto sobre la velocidad de sedimentación, así como el establecimiento de diferentes perfiles en el gradiente de centrifugación. Se han desarrollado dos tipos de plataformas separativas basadas en el empleo de sistemas dinámicos de flujo continuo a escala convencional y a escala micrométrica. Se han empleado diferentes sistemas de monitorización de la señal instrumental con diferente fundamento en función del tipo de nanomaterial separado, ya sea mediante medida de la dispersión de la radiación o mediante medida de la emisión luminiscente de los fluoróforos involucrados.
 3. Se han separado diferentes poblaciones de liposomas híbridos mediante el uso de la técnica de fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico con detección de dispersión de la radiación multiángulo acoplada en línea (AF4-MALS).
 4. Se ha establecido por primera vez una plataforma analítica integrada mediante el acoplamiento de un sistema microfluídico en el compartimento

- de muestra de un espectrofluorímetro convencional mediante el uso de un dispositivo de anclaje y focalización fabricado mediante tecnología de impresión 3D. Esta plataforma analítica se ha utilizado para la monitorización del resultado de la separación mediante MDGC de diferentes tipos de liposomas híbridos sintetizados.
5. Se ha desarrollado una plataforma analítica fundamentada en un biosensor aptamérico para la determinación de kanamicina en leche mediante la integración de nanomateriales de carbono bidimensional de grafeno depositado en la monocapa de oro situada en la superficie sensora del sistema de flujo acoplado en un detector de plasmón de resonancia superficial.
 6. Se ha demostrado la utilidad de una plataforma analítica microfluídica integrada mediante tecnología 3D dentro de detectores luminiscentes convencionales en la que se han incorporado MLs híbridos (que contienen Fe_3O_4 @AuNPs-C12SH y N-acetilcisteína) para la determinación de residuos de antibióticos aminoglucósidos en muestras de alimentos, utilizando a su vez o-ftalaldehído como reactivo derivatizante.

In this Thesis Book, different separative and/or determinative analytical platforms have been developed with different degrees of integration with the conventional dynamic flow or microfluidic systems to monitor the efficiency of the synthesized hybrid nanomaterials separation as for determining aminoglycoside antibiotic residues in food. The most relevant conclusions of the research carried out are summarized below:

1. Different types of hybrid nanomaterials have been synthesized and characterized through innovative modifications of classical methods. The following nanomaterials should be highlighted:
 - Core-shell hybrid nanoparticles (NPs) with a magnetite core coated with gold NPs and a hydrophobic surface ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs-C12SH}$) have been used for their incorporation into the lipid bilayer to form magnetoliposomes (MLs).
 - Hybrid liposomes synthesized using the rapid solvent evaporation (RSE) methodology, allowing the incorporation of materials with different functions throughout the analytical process. Furthermore, the encapsulation of these different materials within liposomes has provided innovative aspects in the developed methodologies, giving great usefulness as analytical containers: a) as transport and protection devices for encapsulated material through the analytical process, especially of compounds involved in the analytical reactions, b) as containers with magnetic properties that allow their retention in key reaction/detection areas of the (bio)analytical process, and c) as devices with amplification of the instrumental signal functions, since they allow the entrapment/release of pre-concentrated reagents inside the lipid vesicle.

- Two-dimensional carbon nanomaterials (graphene) are used as a base structure for the immobilization of selective aptamers to design a continuous aptameric sensor with surface resonance plasmon detection (SPR).
2. Different separative analytical platforms to monitor the efficiency of the synthesized nanomaterials separation and the residues originated after the synthesis process have been developed. The separation process has been carried out by the multiphase density gradient centrifugation (MDGC) method. Different materials with separative capacity related to their effect in the sedimentation rate and the different separation profiles establishment in the centrifugation gradient have been studied. Two types of separative platforms based on dynamic continuous flow systems at conventional and microfluidic scales have been developed. In addition, different instrumental signal monitoring systems with different bases depending on the separated nanomaterial have been used, either by measuring the resonance light scattering or the luminescent emission of the involved fluorophores.
 3. Different liposome populations using the asymmetric field flow field fractionation with online coupled detection multi-angle light scattering detection (AF4-MALS) techniques have been separated.
 4. An integrated analytical platform has been established for the first time by coupling a microfluidic system in the sample compartment of a conventional spectrofluorimeter using an anchoring and targeting device manufactured by 3D printing technology. This analytical platform has been applied to monitor the MDGC separation result of different synthesized hybrid liposomes.
 5. An analytical platform based on an aptameric biosensor to determine kanamycin in milk has been developed by integrating graphene two-dimensional carbon nanomaterials deposited in the gold monolayer of the

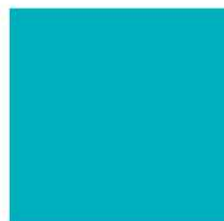
sensor surface of the flow system coupled in a surface plasmon resonance detector.

6. The usefulness of a microfluidic analytical platform integrated by 3D technology into conventional luminescent detectors in which hybrid MLs (containing Fe_3O_4 @AuNPs-C12SH and N-acetylcysteine) have been incorporated for the determination of aminoglycoside antibiotic residues in food samples has been demonstrated, using o-phthalaldehyde as derivatization reagent.

ANEXOS



Producción científica



ANEXO A

Publicaciones científicas
derivadas de la Tesis
Doctoral



- 1. Separation and purification of hydrophobic magnetite-gold hybrid nanoparticles by multiphase density gradient centrifugation**
Á. Écija-Arenas, V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero
Microchimica Acta 185 (2016) 2005-2012
- 2. Luminescence continuous flow system for monitoring the efficiency of hybrid liposomes separation using multiphase density gradient centrifugation**
Á. Écija-Arenas, V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero
Talanta 222 (2021) 121-532
- 3. Integration of a microfluidic system into a conventional luminescence detector using a 3D printed alignment device**
Á. Écija-Arenas, V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero
Microchimica Acta 187 (2020) 187:620
- 4. Separation and characterization of liposomes using asymmetric flow field-flow fractionation with online multi-angle light scattering detection**
Á. Écija-Arenas, V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero
Journal of Chromatography A 1636 (2021) 461798
- 5. Development of an aptamer-based SPR-biosensor for the determination of kanamycin residues in foods**
Á. Écija-Arenas, E.M. Kirschner, T. Hirsch, J.M. Fernández-Romero
Analytica Chimica Acta 1169 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.558651>.
- 6. Usefulness of hybrid magnetoliposomes for Kanamycin determination in food using a microfluidic system with fluorimetric detection**
Á. Écija-Arenas, V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero
Journal of Agricultural and Food Chemistry, *aceptado para su publicación* (2021).



Separation and purification of hydrophobic magnetite-gold hybrid nanoparticles by multiphase density gradient centrifugation

Ángela Écija-Arenas¹ · Vanesa Román-Pizarro¹ · Juan Manuel Fernández-Romero¹ · Agustina Gómez-Hens¹

Received: 9 February 2016 / Accepted: 18 March 2016 / Published online: 2 April 2016
© Springer-Verlag Wien 2016

Abstract The authors describe a multiphase density gradient centrifugation method for the separation and purification of hybrid nanoparticles (NPs). The method was applied to the purification of NPs consisting of magnetite gold NPs of type $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ and coated with 1-dodecylthiol. A density gradient has been established by forming cushions of a multicomponent solution composed of (a) a nonlinear gradient of sucrose in the of 5–50 % concentration range, (b) a constant concentration of ficoll (a neutral, highly branched, high-mass, hydrophilic polysaccharide; 30 % *w/w*), and (c) a constant concentration of percoll (colloidal silica particles coated with polyvinylpyrrolidone; 15 % *w/w*). The final separation profiles are adjusted via dynamic differential centrifugation at $4480\times g$ for 30 min. The mixture of NPs to be separated is added and centrifuged at $2520\times g$ for 40 min. This will separate the NPs into five fractions together with other secondary components. The fractions were characterized by FTIR, XPS, and SEM-EDX techniques. Finally, a continuous flow system with resonance light scattering detection was established and coupled to the separation system in order to monitor the separated fractions.

Keywords Nanomaterial separation · Density gradient · Rate zonal method · Sucrose · Continuous flow system · Light scattering

Introduction

The fast expansion of nanotechnology in a wide range of areas has given rise to significant efforts in the last years directed to optimize the synthesis of nanoparticles (NPs). A general feature of NPs is their polydispersity in shape and size and the presence of secondary components. Thus, there is a growing interest in the availability of separation and purification methods for post-preparative processing because, as it is known, the physical and chemical properties and applications of NPs are critically controlled by their dimension, shape and purity.

A variety of separation techniques have shown their usefulness to obtain purified NP fractions with narrow shape and size distributions. Size exclusion chromatography has been widely used for this purpose but some inherent problems such as degradation or losses by irreversible adsorption can be a limitation. Although the addition of surfactants in the mobile phase can reduce adsorption processes, they can negatively affect the separation resolution [1]. Capillary electrophoresis is another option, but it can be only applied to the separation of charged NPs and, also, it is limited to relatively small sample amounts. For instance, gold and silver NPs have been separated according to their size and shape by agarose gel electrophoresis after coating them with a charged polymer layer [2]. Ultrafiltration, which involves the use of membranes with very low pore sizes, in the nm range, is a fast technique that allows the separation of NPs of different sizes. Several ultrafiltration procedures have been described for the separation of AuNPs [3] and AgNPs [4]. However, a potential limitation of this technique is the interaction of the membrane with the NPs, giving rise to the blocking and the adsorption of NPs on the membrane surface and pore walls. Field-flow fractionation is a powerful technique that has been used to separate several NPs, including Ag, Au, Pd, and Pt, and also to evaluate the factors that influence retention behaviour [5, 6], although it is time consuming and laborious.

✉ Agustina Gómez-Hens
qa1gohea@uco.es

¹ Analytical Chemistry Department, Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry, University of Córdoba, Campus of Rabanales, Annex to Marie Curie Building, 14071 Córdoba, Spain



Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

Luminescence continuous flow system for monitoring the efficiency of hybrid liposomes separation using multiphase density gradient centrifugation

Ángela Écija-Arenas, Vanesa Román-Pizarro, Juan Manuel Fernández-Romero*

Departamento de Química Analítica, Instituto Universitario de Investigación en Química Fina y Nanoquímica (IUNAN), Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Anexo "Marie Curie", E-14071, Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Liposomes separation
Multiphase density gradient centrifugation system
Continuous flow system
Fluorescence

ABSTRACT

A method for monitoring the efficiency of the hybrid magnetoliposomes (h-MLs) separation using multiphase density gradient centrifugation (MDGC) coupled with a continuous flow system (CFS) is described. Several h-MLs suspensions containing hydrophobic magnetic gold nanoparticles (Fe_3O_4 @AuNPs-C12SH) and different fluorophores encapsulated have been synthesized using the rapid solvent evaporation (RSE) method. The MDGC system was prepared using a non-linear multiphase density gradient formed with a bottom layer with 100% (v/v) sucrose solution and six layers containing a mixture of sucrose solution (with concentrations ranged between 10 and 55% v/v), and fixed concentrations of ficoll (30% v/v) and percoll (15% v/v) solutions. The density gradient profile was previously stabilized using a relative centrifugal force (RCF) of $4480 \times g$ for 30 min. The synthesized h-MLs were added to the density gradient profile and separated by centrifugation at $2520 \times g$ for 20 min. The efficiency of the separation procedure was tested, aspirating the separated extract into the CFS and lysing liposomes before their translation to the detector introducing surfactant solutions. The luminescence signals provided by the release of the encapsulated fluorophores and other materials provided the distribution status of the liposomes in each density gradient stage. The monitoring of the different samples revealed four different fractions (MLs, h-Ls, h-MLs, and non-encapsulated fluorophores) for each separated h-MLs. Additional information on the h-MLs has also been acquired by confocal microscopy.

1. Introduction

The extensive use of nanomaterials (NMs) in different areas, including biomedicine, food technology, cosmetics, electronics, and analytical applications, among others, have given rise to significant efforts in the last years directed to improve the synthesis and purifications methods to obtain nanomaterials. Liposomes are bilayer vesicles formed by phospholipids dispersed in water, which can be seen as a type of NMs as some of them reach sizes from nm to μm levels. As known, liposomes have been useful as microcontainer tools with an aqueous compartment surrounded by one or more lipid bilayers. This structure allows the entrapping of hydrophobic substances within the acyl chains of the bilayer and hydrophilic molecules in the aqueous cavity and the insertion of amphiphilic contents in the polar head groups. The resulting nanomaterials usually named hybrid liposomes (h-Ls), provides a high number of applications in a variety of areas such as food,

pharmaceutical, and cosmetic industries, medical imaging, and gene therapy, mainly as delivery systems [1–7]. Also, hybrid liposomes have been described as amplification systems to improve the sensitivity of analytical methods [8].

A particular type of liposomes, magnetoliposomes (MLs), are usually loaded with magnetic iron oxide nanoparticles (Fe_3O_4 NPs). They have been used as a drug delivery system for cancer or heart treatments using entrapped drugs or as multimodal contrast agents for molecular imaging [9–11]. The analytical usefulness of MLs as an amplification system has been shown using hybrid magnetoliposomes (h-MLs), liposomes containing magnetic nanoparticles, and other reagents. For instance, loading 4-methylumbelliferyl-phosphate for the fluorimetric determination of alkaline phosphatase in milk samples [12]. Literature also provides additional information about the use of h-MLs loaded with compounds that exhibit optical properties that facilitates signal monitoring. Some strategies have been based on the absorption measurement

* Corresponding author.

E-mail address: qa1ferroj@uco.es (J.M. Fernández-Romero).

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121532>

Received 12 May 2020; Received in revised form 5 August 2020; Accepted 8 August 2020

Available online 15 August 2020

0039-9140/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.



Integration of a microfluidic system into a conventional luminescence detector using a 3D printed alignment device

Ángela Écija-Arenas¹ · Vanesa Román-Pizarro¹ · Juan Manuel Fernández-Romero¹ Received: 3 September 2020 / Accepted: 7 October 2020
© Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2020

Abstract

A useful 3D printed device for the inside microfluidic integration into a conventional optical detector has been developed. The coupling system supposes the complete integration of a microfluidic device inside the sample compartment of a conventional spectrofluorimeter. For this purpose, a commercial chip-holder, including a microfluidic chip, was anchored inside the detector using a “lab-built” 3D printing alignment prototype. The variables affecting the position of the 3D printed device, such as horizontal and vertical and rotary angles, were optimized. The usefulness of the microfluidic integration system has been tested using an organized suspension of separated hybrid magnetoliposomes containing nanomaterials that were previously separated using a multiphase density gradient centrifugation (MDGC) method. The whole integration system consists of three well-established parts: the impulsion unit, the displacement unit, and the microfluidic chip. The impulsion unit is formed by two syringe pumps, which propel under microflow-rate regime the solutions through to the microfluidic system. The first fluid incorporates an immiscible solution that provides the solution which fills positive oil/water (O/W) displacement unit. In this unit, the previously organized MDGC suspension, which includes different liposome populations, was layer-by-layer displaced to a y-mixer microfluidic chip. The separation content merges with the second solution propelled by the other syringe pump. This solution incorporates a surfactant that promotes the liposome lysis. The novelty supposes the easy incorporation of a 3D printer alignment device, which facilitates the incorporation of the microfluidic channel focused into the optical pathway of the luminescence detector.

Keywords Integrated microfluidic/luminescence detector · 3D printing alignment device · Multidensity gradient centrifugation (MDGC) · Hybrid magnetoliposomes

Highlights

- The use of a 3D printed device is proposed for integrating microfluidic systems with conventional optical detectors.
- Materials were separated by a multiphase density gradient centrifugation (MDGC) system.
- A positive O/W displacement unit transfers the vial content into the integrated system.
- The system utility was demonstrated monitoring different MDGC separated materials.
- Hybrid magnetoliposomes with Fe₃O₄@AuNPs-DT and different fluorophores were studied.

Introduction

In the last decades, microscale dynamic systems have brought enormous interest as useful new tools in a wide range of applications supported in automation/miniaturization in different areas such as material synthesis, chemical and biochemical reactivity and detection, drug delivery systems, and biotechnology process control. The incorporation of microfluidic systems into analytical processes constitutes a clear example of the advances in analytical chemistry. The development of microscale dynamic systems involves manipulating fluids in channels with dimensions of tens of micrometers and postulates several variations in physical, physicochemical, and chemical behaviors providing significant changes between the material interactions at microscale in comparison with those that occur on a larger scale. This paradigm shift conditions fluid dynamics processes, surface interactions, changes in chemical reactivity, among others.

✉ Juan Manuel Fernández-Romero
qalferoj@uco.es

Ángela Écija-Arenas
q92ecara@uco.es

Vanesa Román-Pizarro
q52ropiv@uco.es

¹ Departamento de Química Analítica, Instituto Universitario de Investigación en Química Fina y Nanoquímica (IUNAN), Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Anexo “Marie Curie”, 14071 Córdoba, Spain



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Separation and characterization of liposomes using asymmetric flow field-flow fractionation with online multi-angle light scattering detection



Ángela Écija-Arenas, Vanesa Román-Pizarro, Juan Manuel Fernández-Romero*

Departamento de Química Analítica, Instituto Universitario de Investigación en Química Fina y Nanoquímica (IUNAN), Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Anexo "Marie Curie", Córdoba E-14071, España

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 September 2020

Revised 2 December 2020

Accepted 7 December 2020

Available online 10 December 2020

Keywords:

Liposomes

Asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4)

Online detection

Multi-angle light scattering detector (MALS)

Particle size distribution

DLS and TEM comparison

ABSTRACT

Liposomes, mainly formed by phospholipids and cholesterol that entrapped different compounds, were separated and characterized using asymmetric flow field-flow fractionation (AF4) coupled with a multi-angle light scattering detector (MALS). AF4 allows the separation of liposomes according to their hydrodynamic size, and the particle size can be estimated directly by their elution time. Besides, different synthesized liposome suspensions with different species encapsulated in different places in liposomes were prepared with analytical purposes to be studied. These liposomes were: empty liposomes (e-Ls), magnetoliposomes (MLs) with Fe_3O_4 @AuNPs-C12SH inside the lipid bilayer, and long-wavelength fluorophores encapsulated into the aqueous cavity of liposomes (Ls-LWF). The optimization process of the variables that affect the fractionation has been established. The separation effectiveness has been compared with the results achieved with a photon-correlation spectroscopy analyzer based on dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM), used in self-assembly structures characterization. In all cases, three different classes of liposomes have been obtained; two are commonly appeared in all studied samples, while only a third class is characteristic for each of the liposomes. This mean that the proposed methodology could be used for identifying liposomes according to the encapsulated material.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Liposomes are self-assembled structures and are presented in nature as microscopic vesicles formed from a dispersion of phospholipids and cholesterol in an aqueous solution, easily synthesized in the laboratory. The amphiphilic character of phospholipids, with their typical double structure of the polar head and hydrophobic tail means that, when suspended in an aqueous solution, they spontaneously associate, forming aqueous vesicles surrounded by a double lipid layer [1]. One of the species encapsulated in this research was long-wavelength fluorophores (LWFs). The encapsulation of these compounds helps amplify their fluorescence intensity or study non-fluorescent reactions when some compound involved in the reaction interferes with the LWF [2–4]. The LWF chosen to be encapsulated, cresyl violet, is a water-

soluble compound, so this compound should be found in the aqueous cavity [3,5]. The encapsulation of hydrophobic magnetic nanoparticles (Fe_3O_4 @AuNPs-C12SH), obtaining magnetoliposomes (MLs), was also chosen. This type of encapsulation is useful to obtain drug delivery systems in cancer treatment and, in this way, bring drugs to the specific site with an external magnetic field or like imaging agents in diagnosis [6,7]. These nanoparticles could be anchored to the lipid bilayer due to their hydrophobicity provided by the 1-dodecylthiol [3,4].

The knowledge of the morphologic and structural liposome features, such as size, polydispersity, and homogeneity distribution, is essential. For this purpose, different microscopic or dispersive techniques have been used. Thus, for example, the superficial and morphological information acquired through microscopic techniques, such as transmission (TEM), scanning (SEM) or atomic force (AFM) microscopy, implied sample treatment influence, difficulty in recognition of structures manually, lack of representativeness, and in general, they are expensive techniques. For

* Corresponding author.

E-mail address: qa1ferroj@uco.es (J.M. Fernández-Romero).



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Development of an aptamer-based SPR-biosensor for the determination of kanamycin residues in foods

Ángela Écija-Arenas^{a,1}, Eva-Maria Kirchner^{b,1}, Thomas Hirsch^b,
Juan Manuel Fernández-Romero^{a,*}

^a Departamento de Química Analítica, Instituto Universitario de Investigación en Química Fina y Nanoquímica (IUNAN), Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Anexo "Marie Curie", 14071, Córdoba, Spain

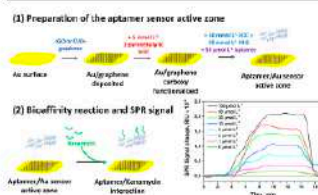
^b Institute of Analytical Chemistry, Chemo and Biosensors, University of Regensburg, 93040, Regensburg, Germany



HIGHLIGHTS

- A biosensor based on the use of specific aptamer binding have been developed.
- The aptamer was immobilized at the sensor surface using two types of graphene.
- Chemical vapor deposition graphene and reduced graphene oxide were compared as substrate surface.
- The union of the analyte was monitored by surface plasmon resonance.
- The aptasensor was applied to the kanamycin determination in cow milk samples.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 January 2021
Received in revised form
27 April 2021
Accepted 7 May 2021
Available online 11 May 2021

Keywords:

Aptamer sensor
Graphene support
Kanamycin residues detection
Surface plasmon resonance spectroscopy
Raman spectroscopy

ABSTRACT

A biosensor in which an affinity reaction occurs in the sensitive microzone through the use of specific aptamers to determine kanamycin residues in agri-food samples has been developed. It is an irreversible and continuous flow aptameric biosensor (aptasensor) in which the signal variations are monitored by surface plasmon resonance (SPR) measurements based on the specific interaction of the aptamer with the antibiotic. The signal variation is proportional to the analyte concentration. Graphene is known for efficient binding of molecules with its π -electron system, so a monolayer of graphene prepared from chemical vapor deposition (CVD) has been compared to a multilayer of graphene made from reduced graphene oxide (rGO) for immobilization of the aptamer on the gold surface of the physicochemical transducer. The best results have been obtained with CVD graphene. The dynamic range was between 1 and 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of kanamycin concentration ($r^2 = 0.9981$, $n = 7$, $r = 4$), with a limit of detection of 285 nmol L^{-1} and a sampling frequency of 6 h^{-1} . The precision, expressed as relative standard deviation (RSD%), was established in the range of 1.49 and 3.89%, calculated for 1, 10, and 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The selectivity was studied applying the described method to determine other antibiotics, obtaining no significant difference in the analytical signal. The method was applied to determine kanamycin residues in milk samples with recovery values ranging between 90 and 96%.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author. Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Anexo "Marie Curie", 14071 Córdoba, Spain.
E-mail address: qalferoj@uco.es (J.M. Fernández-Romero).

¹ These authors contributed equally.

ANEXO B



Presentación de
comunicaciones a
congresos



1. Póster:

J.M. Fernández-Romero, Á. Écija-Arenas, V. Román-Pizarro, A. Gómez-Hens

Innovation in the separation of hybrid nanoparticles by using sucrose/ficoll/percoll density gradient centrifugation

XIV Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica. Baeza (España). Junio 2014

2. Comunicación oral:

Á. Écija-Arenas

Innovaciones nanotecnológicas en el desarrollo de plataformas analíticas para la evaluación de la seguridad agroalimentaria

V Congreso Científico de Investigadores en Formación de la Universidad de Córdoba. Córdoba (España). Noviembre 2016.

3. Póster:

Á. Écija-Arenas, V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero

Separación y caracterización de liposomas híbridos mediante centrifugación en gradiente multifase de densidad acoplado con un sistema continuo de análisis

NANOUCO VI: Encuentro sobre nanociencia y nanotecnología de investigadores andaluces. Córdoba (España). Enero 2017

4. Comunicación oral:

Á. Écija-Arenas

Innovaciones nanotecnológicas en el desarrollo de plataformas analíticas para la evaluación de la seguridad agroalimentaria

VI congreso Científico de Investigadores en formación de la Universidad de Córdoba. Córdoba (España). Enero 2018

5. Comunicación oral:

V. Román-Pizarro, Á. Écija-Arenas, M.V. Zurita-Lozano, M.P. Aguilar-Caballos y J.M. Fernández-Romero

New Contributions of Nanotechnology, biosensors and miniaturization to bioanalysis

VIII Jornadas de Divulgación de la Investigación en Biología Molecular, Celular, Genética y Biotecnología. Córdoba (España). Junio 2018

6. Comunicación oral

Á. Écija-Arenas, V. Román-Pizarro, J.M. Fernández-Romero

Separación de liposomas mediante la técnica de fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico

NANOUCO VII: Encuentro sobre Nanociencia y Nanotecnología. Córdoba (España). Enero 2019

7. Comunicación oral

Á. Écija-Arenas

Innovaciones nanotecnológicas en el desarrollo de plataformas analíticas para la evaluación de la seguridad agroalimentaria

VII Congreso Científico de Investigadores en Formación de la Universidad de Córdoba. Córdoba (España). Febrero 2019



XIV REUNIÓN DEL GRUPO REGIONAL ANDALUZ DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA ANALÍTICA



BAEZA, 26 y 27 junio 2014



GRUPO REGIONAL ANDALUZ
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE
QUÍMICA ANALÍTICA



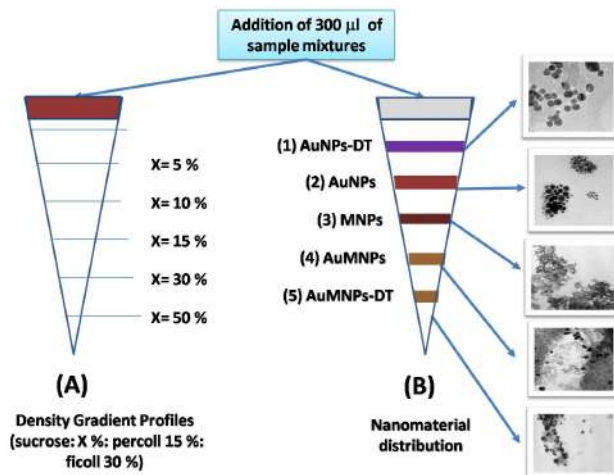
QUÍMICA ANALÍTICA DE LA
UNIVERSIDAD DE JAÉN
FQM-323

INNOVATION IN THE SEPARATION OF HYBRID NANOPARTICLES BY USING SUCROSE/FICOLL/PERCOLL DENSITY GRADIENT CENTRIFUGATION SYSTEMS

J.M. Fernández Romero, A. Écija Arenas, V. Román Pizarro y A. Gómez Hens

Department of Analytical Chemistry. Marie Curie Building (Annex). Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry (IQFN-UCO). Campus of Rabanales. University of Córdoba. E-14071 Córdoba, Spain

A methodology for rapid and economical separation and subsequent spectroscopic and microscopic characterization of several mixtures of nanoparticles using different formats of synthesis and functionalization techniques is described. The density gradient centrifugation is used as an effective technique for separating nanomaterials with small differences in their sizes and shapes. To this goal, we have established various density gradients using sucrose, ficoll and percoll cushions with nonlinear gradients in concentration ranges of sucrose (5-50 %), ficoll (0-30 %) and percoll (0-30 %). The final separation profiles are set in preparation conditions using dynamic differential centrifugation through 8000 rpm for 30 min, followed by addition of the sample to be separated, using a separation profile of 6000 rpm for 20 min. This procedure has been applied to carry out the complete separation of five types of nanomaterials and their various components, obtaining then the following order of downstream separation: (1) AuNPs doped with 1- dodecanethiol, (2) AuNPs, (3) MNPs, (4) AuMNPs and (5) AuMNPs doped with dodecanethiol.



The nanoparticles fractions have been characterized using different spectroscopy (NMR, XPS, NIR/FTIR) and microscopic (TEM, SEM-EDX) techniques. In the future it is intended to use this methodology for the discrimination between the different components used in the synthesis of other larger structures, such as liposomes and their components.

POSTER COMUNICACION

CREANDO REDES DOCTORALES

Vol. V



Universidad de Córdoba 2016



Innovaciones nanotecnológicas en el desarrollo de plataformas analíticas para la evaluación de la seguridad agroalimentaria

Ángela Écija Arenas

Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Analítica. E-mail: q92ecara@uco.es

Summary

The evolution of Nanoscience and Nanotechnology, as well as the progress in automation, simplification and micro fabrication, justify that the purpose of the research carried out until now, and that planned for the development of the Doctoral Thesis, is the innovation in: 1) the synthesis of nanomaterials (NMs), and 2) the development of dynamic and microfluidic devices and systems to propose safe analysis in the agro-food field.

New nanoparticles (NPs) and hybrid liposomes (LPs) have been until now synthesized with the aim of developing chemical-analytical reactions in macro and microfluidic analysis systems. The new synthesized NPs are magnetic type (Fe_3O_4), which have been coated with gold and dodecylthiol to modify their properties. A method for the purification of these NPs has been developed, which is based on the use of a multiphase density gradient centrifugation system. The gradient used consists of sucrose and stabilizing substances such as ficoll and percoll. Also, different approaches for the integration of microfluidic systems in the conventional analytic instrumentation are being developed for the evaluation of agro-food safety.

Resumen

La evolución de la Nanociencia y la Nanotecnología, así como el avance alcanzado en automatización, simplificación y microfabricación, justifican que la finalidad de las investigaciones realizadas hasta la fecha, y que se pretenden realizar durante el desarrollo de la Tesis Doctoral, sea la innovación en: 1) la síntesis de nuevos nanomateriales (NMs) y 2) el desarrollo de dispositivos y sistemas dinámicos y microfluídicos para proponer análisis seguros dentro del ámbito agroalimentario.

Hasta ahora se han sintetizado nuevas nanopartículas (NPs) y liposomas (LPs) híbridos con objeto de utilizarlos en el desarrollo de reacciones químico-analíticas llevadas a cabo en sistemas de análisis a escala macro y microfluídica. Las NPs sintetizadas son de tipo magnético (Fe_3O_4), las cuales se han recubierto con oro y dodecanotiol (DT) para modificar sus propiedades. Se ha desarrollado un método para la purificación de estas NPs mediante un sistema de centrifugación en gradiente multifase de densidad. Este gradiente está formado por sacarosa y sustancias estabilizadoras tales como ficoll y percoll. También se están desarrollando diferentes formas de integración de los sistemas microfluídicos en la instrumentación analítica convencional de utilidad en la evaluación de la seguridad agroalimentaria.

**Sexta Edición del Encuentro sobre Nanociencia y Nanotecnología
de Investigadores y Tecnólogos Andaluces**

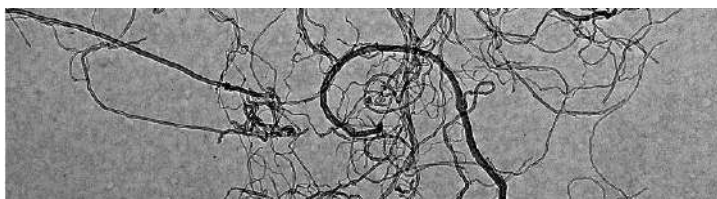
VI Workshop



Córdoba, 25 y 26 de Enero de 2017

Aula Magna. Aulario Averroes

Campus Universitario de Rabanales. Universidad de Córdoba



LIBRO DE RESÚMENES



P43-AGR

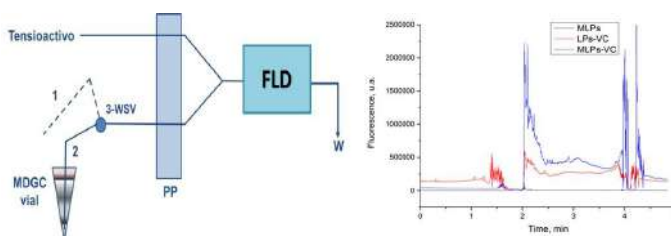
SEPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS HÍBRIDOS MEDIANTE CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE MULTIFASE DE DENSIDAD ACOPLADO CON UN SISTEMA CONTINUO DE ANÁLISIS

Ángela Écija-Arenas, Vanesa Román-Pizarro, Juan Manuel Fernández-Romero

*Departamento de Química Analítica. Instituto de Química Fina y Nanoquímica (IUQFN-UCO) Campus de Rabanales. Marie Curie (Anexo) Universidad de Córdoba, E-14071, Córdoba, España.
email: q92ecara@uco.es*

La evolución de la Nanociencia y la Nanotecnología, así como el avance alcanzado en automatización, simplificación y microfabricación, justifican que la finalidad de las investigaciones realizadas hasta la fecha, y que se pretenden continuar sea la innovación en: 1) la síntesis de nuevos nanomateriales (NMs) y 2) el desarrollo de dispositivos y sistemas dinámicos para proponer análisis seguros que den respuesta rápida dentro del ámbito agroalimentario.

Con este fin, se han sintetizado nuevos NMs, entre los que están los liposomas (LPs) híbridos con objeto de utilizarlos en el desarrollo de reacciones químico-analíticas llevadas a cabo en sistemas de análisis continuos. En los LPs híbridos sintetizados se han encapsulado nanopartículas (NPs) magnéticas recubiertas con oro y dodecanotiol ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@AuNPs-DT}$) y distintos fluoróforos de larga longitud de onda, que dotan al sistema de propiedades ópticas y magnéticas de utilidad para el desarrollo del proceso analítico.



Se ha establecido un método para la separación y purificación de estos LPs del resto de productos de su síntesis, mediante un sistema de centrifugación en gradiente de densidad (MDGC). Este gradiente está formado por sacarosa y sustancias estabilizadoras y que mejoran la resolución de la separación tales como ficoll y percoll. La eficacia de la separación se ha evaluado mediante el acoplamiento del vial de centrifugación con un sistema continuo de análisis que ha puesto de manifiesto la utilidad del sistema separativo.

CREANDO REDES DOCTORALES

Vol. VI: “La generación del
conocimiento”



educo
Escuela de Doctorado de
la Universidad de Córdoba



UCOPress
Editorial Universidad
de Córdoba

eidA3

escuela internacional de doctorado en
agroalimentación
SEDE UCO

Innovaciones nanotecnológicas en el desarrollo de plataformas analíticas para la evaluación de la seguridad agroalimentaria

Ángela Écija Arenas

Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Analítica.

E-mail: q92ecara@uco.es

Summary

The research which is included in the development of the Doctoral Thesis looks for innovation within the field of Nanoscience and Nanotechnology. The following investigations are found: 1) the synthesis of new nanomaterials (NMs), 2) their purification and separation after their synthesis, and 3) the development of dynamic devices and systems to propose agro-food analysis methodologies.

New nanoparticles (NPs) and hybrid liposomes (h-LPs) have been synthesized until now, with the aim of developing chemical-analytical reactions. Magnetic NPs, which improve the preconcentration, and long-wavelength fluorophores, useful to improve selectivity by avoiding matrix signal interferences, have been encapsulated in h-LPs. A method for the purification of these NMs has been developed, which is based on the use of a multiphase density gradient centrifugation system. The gradient used consists of sucrose and stabilizing substances such as ficoll and percoll.

A new method for the separation of h-LPs with Asymmetric Flow Field Flow Fractionation (AF4) technique is being developed nowadays, obtaining good separations after the synthesis.

Resumen

Las investigaciones que se engloban dentro del desarrollo de la Tesis Doctoral buscan la innovación dentro del ámbito de la Nanociencia y la Nanotecnología. Dentro de éstas, se encuentran: 1) la síntesis de nuevos nanomateriales (NMs), 2) su purificación y separación posterior a la síntesis, y 3) el desarrollo de dispositivos y sistemas dinámicos para proponer metodologías de análisis agroalimentarias.

Hasta ahora se han sintetizado nuevas nanopartículas (NPs) y liposomas híbridos (h-LPs) con objeto de utilizarlos en el desarrollo de reacciones químico-analíticas. Dentro de los h-LPs se han encapsulado NPs magnéticas, con las cuales se podría mejorar la preconcentración, y fluoróforos de larga longitud de onda, útiles para mejorar la selectividad al evitar interferencias de señal con la matriz de la muestra. Se ha desarrollado un método para la purificación de estos NMs mediante un sistema de centrifugación en gradiente multifase de densidad. Este gradiente está formado por sacarosa y sustancias estabilizadoras tales como ficoll y percoll.

En la actualidad se está desarrollando un método nuevo de separación de h-LPs con la técnica Asymmetric Flow Field Flow Fractionation (AF4), consiguiendo buenas separaciones de los componentes tras la síntesis.



Organiza:
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular
de la Universidad de Córdoba

UCOPress
Editorial Universidad de Córdoba

*New contributions of nanotechnology, biosensors
and miniaturization to bioanalysis*

V. Román Pizarro, Á. Écija Arena, M.V. Zurita Lozano, M.P.
Aguilar Caballos and J.M. Manuel Fernández Romero

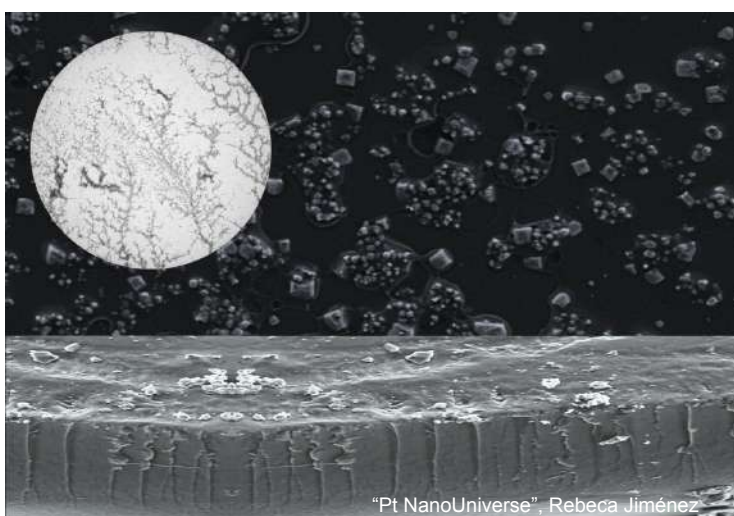
*Department of Analytical Chemistry, Institute of Fine Chemistry
and Nanochemistry (IUQFN-UCO), Rabanales Campus, Annex
to "Marie Curie" building, University of Córdoba, E-14071,
Córdoba Spain.*

Abstract

In the last five years, several research lines based on the use of nanotechnology, bioaffinity interactions and miniaturized systems have been implemented for the development of undergraduate theses in bioanalytical chemistry. This project is supported by the use of new strategies incorporating nanomaterials, bioaffinity interactions and miniaturized flow systems for monitoring biocatalysts, substrates, inhibitors / activators, and the application of nanotechnology to the development of biosensors and new nanosorbents for the determination of allergenic proteins.

The strategies implemented to achieve these investigations were based on:

- The implementation of automatic continuous analysis systems with a different degree of miniaturization (lateral-flow, continuous-flow and microfluidics).
- Design of dynamic analysis approaches that allow the "in situ" assessment of the kinetic parameters of enzymes. The graphical interpretation of enzymatic activation/inhibition processes has also been proposed.
- Synthesis and characterization of different nanomaterials such as magnetic nanoparticles (MNPs), silver-coated magnetic nanoparticles (Ag-MNPs), and gold nanoparticles (AuNPs). It also includes different ways to immobilize the bio-reagent onto the synthesized nanomaterials.
- Use of nanomaterials for the retention of the allergenic proteins, the enzymes involved or for the derivatization of anti-analyte antibodies, enzymatic substrates, inhibitors, and activators.



LIBRO DE RESÚMENES

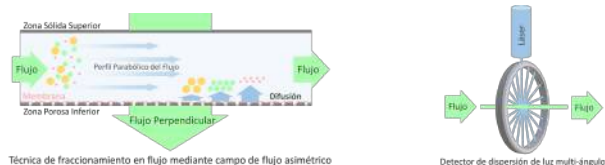
NANOUCO VII
Encuentro sobre Nanociencia y Nanotecnología

Rectorado de la Universidad de Córdoba
21 y 22 de Enero de 2019

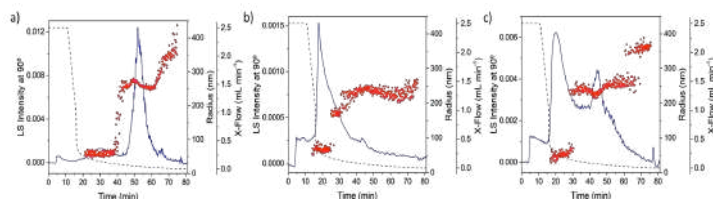
SEPARACIÓN DE LIPOSOMAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE FRACCIONAMIENTO EN FLUJO MEDIANTE CAMPO DE FLUJO ASIMÉTRICO CON DETECCIÓN DISPERSIVA MULTIÁNGULO

Ángela Écija-Arenas, Vanesa Román-Pizarro, Juan Manuel Fernández-Romero
 Departamento de Química Analítica. Instituto Universitario de Nanoquímica (IUNAN). Campus de Rabanales. Marie Curie (Anexo). Universidad de Córdoba, E-14071, Córdoba, España.
 Email: q92ecara@uco.es

Se ha descrito un método para la separación de poblaciones recién sintetizadas de liposomas (LPs) mediante la técnica de fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF4) acoplado a un detector de dispersión de luz multi-ángulo (MALS). Esta técnica de fraccionamiento permite separar poblaciones de liposomas en base a su tamaño.



Se ha llevado a cabo la optimización de las variables que afectan al fraccionamiento, tales como la composición de la fase móvil desplazante, el volumen de muestra inyectado y las condiciones de separación. La fase móvil desplazante utilizada es una disolución reguladora HEPES (10 mM, pH 8) y con un contenido salino de 50 mM en NaCl. Se ha inyectado un volumen de 21 μL de suspensión de LPs, previamente diluidos 1:10 en la fase móvil descrita. La separación se ha llevado a cabo mediante un gradiente de flujo perpendicular decreciente, desarrollado en dos etapas: una primera, en la que el caudal del flujo varía linealmente entre 2.5 y 1 mL min^{-1} durante 5 min, y una segunda, en la que varía exponencialmente entre 1 a 0 mL min^{-1} durante 60 min. La eficacia en la separación de poblaciones de LPs mediante la técnica AF4 se ha comparado con otras técnicas que también proporcionan información respecto a tamaño de las nanoestructuras sintetizadas, tales como la técnica de detección de luz dinámica dispersada (DLS) o la microscopía electrónica de transmisión (TEM).



La técnica de fraccionamiento mediante AF4 se ha aplicado a la separación de tres tipos diferentes de suspensiones de LPs: (a) LPs vacíos, (b) magnetoliposomas (MLPs) y (c) LPs con el fluoróforo violeta de cresilo encapsulado en su interior. En todos los casos se han obtenido tres poblaciones, dos de ellas comunes a los tres tipos de suspensiones y una característica de cada tipo.

CREANDO REDES DOCTORALES

Vol. VII: “Investiga y Comunica”



educo
Escuela de Doctorado de
la Universidad de Córdoba



UCOPress
Editora Universidad
de Córdoba

eidA3

escuela internacional de doctorado en
agrobiodiversidad
SEDE UCO

Innovaciones nanotecnológicas en el desarrollo de plataformas analíticas para la evaluación de la seguridad agroalimentaria

Ángela Écija Arenas

*Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Analítica.
E-mail: q92ecara@uco.es*

Summary

The research included in this Doctoral Thesis looks for innovation within the field of Nanoscience and Nanotechnology, aimed to: 1) the synthesis of new nanomaterials (NMs), 2) their purification and separation after their synthesis, and 3) the application in the development of miniaturized devices integrates in dynamic systems applicable in agro-food analysis.

Two types of NMs were synthesized: nanoparticles and hybrid liposomes to incorporate them as reagents or containers involved in chemical-analytical reactions. Regarding the NMs separation and purification procedures, two methods were developed: the first, through a multiphase density gradient centrifugation (MDGC) system, using a mixed gradient of sucrose and stabilizing substances; and the second is focused in asymmetric flow field-flow fractionation (AF4) technique to separate liposome populations with different sizes appeared in the synthesis. The size of each population was known for the on-line coupling to a multi-angle light scattering (MALS) detector.

A new coupling between microfluidic systems and miniaturized electronic devices to monitor the originated analytical signal is being developed nowadays.

Resumen

Las investigaciones que se realizan en esta Tesis Doctoral buscan la innovación en del ámbito de la Nanociencia y la Nanotecnología, encaminadas hacia: 1) la síntesis de nuevos nanomateriales (NMs), 2) la purificación y separación posterior a la síntesis, y 3) su aplicación en el desarrollo de dispositivos miniaturizados integrados en sistemas dinámicos aplicables en análisis agroalimentario.

Se han sintetizado dos tipos de NMs: nanopartículas y liposomas híbridos para incorporarlos como reactivos o contenedores involucrados en las reacciones químico-analíticas. Respecto a los procedimientos separación y purificación de estos NMs, se han desarrollado dos métodos: el primero, mediante un sistema de centrifugación en gradiente multifase de densidad (MDGC), usando un gradiente mixto de sacarosa y sustancias estabilizadoras; y el segundo se centra en el uso de la técnica de fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF4) para separar las poblaciones de liposomas con distintos tamaños que aparecen en la síntesis. El tamaño de cada una de las poblaciones separadas se puede conocer por el acoplamiento en línea a un detector de dispersión de luz multiángulo (MALS).

En la actualidad se está desarrollando el acoplamiento entre sistemas microfluídicos y dispositivos electrónicos miniaturizados con los que monitorizar la señal analítica originada.

ANEXO C



Pósteres





INNOVATION IN THE SEPARATION OF HYBRID NANOPARTICLES BY USING SUCROSE/FICOLL/PERCOLL DENSITY GRADIENT CENTRIFUGATION SYSTEMS

J.M. Fernández Romero, A. Écija Arenas, V. Román Pizarro and A. Gómez Hens



Department of Analytical Chemistry, Marie Curie Building (Annex), Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry (IQFN-UCO). Campus of Rabanales. University of Córdoba. E-14071 Córdoba, Spain



Introduction

A new methodology for rapid and economical separation and subsequent spectroscopic and microscopic characterization of several mixtures of nanoparticles using different formats of synthesis and functionalization techniques is described. The density gradient centrifugation is used as an effective technique for separating nanomaterials with small differences in their sizes and shapes.

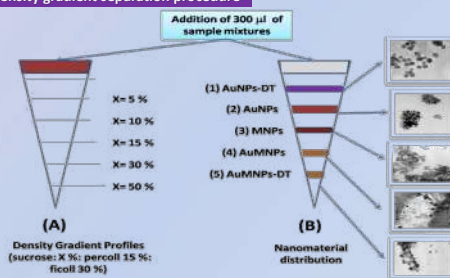
Preparation density gradient profile

Dynamic density gradient profile preparation using ingredients end of percentages of 15% to 30% of percoll and ficoll varying percentage of sucrose (x% value). This gradient was prepared using a centrifugation at 8000 rpm for 30 min.

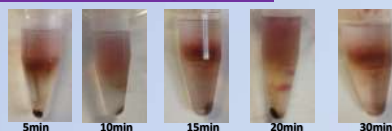
Preparation of density gradient separation profile

A separation profile of 6000 rpm for 20 min was used after addition of 300 μ L of sample.

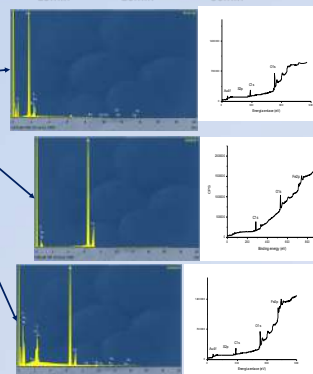
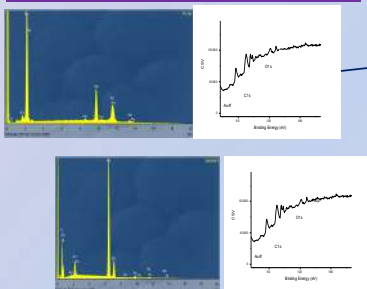
Density gradient separation procedure



Optimization of centrifugation time



Characterization of nanoparticles (SEM-EDAX and XPS)



Conclusions

- > A simple method for the separation of metallic and modified NPs has been developed
- > Synthesized nanoparticles were characterized using spectroscopic and microscopic techniques
- > This separation method provides an effective way to discriminate nanomaterials with small differences in sizes and shapes using density gradient centrifugation which allow their purification
- > This method could easily adapted to automation using a flow system

XIV REUNIÓN DEL GRUPO REGIONAL ANDALUZ DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA ANALÍTICA

Baeza
26-27 junio 2014



SEPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS HÍBRIDOS MEDIANTE CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE MULTIFASE DE DENSIDAD ACOPLADO CON UN SISTEMA CONTINUO DE ANÁLISIS



A. Écija-Arenas, V. Román-Pizarro y J.M. Fernández-Romero

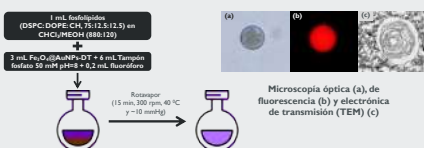
Departamento de Química Analítica. Instituto de Química Fina y Nanoquímica (IUQFN-UCO) Campus de Rabanales. Marie Curie (Anexo) Universidad de Córdoba, E-14071, Córdoba, España.
Email: q92ecara@uco.es

Introducción

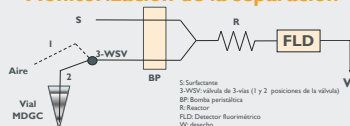
Se presenta un método de purificación de magnetoliposomas híbridos (h-MLPs) basado en una centrifugación en gradiente multifase de densidad (MDGC). Se han encapsulado nanopartículas magnéticas (MNP) recubiertas con nanopartículas de oro y funcionalizadas con dodecanol ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs-DT}$) y fluoróforos de larga longitud de onda (LWFs). Estos h-MLPs tienen interés como contenedores analíticos para mejorar la sensibilidad en los métodos analíticos que se utilicen. Los fluoróforos encapsulados han sido: violeta de cresilo (VC), ácido 8-hidroxipirreno-1,3,6-trisulfónico (HPTS), rodamina B (RB) y naftofluoresceína (NF).

El gradiente multifase utilizado está formado por sacarosa y sustancias estabilizadoras que mejoran la resolución de la separación (ficoll y percoll). Para evaluar la eficacia de la separación, el vial obtenido en la MDGC se ha acoplado a un sistema continuo de análisis que permite monitorizar los perfiles de separación a las longitudes de onda de excitación y emisión de los LWFs incorporados.

Síntesis de h-MLPs y su caracterización mediante técnicas microscópicas



Monitorización de la separación



Optimización de variables

Intervalo estudiado	Valores óptimos			
	h-MLPs-VC	h-MLPs-HPTS	h-MLPs-RB	h-MLPs-NF
Concentración de surfactante	10 mM	10 mM	1 mM	5 mM
Caudal de la bomba	0.3 – 1 mL/min	0.5 mL/min		
Longitud del reactor	0.3 – 0.8 mL	0.4 mL		

TX-100: Triton X-100; CTAB: Cloruro de cetrimetilamónio

Método de separación MDGC

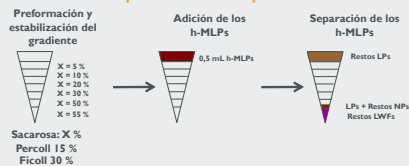
El método de separación se basa en una centrifugación zonal, formando capas de densidad creciente de sacarosa (5 – 55%), a las que se añaden cantidades constantes de ficoll (30%) y percoll (15%). La separación requiere dos etapas: 1) Estabilización del gradiente preformado, mediante una centrifugación a 4480 x g durante 30 min; 2) Adición de la mezcla de síntesis y separación de los h-MLPs del resto de componentes mediante una segunda centrifugación a 2520 x g durante 40 min.

Optimización de la separación

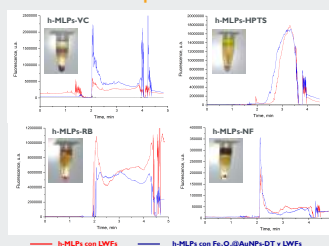
Intervalo estudiado	Valor óptimo
Etapas de estabilización del gradiente preformado	
R.C.F. (x g)	1120 – 10080
Tiempo (min)	10 – 60
Etapas de separación de los h-MLPs	
R.C.F. (x g)	280 – 10080
Tiempo (min)	15 – 60

R.C.F.: Fuerza de centrifugación relativa

Esquema de la separación



Perfiles de separación obtenidos



Conclusiones

Se han sintetizado diferentes h-MLPs conteniendo $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{NPs-DT}$ y LWFs y se han caracterizado mediante diversas técnicas microscópicas, poniendo de manifiesto la encapsulación de los materiales. Se han purificado los h-MLPs sintetizados con el método de centrifugación en gradiente multifase de densidad utilizando sacarosa, ficoll y percoll. El sistema de separación se ha acoplado on-line a un sistema de análisis continuo para monitorizar los componentes de las distintas fracciones obtenidas.

ANEXO D



Actividades de
divulgación científica



- 1. Participación en la actividad “Paseo por la Ciencia”.**
Universidad de Córdoba, ediciones de 2016, 2017 y 2018.
- 2. Participación en la actividad “La Noche Europea de l@s Investigador@s”.**
Universidad de Córdoba, ediciones de 2016 y 2018.
- 3. Participación en las IX, X, XI y XII Jornadas de Introducción Al Laboratorio de Química para Alumnos De Bachillerato.**
Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba, ediciones de 2016, 2017, 2018 y 2019.
- 4. Participación en las Jornadas “La Semana de la Ciencia”.**
Colegio Virgen del Carmen (Córdoba), edición de 2017.
- 5. Participación en el IV y V Plan Anual de Divulgación Científica de la Universidad de Córdoba en la actividad “Semana de la Ciencia. Espacios de Ciencia”.**
Universidad de Córdoba, ediciones de 2017 y 2018.
- 6. Participación en el IV Plan Anual de Captación de Estudiantes (PACE), dentro del Programa de Orientación Vocacional para el alumnado de Secundaria, Bachillerato y Formación Profesional Superior (ORIENTAUCO 2018).**
Facultad de Ciencias de la Universidad de Córdoba, curso 2017/2018.

