



UNIVERSIDAD
DE GRANADA

Facultad de Ciencias

GRADO EN
QUÍMICA

TRABAJO FIN DE
GRADO

*SÍNTESIS Y
CARACTERIZACIÓN DE
HIDROGELES Y AEROGELLES
DE FIBRAS AMILOIDES DE
BETALACTOGLOBULINA Y
APOFERRITINA*

Presentado por:

D^a. Isabel Nieto Chacón

Curso académico 2020/2021



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. DEFINICIÓN DE AEROGEL	3
2.2. DESARROLLO HISTÓRICO Y PROSPECCIÓN DE LOS AEROGELSES.....	3
2.3. CLASIFICACIÓN DE LOS AEROGELSES	4
2.4. CARACTERÍSTICAS DE LOS AEROGELSES.....	5
2.5. PROCESO GENERAL DE PREPARACIÓN DE AEROGELSES	5
2.6. MÉTODOS DE SECADO	6
2.7. APLICACIONES DE LOS AEROGELSES	8
2.8. AEROGELSES DE BIOPOLÍMEROS	10
2.9. AEROGELSES DE PROTEÍNAS.....	11
2.10. AEROGELSES DE FIBRAS AMILOIDES	12
2.11. DESCRIPCIÓN DE LAS PROTEÍNAS UTILIZADAS: BETALACTOGLOBULINA Y APOFERRITINA	12
2.11.1. <i>Betalactoglobulina</i>	12
2.11.2. <i>Apoferritina</i>	13
3. OBJETIVOS.....	13
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	13
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
4. METODOLOGÍA: MATERIAL Y MÉTODOS	14
4.1. REACTIVOS	14
4.2. MATERIALES	14
4.3. INSTRUMENTACIÓN.....	15
4.4. PROGRAMAS INFORMÁTICOS	15
4.5. MÉTODOS.....	15
4.5.1. <i>Síntesis de hidrogeles</i>	15
4.5.2. <i>Síntesis de aerogeles</i>	16
4.5.3. <i>Caracterización de hidrogeles por espectroscopía UV-Visible</i>	17
4.5.4. <i>Visualización de fibras amiloides por TEM</i>	18
4.5.5. <i>Caracterización de aerogeles por SEM</i>	18
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
5.1. RESULTADOS CON BETALACTOGLOBULINA.....	19
5.1.1. <i>Síntesis de hidrogeles control</i>	19
5.1.2. <i>Síntesis de hidrogeles con BTCA</i>	20
5.1.3. <i>Síntesis de hidrogeles con NaCl</i>	20

5.1.4. Visualización de fibras amiloides por TEM.....	22
5.1.5. Síntesis de aerogeles de fibras amiloides de betalactoglobulina.....	25
5.1.6. Visualización de aerogeles de fibras amiloides de betalactoglobulina por SEM.....	28
5.2. RESULTADOS CON APOFERRITINA.....	35
5.2.1 Síntesis de hidrogeles con BTCA.....	35
5.2.2. Síntesis de hidrogeles con NaCl.....	35
5.2.3. Visualización de fibras amiloides por TEM.....	37
5.2.4. Síntesis de aerogeles de fibras amiloides de apoferritina.....	39
5.2.5. Visualización de aerogeles por SEM.....	41
5.3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	42
5.3.1. Síntesis de hidrogeles.....	42
5.3.2. Visualización de fibras amiloides por TEM.....	42
5.3.3. Síntesis de aerogeles.....	44
5.3.4. Visualización por SEM.....	45
6. CONCLUSIONES.....	47
7. BIBLIOGRAFÍA.....	48

ABREVIATURAS

-APO: apoferritina

-BLG: betalactoglobulina

-BTCA: Ácido 1,2,3,4-butanotetracarboxílico

-FESEM: *Field Emission Scanning Electron Microscope*

-FIB: *Focused ion beam*

-SEM: *Scanning electron microscopy*

-SHP: Hipofosfito sódico monohidratado

-TEM: *Transmission electron microscopy*

1. RESUMEN

Los aerogeles, especialmente aquellos obtenidos a partir de biopolímeros, son materiales novedosos cuyo desarrollo se encuentra en auge, presentando aplicaciones de lo más variadas y prometedoras. Las fibras amiloides poseen una capacidad de gelificación muy superior a la de otras conformaciones proteicas. Resulta de interés profundizar en el estudio de la formación de aerogeles (y de sus precursores, los hidrogeles) a partir de estas fibras. Se ha investigado la capacidad de formación de hidrogeles de fibras amiloides de dos proteínas: betalactoglobulina y apoferritina. Para cada una de las proteínas se han sintetizado hidrogeles en unas condiciones de pH 2, 90 °C y 5 horas de incubación. Se han variado parámetros como la concentración de proteína (desde 0.67 % hasta 2.5 %) o la adición o no de sales como cloruro sódico (NaCl) y agentes de entrecruzamiento como el ácido 1,2,3,4-butanotetracarboxílico (BTCA). Haciendo uso de la microscopía electrónica de transmisión (TEM) se ha corroborado la presencia de fibras amiloides en los hidrogeles y se ha procedido a la caracterización de estas fibras para cada una de las proteínas. Se ha estudiado la formación de aerogeles a partir de hidrogeles siguiendo dos procedimientos de secado diferentes: liofilización y secado con CO₂ supercrítico. Finalmente, se han caracterizado mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) las estructuras microscópicas resultantes de cada uno de los métodos de secado. Se han obtenido hidrogeles de betalactoglobulina consistentes para concentraciones del 1.33 % y superiores. El proceso de síntesis seguido no resultó exitoso para la formación de hidrogeles de apoferritina a concentraciones inferiores al 2.5 %. Los estudios previos, sin embargo, parecen indicar que a concentraciones superiores de apoferritina podrían obtenerse resultados más favorables. No se apreciaron diferencias significativas en la síntesis de hidrogeles usando NaCl o BTCA frente a la síntesis control en la que no se adicionaba ninguno de estos agentes para la betalactoglobulina. Sin embargo, se ha apreciado que el BTCA podría favorecer la formación de aerogeles de apoferritina, aunque serían necesarios estudios más amplios en esta dirección. Confirmando los resultados de estudios previos, se ha observado por TEM que las fibras amiloides de betalactoglobulina y apoferritina presentan morfologías diferentes incluso para unas mismas condiciones de síntesis. De acuerdo también a estudios previos, se ha confirmado por SEM la diferencia estructural a nivel microscópico de aerogeles obtenidos por liofilización frente a aquellos obtenidos por secado con CO₂ supercrítico. Se ha apreciado por imágenes SEM una modificación en la apariencia de la superficie de las estructuras de aerogeles de betalactoglobulina y NaCl obtenidos por liofilización. Finalmente, se ha observado que el OsO₄, utilizado en la preparación de muestras biológicas para SEM, podría favorecer la conservación de la estructura del aerogel. En este trabajo de fin de grado se han confirmado hallazgos realizados en trabajos anteriores y se han marcado posibles líneas a investigar en estudios futuros dentro del ámbito de los aerogeles basados en proteínas.

Palabras clave: apoferritina, betalactoglobulina, fibras amiloides, hidrogeles, aerogeles.

2. INTRODUCCIÓN

La modalidad de este Trabajo de Fin De Grado es de tipo experimental. La síntesis y caracterización de los aerogeles proteicos se ha llevado a cabo en el laboratorio de investigación correspondiente al grupo de Bionanopartículas Metálicas del Departamento de Química Inorgánica, así como el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

2.1. Definición de aerogel

Un aerogel es un material poroso derivado de un gel cuyo componente líquido ha sido reemplazado por un gas. Un aerogel tendrá, por tanto, dos fases: sólida y gaseosa. [1]

2.2. Desarrollo histórico y prospección de los aerogeles

Los primeros aerogeles, formados a partir de gel de sílice, fueron desarrollados por Steven Kistler en 1931 en California [2]. Desde entonces, y hasta la década de 1980 (años en los que se desarrollaron nuevas rutas sintéticas), el campo permaneció bastante inexplorado dada la complejidad de obtención de estos materiales. En 1986, un grupo de investigación del Lawrence Berkeley Laboratory consiguió sintetizar el primer aerogel de sílice usando CO₂ supercrítico [3]. Este hecho, junto con el desarrollo de los métodos sol-gel y las prometedoras características de los aerogeles despertó en los investigadores un nuevo interés en su estudio [4]. En las últimas dos décadas se ha apreciado un considerable aumento en el número de publicaciones dentro de este área, tal y como puede observarse en la figura 1.

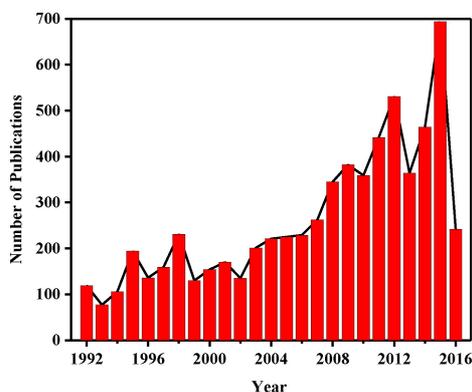


Figura 1: Número de publicaciones cuyo título contiene el término "aerogel" desde 1992 hasta 2016. (Base de datos de Web of Science; fecha de búsqueda: 10 de Mayo de 2016). Nota: Adaptado de "Synthesis and biomedical applications of aerogels: Possibilities and challenges" (p. 10), por Maleki, H. et al., 2016, Advances in Colloid and Interface Science, 236 [5]

De entre todos los materiales utilizados para preparar aerogeles, los basados en sílice son, con diferencia, los mejor estudiados y los más importantes desde el punto de vista comercial, sin embargo, presentan fragilidad mecánica. En los próximos años, y a pesar de los posibles impedimentos que quedan aún por subsanar, tales como el alto coste de fabricación y la baja resistencia mecánica; los autores citados esperan para este mercado un crecimiento medio anual de aproximadamente un 30% [4].

2.3. Clasificación de los aerogeles

Los aerogeles pueden clasificarse, de acuerdo a diversos criterios, de la siguiente forma:

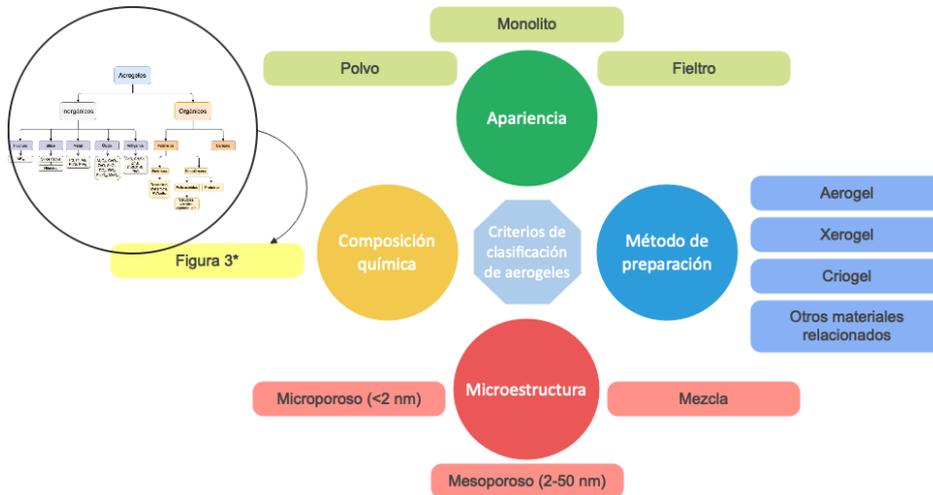


Figura 2. Clasificación de aerogeles de acuerdo a diversos criterios. Figura realizada a partir de información extraída de [6].

En la figura 2 puede observarse que, en función del método de preparación, podrá obtenerse un aerogel, xerogel o criogel. Un aerogel se obtendría mediante secado supercrítico con CO_2 . Por otro lado, la síntesis del xerogel se llevaría a cabo mediante evaporación a bajo vacío o a temperatura ambiente. Finalmente, para la formación de un criogel sería necesario un paso previo de congelación y posterior liofilización [7]. Sin embargo, diversos autores han cuestionado esta clasificación, considerando que tanto xerogeles como criogeles podrían englobarse en la categoría de aerogeles. De aquí en adelante para este trabajo se seguirá dicha premisa.

La clasificación en función de la composición química, se ampliará en la Figura 3 por considerarse el criterio más aceptado [6].

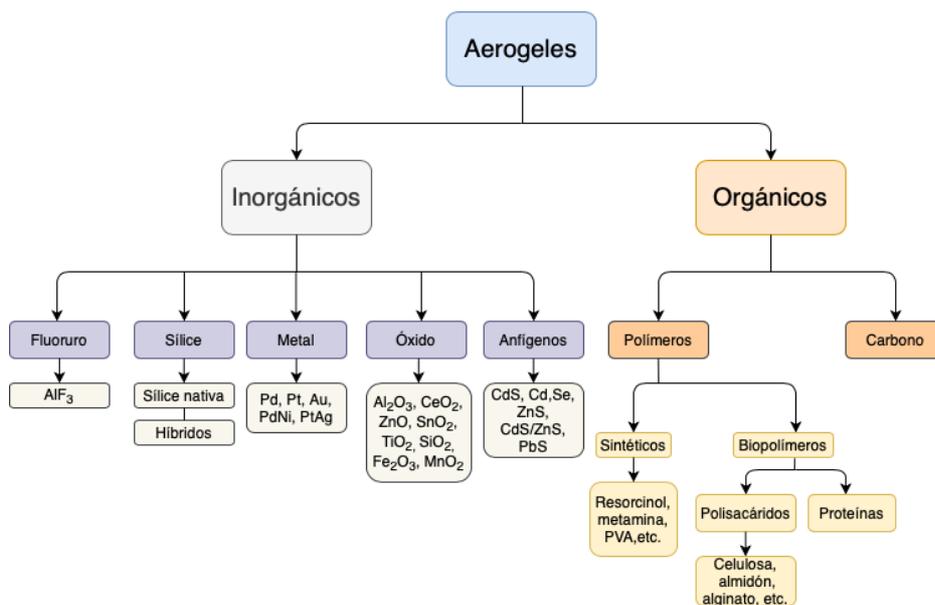


Figura 3. Clasificación de aerogeles en función de la composición química. Nota: Adaptado de "New trends in bio-based aerogels." por Nita et al., 2020, *Pharmaceutics*, 12(5) [4].

2.4. Características de los aerogeles

Los aerogeles son materiales que poseen una estructura y propiedades especiales, que son comunes a todos ellos independientemente del método de preparación y secado. Dichas características son las siguientes:

- Características estructurales: estructura tipo gel, normalmente con esqueletos y poros de tamaño homogéneo al nivel de la nanoescala, microestructura fractal jerárquica (es decir, la estructura a mayor escala reproduce la estructura primaria), capacidad de formar monolitos macroscópicos, red entrecruzada aleatoriamente y, de acuerdo a los autores, generalmente compuestos de materia no cristalina.
- Propiedades: propiedades generales distintas a las de la materia sólida, gaseosa o espumosa tales como densidad relativa, conductividad térmica, constante dieléctrica y velocidad del sonido extremadamente bajas; área específica y porosidad elevadas, y rangos de densidad e índice de refracción extremadamente amplios y ajustables.

Tal y como se ha mencionado, los aerogeles no pueden ser considerados ni sólido ni gas, aunque presentan características comunes a estos dos estados: mantienen su forma y volumen (al igual que la materia en estado sólido), pero su densidad puede llegar a ser de 1 kg/m^3 , inferior a la densidad del aire. Por ello, se ha planteado que puedan conformar un nuevo estado de la materia [6].

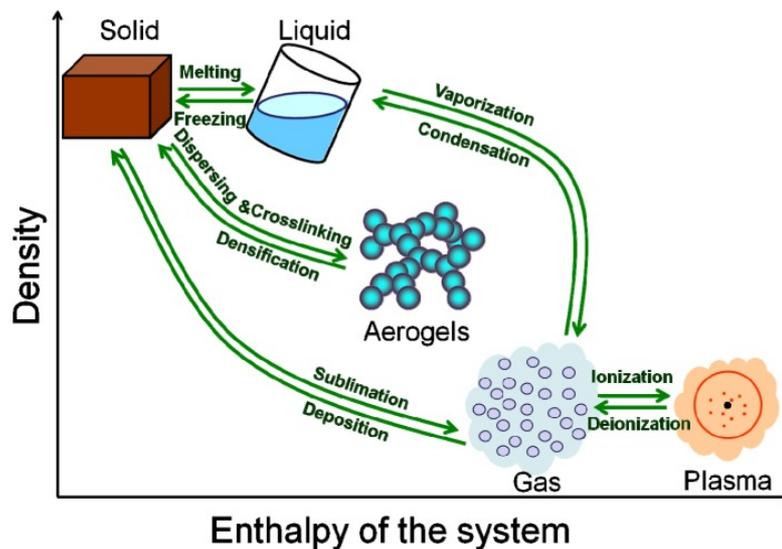


Figura 4. Esquema representativo de los distintos estados de la materia en función de la densidad y la entalpía del sistema. Nota: Adaptado de "A special material or a new state of matter: A review and reconsideration of the aerogel." por Du et al., 2013, Materials, 6(3) [6]

2.5. Proceso general de preparación de aerogeles

El esquema de preparación de un aerogel variará ampliamente en función de la composición y la estructura deseada. A continuación, se tratará de recoger el procedimiento básico de preparación de un aerogel [1,6]:

- Transición disolución-sol: formación, en una disolución precursora, de partículas de sol¹ a nanoescala, bien de forma espontánea o con ayuda de un catalizador.
- Gelificación (transición sol-gel): la gelificación del sol crea una red continua de partículas sólidas suspendidas en el líquido. Estas partículas quedan entrecruzadas, formando un gel húmedo. Si el disolvente de dicho gel húmedo es agua, se tratará de un hidrogel.
- Secado (transición gel-aerogel): el disolvente atrapado en los intersticios de la red del gel se intercambia por un gas (normalmente aire) sin generar daños serios en la estructura. Los métodos de secado más comúnmente utilizados se desarrollarán en el siguiente apartado.

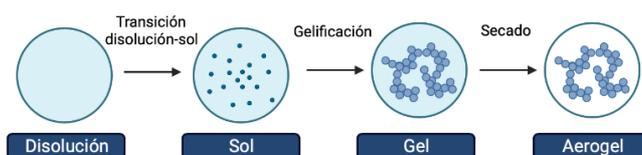


Figura 5. Esquema general de síntesis de un aerogel.

2.6. Métodos de secado

El secado es el paso más crítico en la síntesis de un aerogel ya que, de no utilizarse las condiciones adecuadas, puede producirse el colapso de la nanoestructura. Con objeto de facilitar la explicación y entendimiento de este apartado nos centraremos en el diagrama de fases que se presenta a continuación:

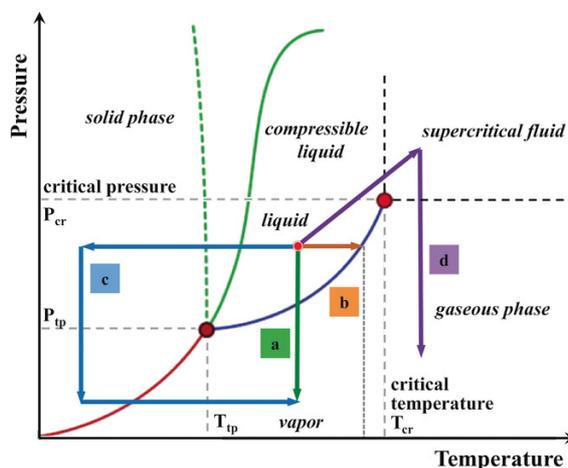


Figura 6. Posibles cambios de presión y temperatura para eliminar el líquido retenido en los poros: a) secado a vacío, b) secado en horno, c) liofilización, d) secado supercrítico. Nota: Adaptado de "Biopolymer Aerogels and Foams: Chemistry, Properties, and Applications." Por Zhao et al., 2018, *Angewandte Chemie-International edition*, 57(26) [9].

¹ Un sol es una suspensión coloidal de partículas sólidas en un líquido. Un coloide es una suspensión en la cual la fase dispersada presenta un tamaño tan escaso (entre 1-1000 nm aproximadamente) que la fuerza gravitacional resulta insignificante; siendo, por tanto, dominantes las fuerzas de corto alcance tales como las de van der Waals y las cargas superficiales [8].

El paso más directo para llevar a cabo el secado es a través de la línea líquido-gas del diagrama de fases: bien aplicando vacío (ruta a) o por secado a temperatura ambiente (ruta b). Sin embargo, estas rutas presentan un problema: el colapso y densificación de una estructura sólida altamente delicada. Las responsables de este colapso son las presiones capilares originadas por la tensión superficial líquido-gas. Con objeto de evitar estas presiones capilares, generalmente se recurre a métodos de secado que rodean la línea líquido-gas del diagrama de fases, evitando atravesarla (c y d) [9]. A continuación se presenta una breve descripción de ambos métodos:

- **Secado supercrítico.** Es, con diferencia, la mejor técnica para conservar la estructura porosa del gel y evitar una pérdida de volumen [10]. Consiste en calentar el gel en un recipiente cerrado hasta que la temperatura y la presión excedan la temperatura y presión críticas del líquido retenido en los poros del gel. Con ello, las fases líquidas y gaseosas se vuelven indistinguibles y desaparecen las presiones capilares. El principal problema que plantea esta técnica es el gasto de tiempo y disolventes, lo que supone un incremento en los costes de producción. De forma general, cuando el líquido que forma el gel es agua, ésta se intercambia por CO₂ líquido, ya que éste presenta unas temperaturas y presiones supercríticas mucho más accesibles: 31 °C frente a 374°C y 78 atm frente a 218 atm [4]. Es necesario llevar a cabo un paso intermedio de intercambio de agua por etanol, que presenta mayor miscibilidad con el CO₂.
- **Liofilización.** Las ventajas de esta técnica son la facilidad de manejo y el bajo coste [10]. La liofilización consiste en el sublimado, mediante la aplicación de bajas presiones, del disolvente previamente solidificado. El mayor inconveniente es la pérdida de porosidad y aumento de densidad por la formación de macroporos debida al desarrollo de grandes cristales de hielo en la red durante la congelación [4].

La influencia del método de secado sobre la estructura final del aerogel puede observarse por imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM):

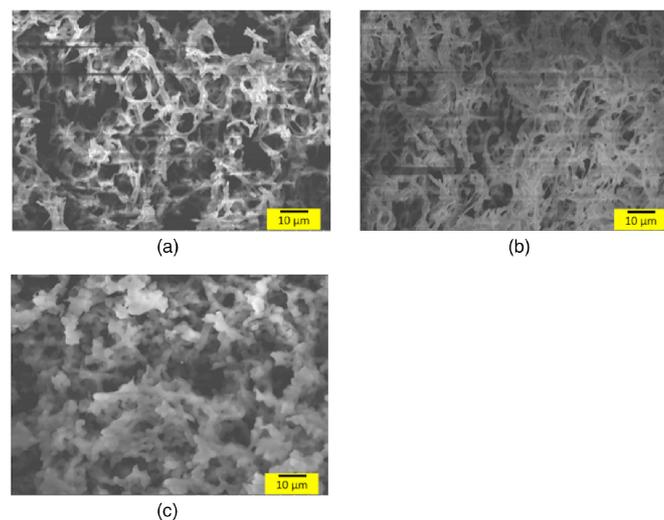


Figura 7. Influencia del método de secado en la estructura interna de un aerogel de fibroína de seda. Los tres secados se realizaron sobre una misma muestra concentrada a un 2% en peso. En a y b se llevó a cabo un secado por liofilización. En el primer caso la congelación se realizó de forma lenta a -20°C, mientras que b se sometió a un proceso de congelamiento rápido a -196°C. En c, se procedió mediante secado supercrítico con CO₂. Nota: Adaptado de “Silk fibroin aerogels: Potential scaffolds for tissue engineering applications.” Por Mallepally et al., 2015, *Biomedical Materials*, 10(3) [11].

2.7. Aplicaciones de los aerogeles

Como se comentaba anteriormente, a día de hoy, los aerogeles más desarrollados y con mayor presencia a nivel comercial son los aerogeles de sílice. De forma más minoritaria, es posible encontrar además aerogeles de carbono y de resorcinol-formaldehído. Algunas de las aplicaciones propuestas por las casas comerciales son: aislamiento térmico y de tuberías, iluminación diurna, sustitución de plásticos por materiales más ligeros, electrodos, catálisis, etc. Entre las empresas encargadas de la fabricación y distribución de estos materiales podemos resaltar: AerogelTechnologies [12], Cabot [13], TiemFactoryInc [14] y Aerogellex [15]. Esta última es una empresa novedosa (creada en 2018) nacida con el objetivo de desarrollar e introducir en el mercado aerogeles hechos de biopolímeros [16].

Por otro lado, la NASA ha descubierto potenciales aplicaciones para los aerogeles de poliimida en forma de película fina y flexible. Estos aerogeles podrían resultar de amplia utilidad en el campo de la aeronáutica y exploración espacial: aislamiento en criotanks y trajes EVA para astronautas, desaceleradores aerodinámicos, escudos térmicos, estructuras ultraligeras y funcionales para la construcción de edificios y vehículos, etc [17].



Figura 8. Aerogel flexible de poliimida. Nota: Adaptado de “Biopolymer Aerogels and Foams: Overview and Outlook for Future Space and Terrestrial Applications at NASA.” Viggiano, R., NASA Glenn Research Center. <https://ntrs.nasa.gov/api/citations/20180005488/downloads/20180005488.pdf>

La biodegradabilidad es la piedra angular en el desarrollo de aerogeles con posibles aplicaciones en ámbitos como agricultura, medio ambiente, farmacia o medicina. Los aerogeles biopoliméricos se presentan como la alternativa principal en un ámbito que no puede ser cubierto por los aerogeles de sílice. De forma clásica, se ha definido biodegradabilidad como: “Descomposición de sustancias por acción de microorganismos. Esta acción lleva al reciclaje del carbono, la mineralización de compuestos orgánicos y la generación de nueva biomasa”. Sin embargo, para los biopolímeros, biodegradación puede implicar fragmentación, pérdida de propiedades mecánicas y en algunos casos degradación por la acción de microorganismos tales como bacterias, hongos y algas [18].

A continuación, se describen algunas de las aplicaciones estudiadas en los aerogeles biopoliméricos:

- Separación petróleo-agua. Se han preparado aerogeles con una textura porosa unidireccional a partir de polisacáridos tales como quitosano o nanofibra de celulosa. Esta estructura, junto con las propiedades superhidrofílicas de los polisacáridos, permite la difusión del agua a través de los canales del aerogel permitiendo al mismo tiempo que la fase orgánica quede retenida en los baches de la superficie [9, 19].

- **Catálisis.** La alta superficie específica de los aerogeles, cuyos valores son comparables a los de las zeolitas microporosas, favorece su uso en catálisis. Los catalizadores basados en aerogeles podrían incluso superar a aquellos fabricados a partir de otros materiales en determinadas aplicaciones tales como las baterías de hidrógeno [20]. Los aerogeles basados en biopolímeros pueden contener determinados grupos funcionales que favorezcan la catálisis de dos formas: bien usando la estructura del aerogel como soporte o, en otros casos, empleando estos grupos funcionales de forma directa [9]. Un ejemplo de este último uso se encuentra en los aerogeles de alginato, que actúan como promotores en la catálisis ácida de la reacción de Mannich [21].

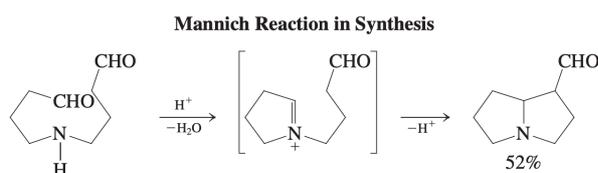


Figura 9. Esquema de la reacción de Mannich. Nota: Adaptado de "Organic chemistry : structure and function" (6th ed.) (p. 995), por Vollhardt et al., 2009, W.H. Freeman [22].

- **Industria alimentaria.** La mayor parte de las materias primas utilizadas en la fabricación de aerogeles biopoliméricos poseen calidad alimentaria. Esto, junto con el hecho de que el secado con CO₂ supercrítico sea una técnica comúnmente usada en esta industria, convierte a estos materiales en candidatos perfectos para abrirse camino dentro de este ámbito [9]. Se han realizado diversos estudios tanto con aerogeles de polisacáridos (almidón, alginato, pectina, celulosa, etc.) como de proteínas (suero de leche, clara de huevo, etc.) [23]. El empaquetado hecho a partir de aerogeles biopoliméricos podría ser una de las primeras aplicaciones en llegar al mercado. La capacidad hidroabsorbente de los aerogeles de polisacáridos permite fabricar envases inteligentes para la carne fresca. También resultarían útiles como sustitutivo del poliestireno expandido (material no biodegradable, difícilmente reutilizable y productor de enormes cantidades de hollín en su combustión) [24]. En otros trabajos se ha sugerido el uso de aerogeles de almidón con la capacidad de liberar de forma sostenida trans-2-hexenal (compuesto con actividad antifúngica) [25]. A día de hoy la incorporación de sustancias tales como vitaminas, aceites, compuestos bioactivos, etc. en alimentos funcionales presenta diversas limitaciones por ser extremadamente sensibles a la degradación en condiciones adversas. Una potencial aplicación sería la liberación controlada de estas sustancias, que podrían quedar retenidas mediante encapsulamiento en el aerogel.
- **Liberación controlada de fármacos.** La biocompatibilidad y la posibilidad de ajustar sus propiedades estructurales convierte a los aerogeles biopoliméricos en candidatos perfectos para mejorar la eficiencia terapéutica de los medicamentos. Las ventajas que aporta el uso de aerogeles biopoliméricos como portadores son las siguientes: aumento de la solubilidad en agua de algunos fármacos, mayor capacidad de carga, incremento de la estabilidad para fármacos amorfos y excelente fluidez en el aire [20]. Podrían ayudar, además, a disminuir los efectos secundarios de fármacos citotóxicos, permitiéndoles alcanzar directamente el órgano diana y

reduciendo la dosis administrada [5]. La carga del fármaco en el aerogel puede llevarse a cabo de varias formas: durante la gelificación, en la etapa de cambio de disolvente, durante el secado supercrítico o incluso en el post-procesado (por ejemplo, impregnando con CO₂ supercrítico). Este último método aporta buenos rendimientos además de proporcionar un producto libre de disolventes. La carga durante el secado, por el contrario, ofrece rendimientos pobres debido a que éste se lleva a cabo con un flujo continuo de CO₂ supercrítico que solubiliza y extrae el fármaco. Los aerogeles de pectina, polisacárido que no es degradado por las enzimas proteolíticas, pueden usarse para dirigir un medicamento directamente al colon, donde la microflora local digerirá la pectina. Este mismo polisacárido, formando microesferas de aerogel dopadas con nanopartículas magnéticas, permite monitorizar el fármaco a tiempo real en el tejido de destino. La baja densidad y alta porosidad de los aerogeles los hace idóneos como portadores de principios activos al tracto respiratorio mediante inhalación [26]. El salicilato sódico, usado en el tratamiento de diabetes, artritis y cáncer, puede liberarse de forma controlada introduciéndolo en un aerogel obtenido a partir de polietilenimina y nanofibras de celulosa [27].

2.8. Aerogeles de biopolímeros

En 1931, Kistler afirmó que la lista de materias primas para la fabricación de aerogeles podría extenderse indefinidamente. La tendencia actual se encuentra dirigida hacia la implantación de materiales renovables por ser baratos, no tóxicos y abundantes. Los biopolímeros cumplen estas características [4]. El grupo de los aerogeles biopoliméricos está liderado por aquellos que contienen polisacáricos (87 %), bien de forma exclusiva o combinados con otras sustancias. Entre ellos destacan la celulosa (45 %), el alginato (12 %), quitosano (10 %), pectina (9 %) y almidón (7 %). Los aerogeles hechos a partir de proteínas suponen un 8% únicamente mientras los híbridos englobarían un 19 % del total.

La síntesis de aerogeles biopoliméricos puede llevarse a cabo por dos vías: a partir de precursores moleculares o a partir de partículas reducidas a nanoescala (ej: nanopartículas de celulosa, nanofibras de quitina, fibras amiloides de proteínas, etc.). Esta segunda vía permite obtener aerogeles cuyas propiedades físicas tales como la conductividad térmica o la resistencia mecánica varían en función de la orientación de los nanobloques precursores. Esto se consigue usando partículas anisotrópicas como nanofibras y nanocristales de celulosa, que pueden ordenarse formando cristales líquidos. Este segundo método conlleva el riesgo de una posible pérdida de homogeneidad en la distribución de las partículas originado por una mezcla inadecuada. Este hecho disminuiría la funcionalidad del material [9].

A continuación, se hará una breve descripción de algunos de los principales tipos de aerogeles biopoliméricos:

- Celulosa. Conforman el grupo más amplio de aerogeles de biopolímeros. Podemos encontrar aerogeles de celulosa sintetizados tanto por vía molecular como a partir de partículas

preexistentes. Las técnicas de entrecruzamiento y secado seguidas son muy diversas, lo que genera finalmente aerogeles con características y propiedades muy variables [9].

- Alginato. Un método común de síntesis de aerogeles de alginato es el entrecruzamiento con cationes divalentes como el Ca^{2+} seguido del modelo de gelificación conocido como “caja de huevos” (*egg-box*) en el que cada catión se coordina con los grupos carboxilo e hidroxilo de cuatro gulunoratos (componentes estructurales del alginato) [5]. La concentración de ión divalente afectará a la estructura final del aerogel [9].
- Quitosano. El quitosano se obtiene por desacetilación parcial de la quitina. Con objeto de fortalecer la estructura del aerogel y mejorar sus propiedades mecánicas se ha combinado con diversas sustancias como polivinil alcohol u óxido de grafeno [4].
- Pectina. La pectina es un carbohidrato complejo de color blanco que se encuentra en las cáscaras de la fruta. Al igual que el alginato, es un polisacárido iónico. Los grupos carboxilato de la estructura de la pectina permiten formar hidrogeles tras la adición de cationes divalentes (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , etc.). La concentración de estos cationes, junto con la de proteína y el rango de pH, modulará la resistencia del aerogel [4].
- Almidón. El proceso más común de gelificación del almidón es el tratamiento térmico, que sigue tres pasos: (i) aumento de tamaño por absorción de agua, (ii) cambios irreversibles a nivel físico y estructural por acción de la temperatura, (iii) recristalización parcial por enfriamiento y envejecimiento. La proporción de amilosa y amilopectina en el almidón depende de la fuente y afecta a la cristalinidad (que aumenta con el porcentaje de amilopectina) y a las propiedades finales [9].

2.9. Aerogeles de proteínas

La formación de un sol a partir de proteínas requiere la alteración de ciertas condiciones del medio de manera que disminuya la solubilidad de la proteína en una disolución acuosa con pH y salinidad próximas a las fisiológicas. En dichas condiciones, la proteína se hallará en estado nativo. En general, la formación de un aerogel está favorecida por conformaciones no-nativas o desnaturalizadas de la proteína. La desnaturalización de la proteína expone en su superficie restos que se encontraban enterrados en la conformación nativa, como los grupos hidrófobos. Estos grupos que han quedado expuestos establecerán interacciones intermoleculares de distinto tipo (enlaces de hidrógeno entre grupos polares, puentes salinos entre grupos cargados, interacciones hidrófobas) que serán responsables de la formación de agregados y consecuente obtención del sol. Debe evitarse, sin embargo, la precipitación completa de una masa sólida que impediría la formación del gel. Por tanto, resulta necesario alcanzar un compromiso entre fuerzas atractivas y repulsivas que mantengan este estado. Las interacciones mencionadas anteriormente serán también las responsables, junto con la formación irreversible de enlaces covalentes (generalmente puentes disulfuro), de la gelificación. Las principales estrategias dirigidas a la formación de un sol y posteriormente un gel serán aquellas seguidas tradicionalmente para la desnaturalización de una proteína: variaciones de temperatura, pH y

salinidad; pudiéndose encontrar además en determinados casos el entrecruzamiento por adición de agentes químicos. En algunos casos la variación de un único parámetro de los mencionados será la responsable de la formación del sol y del gel, mientras que en otros casos se variarán dos o más parámetros de forma combinada [1].

2.10. Aerogeles de fibras amiloides

Las denominadas fibras amiloides funcionales aparecen ampliamente en la naturaleza, pudiéndose encontrar tanto en organismos simples (bacterias) como en aquellos más complejos (seres humanos). Dichas estructuras poseen numerosas funciones biológicas que incluyen catálisis, pigmentación de la piel de mamíferos u hormonas peptídicas/proteicas en los gránulos secretores del sistema endocrino. Las fibras amiloides funcionales contribuyen a la fisiología y el funcionamiento normal de las células y los tejidos [28, 29, 30]

Tradicionalmente, las fibras amiloides se han asociado a patologías como el Alzheimer y el Parkinson. A día de hoy se desconoce el mecanismo de diferenciación de las fibras funcionales y beneficiosas de aquellas asociadas a estados patológicos. Se cree que la toxicidad podría estar ligada a la acumulación de pequeños oligómeros solubles que actúan como intermedios de reacción en la formación de las fibras [28].

En la estructura nativa de la mayoría de proteínas predominan las hélices alfa. Las fibras amiloides, por el contrario, contienen un alto porcentaje de lámina beta cruzada (*cross beta sheet*) en la que las cadenas peptídicas de múltiples monómeros se estiran, se organizan de forma paralela y se unen por enlaces de hidrógeno [31]. *In vitro* y bajo condiciones adecuadas de pH y temperatura es posible lograr el desplegamiento de monómeros de proteínas globulares para formar fibras amiloides. La alta densidad lineal de puentes de hidrógeno que encontramos en estas fibras les confiere propiedades mecánicas excepcionales [32]. Las fibras amiloides poseen una excelente capacidad de gelificación y pueden formar aerogeles diez veces más ligeros que sus homólogos proteicos no fibrilares [1]. Hasta ahora, se ha estudiado la formación de hidrogeles de fibras amiloides obtenidas a partir de betalactoglobulina, lisozima y secuencias de péptidos artificiales. Pueden encontrarse algunos ejemplos en [32, 33, 34].

2.11. Descripción de las proteínas utilizadas: betalactoglobulina y apoferritina

2.11.1. Betalactoglobulina

La betalactoglobulina es una proteína globular que se encuentra presente en la leche de muchos mamíferos. La de origen bovino contiene 162 aminoácidos y su peso molecular es de 18.4 kDa. A nivel estructural está formada por una hélice alfa y nueve láminas beta antiparalelas. A pH entre 2.5 y 7.5 y en presencia de sales se encuentra formando dímeros. Aunque a día de hoy no se conocen con seguridad las funciones de esta proteína, se ha propuesto que podría actuar como transporte de moléculas pequeñas, entre las que se encuentran ácidos grasos, polifenoles y retinoles [35].

2.11.2. Apoferritina

La apoferritina es la proteína resultante de la extracción del hierro en la ferritina. Esta extracción permite liberar la cavidad interna de la proteína manteniendo su estructura interna y externa. La ferritina es la principal proteína de almacén del hierro en la mayor parte de los organismos vivos en los reinos animal, vegetal y microbiano. Su envoltura proteica hueca (la apoferritina) posee un tamaño de unos 12 nm y un peso molecular de aproximadamente 450 kDa. Está compuesta por 24 subunidades ensambladas en una simetría cúbica que rodea una cavidad de 8 nm de diámetro. Esta cavidad es capaz de acomodar 4000 átomos de Fe (III) en forma de un mineral llamado ferrihidrita $[\text{Fe}^{\text{III}}_{10}\text{O}_{14}(\text{OH})_2]$. Estas 24 subunidades pueden clasificarse en subunidades H (*heavy*, cadenas pesadas) y subunidades L (*light*, cadenas ligeras) en función del número de aminoácidos que las forman [36].

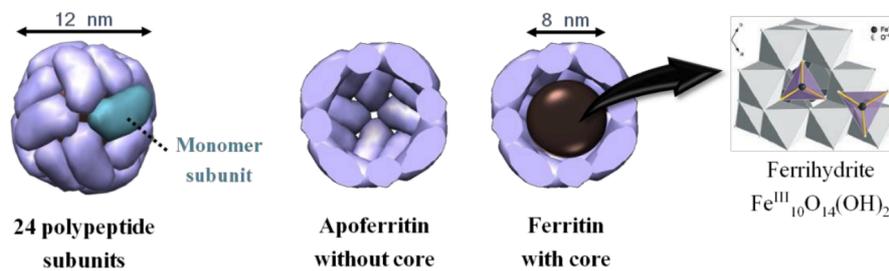


Figura 10. Estructura de la ferritina. Nota: Adaptado de [36].

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

El objetivo principal de este trabajo es la síntesis y caracterización de hidrogeles y aerogeles de fibras amiloides de betalactoglobulina y apoferritina.

3.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos de este TFG son:

- Llevar a cabo una breve revisión bibliográfica dentro del ámbito de los aerogeles y, de forma más concreta, aquellos formados por biopolímeros.
- Sintetizar hidrogeles a partir de fibras amiloides de betalactoglobulina y apoferritina.
- Formar aerogeles partiendo de los hidrogeles obtenidos previamente
- Confirmar la presencia de fibras amiloides en los hidrogeles así como proceder a su caracterización mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)
- Caracterizar la estructura de los aerogeles mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

4. METODOLOGÍA: MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Reactivos

- Betalactoglobulina de leche bovina liofilizada en polvo, SIGMA. (BLG)
- Apoferritina de bazo equino, Sigma-Aldrich (APO)
- Agua MiliQ®, MILLIPORE
- HCl 37%, SIGMA-ALDRICH
- NaOH, Honeywell
- NaCl, Honeywell
- Ácido 1,2,3,4-butanotetracarboxílico (BTCA), ALDRICH.
- Hipofosfito sódico monohidratado (SHP), ALDRICH.
- Etanol absoluto para análisis, Scharlau.
- Glutaraldehído 50% en agua, Fluka.
- Acetato de uranilo, Electron Microscopy Science.

Los residuos generados por estos reactivos fueron desechados en función de su naturaleza sólida, ácida, básica, salina, disolvente orgánico halogenado y no halogenado en el bidón de residuos correspondiente.

4.2. Materiales

- Viales de vidrio graduados de 5 mL con tapón de rosca, marca DWK
- Pipetas automáticas de 100 μ L, 1000 μ L y 5 ml, Thermo Scientific
- Vasos de precipitado de vidrio de diversos volúmenes
- Imanes *rod shape* 3x6 mm, SICAL
- Jeringas 5 mL, BD Emerald™
- Filtros de 0.22 μ m, SARTORIUS®
- Vidrio de reloj
- Placa microtituladora de plástico 24 pocillos de 1.9 cm², Thermo Scientific™
- Parafilm, Bemis
- Aguja, BD Microlance™
- Tubos greiner de centrifuga 50 mL, MERCK
- Placa calentadora, Heidolph y Dicsa
- Tubos eppendorf 1 mL DELTALAB, S.L.
- Rejillas TEM carbon-coated 200 mesh Cu grid
- Pinzas metálicas
- Liofilizador, Telsar Cryodos

4.3. Instrumentación

- Balanza de precisión, SARTORIUS®
- pHmetro sensION™ PH31, HACH
- Espectrofotómetro UV-Vis UNICAM UV 300, Thermo Scientific™
- Microscopios electrónicos de transmisión. **1)** Microscopio electrónico de transmisión: LIBRA 120 PLUS de Carl Zeiss SMT. **2)** Microscopio electrónico de transmisión de alta resolución HAADF Thermo Fisher Scientific TALOS F200X.e3
- Microscopios electrónicos de barrido. **1)** AURIGA (FIB-FESEM) de Carl Zeiss SMT Estación de Trabajo CrossBeam por Bombardeo Iónico Focalizado, incorporada a un Microscopio Electrónico de Barrido de Alta Resolución por Emisión de Campo **2)** Microscopio Electrónico de Barrido de Alta Resolución por emisión de campo GEMINI (FESEM) de Carl Zeiss

4.4. Programas informáticos

- MATLAB_R2016b: representación de espectros UV-Vis
- ImageJ: medida de distancias en imágenes

4.5. Métodos

4.5.1. Síntesis de hidrogeles

Para la síntesis de aerogeles es necesaria la preparación previa de los correspondientes geles húmedos, en este caso hidrogeles, ya que el disolvente que se ha utilizado ha sido agua.

Con objeto de estudiar el efecto sobre la formación de los hidrogeles de la adición de agentes de entrecruzamiento tales como BTCA o el aumento de la fuerza iónica con NaCl, se plantearon cuatro tipos de síntesis distintas. En primer lugar, una síntesis de control, que se describe en el procedimiento general, cuyos pasos son comunes para las cuatro síntesis (con ligeros cambios puntuales que se indican en cada caso). Seguidamente, se describe la síntesis usando BTCA como agente de entrecruzamiento. Finalmente, se expone el procedimiento para la preparación de muestras usando NaCl con objeto de aumentar la fuerza iónica. En un caso se añade el NaCl antes del tratamiento térmico y en otro se añade tras el tratamiento térmico.

4.5.1.a. Procedimiento general (síntesis control)

1. En un vial de vidrio con tapón, preparar 3 mL de una disolución acuosa al porcentaje en peso de proteína correspondiente. Para los preparados de BLG se pesa la cantidad necesaria de proteína, de la cual se dispone en estado sólido. Para 3 ml de disolución al 2 % se pesarían 60 mg de BLG. En la preparación de muestras de otras concentraciones, se calculan los mg mediante una proporción. Una vez pesada la cantidad de proteína estimada, se añaden 3 mL de agua MilliQ y se agita con imán y placa agitadora hasta que la proteína quede disuelta. Las muestras de APO se prepararon a partir de una disolución comercial, cuya concentración

exacta (10^{-4} M) se determinó mediante espectroscopía UV-Visible. En el caso de muestras de APO al 2 %, se toman 1.3 ml de disolución comercial. El volumen restante hasta 3 mL se completa con agua MilliQ. Para otras concentraciones, se calcula el volumen proporcional correspondiente de disolución comercial de APO. Agitar hasta disolución completa. Nota: en las muestras en las que se añade 1 ml de disolución de NaCl, preparar volúmenes de disolución de 2 mL, de forma que se obtenga el volumen final de 3 mL tras la adición del NaCl.

2. Con ayuda del pHmetro, se obtiene el pH de la disolución de proteína ($\text{pH}\approx 7$). Usando el modo de trabajo *en continuo*, añadir gota a gota una disolución de HCl 1M hasta $\text{pH}=2$. En caso de excederse, rectificar añadiendo NaOH 1M gota a gota.
3. Filtrar la disolución con ayuda de una jeringa acoplada a un filtro de $0.22\ \mu\text{m}$.
4. Introducir el vial de vidrio tapado en un baño de aceite colocado sobre una placa calentadora. Fijar el vial con ayuda de una pinza para evitar su desplazamiento y asegurar la máxima homogeneidad en el tratamiento térmico. Calentar a $90\ ^\circ\text{C}$ con agitación de 100 rpm durante 5 horas.
5. Enfriar en baño de hielo inmediatamente tras sacar el vial del baño de aceite.

4.5.1.b. Síntesis con BTCA

Tras el tratamiento térmico, añadir el agente de entrecruzamiento BTCA en una proporción (en peso) 1 BTCA:5 proteína. Adicionar el catalizador SHP en una proporción (en peso) 1 BTCA:2 SHP. Agitar con agitador magnético. Conservar en frigorífico a $4\ ^\circ\text{C}$.

Para determinadas muestras se probó a introducir el hidrogel en un horno durante 3 min a $150\ ^\circ\text{C}$ con objeto de favorecer el entrecruzamiento con BTCA.

4.5.1.c. Síntesis con NaCl

- Adición previa al tratamiento térmico. Antes de proceder al tratamiento térmico, añadir gota a gota 1 mL de una disolución de NaCl de forma que la concentración final de NaCl en la muestra sea 150 mM. Agitar en agitador magnético.
- Adición tras tratamiento térmico. Una vez sacada la muestra del baño de aceite y enfriada en baño de hielo, añadir 1 mL de NaCl siguiendo los mismos pasos que en el punto anterior.

4.5.2. Síntesis de aerogeles

Para transformar un hidrogel en aerogel es necesario llevar a cabo un proceso de secado. En este trabajo se ha estudiado el efecto sobre la estructura final del aerogel de dos métodos diferentes de eliminación del disolvente retenido en la red de los hidrogeles: liofilización y secado con CO_2 supercrítico.

En algunas muestras y, como paso previo al secado, se adicionaron dos gotas de una disolución de glutaraldehído al 25 % (w/w), dejándolo actuar durante al menos 24 h. De acuerdo a la bibliografía, el glutaraldehído podría ayudar en el entrecruzamiento y fortalecimiento de la estructura del gel [37, 38].

4.5.2.a. Liofilización

Verter unos 2 mL de muestra en un pocillo de una placa microtituladora. Tapar la placa con papel de parafilm y, con ayuda de una aguja, realizar unas pequeñas incisiones sobre la zona que cubre la muestra. Congelar a -20 °C. Liofilizar a 0.097 mBar y -42.2 °C durante 48 h.

4.5.2.b. Secado con CO₂ supercrítico

Este procedimiento fue llevado a cabo por especialistas en preparación de muestras biológicas del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada (CIC).

En primer lugar, se lava con una disolución tampón de cacolidato 0.1 M y pH 7.4. Se realizan tres cambios de 15 min cada uno a 4 °C.

A continuación se deshidrata la muestra con un gradiente de concentraciones crecientes de etanol. La secuencia fue la siguiente:

1. Etanol 50% durante 15 min. t.a.
2. Etanol 70% durante 15 min. t.a.
3. Etanol 90% durante 15 min. t.a.
4. Etanol 100% (3 cambios de 15 minutos cada uno).

Para extraer el disolvente y obtener el aerogel se usó un desecador Leica EM CPD300 y se siguió el método de desecación por punto crítico propuesto por Anderson en 1951 [39].

En una de las muestras se estudió el efecto de la fijación con tetróxido de osmio (procedimiento habitual en la preparación de muestras biológicas). Se siguió el siguiente protocolo:

1. Fijación con tetróxido de osmio al 1% en oscuridad durante 1 hora y a temperatura ambiente
2. Lavado en agua destilada (3 cambios de 5 min. cada uno).

La fijación con OsO₄ se llevó a cabo antes de la deshidratación por gradientes de etanol.

4.5.3. Caracterización de hidrogeles por espectroscopía UV-Visible

Con objeto de determinar la concentración exacta de proteína en cada hidrogel se realizaron medidas de absorbancia en un Espectrofotómetro UV-Vis UNICAM UV 300. Se usaron cubetas de cuarzo de 10 mm de camino óptico. En primer lugar, se diluye la muestra en un factor 1:10, 1:20 ó 1:100 dependiendo de la concentración de cada una y tratando de que la absorbancia en el máximo no supere una unidad de absorbancia. Se mide el espectro entre 200 nm y 400 nm. La concentración de proteína en cada muestra se calcula tomando el valor de absorbancia en el máximo (280 nm) y siguiendo la Ley de Lambert-Beer (1), de acuerdo a la cual la absorbancia (A) es proporcional a la concentración (c), el camino óptico (b) y el coeficiente de extinción molar (ϵ) [40]:

$$A = b \cdot c \cdot \epsilon \quad (1)$$

4.5.4. Visualización de fibras amiloides por TEM

El procedimiento de preparación de muestras de hidrogeles para la caracterización de fibras amiloides por microscopía electrónica de transmisión fue el siguiente:

1. Diluir la muestra en un factor 1:100.
2. Sobre un vidrio de reloj, depositar una gota de muestra diluida.
3. Con ayuda de unas pinzas, colocar una rejilla sobre la muestra de forma que la cara de la rejilla recubierta con carbón sea la que esté en contacto con la muestra. Dejar que la muestra se absorba durante un minuto.
4. Para las muestras preparadas con NaCl, depositar la rejilla durante un minuto sobre una gota de agua MiliQ con objeto de retirar el exceso de sal.
5. Depositar la rejilla por su cara recubierta de carbón sobre una gota del agente de contraste acetato de uranilo en una concentración de 0.1% ó 0.5%. Esperar un minuto y retirar la rejilla.
6. Colocar la rejilla sobre un papel de filtro y dejar secar durante al menos una noche.

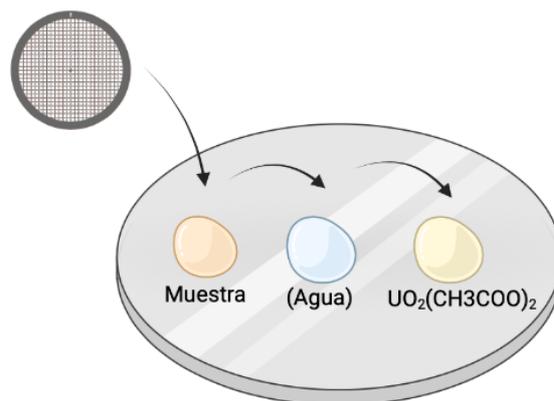


Figura 11. Preparación de muestras para TEM.

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión se adquirieron operando a 200 kV en el equipo de alta resolución HAADF Thermo Fisher Scientific TALOS F200X.e3 y a 120 kV en el equipo LIBRA 120 PLUS.

4.5.5. Caracterización de aerogeles por SEM

La preparación de muestras para SEM fue realizada por especialistas en muestras biológicas del CIC. Las muestras fueron recubiertas por una fina capa de carbono (~ 3nm) en un evaporador de Carbón EMITECH K975X.

Las imágenes de SEM de electrones secundarios se adquirieron a 3 kV en el equipo AURIGA (FIB.FESEM) y a 5 kV en el equipo GEMINI (FESEM).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Resultados con betalactoglobulina

5.1.1. Síntesis de hidrogeles control

A continuación se detallarán los resultados obtenidos para los hidrogeles de betalactoglobulina siguiendo la síntesis control, es decir, sin añadir agentes de entrecruzamiento como BTCA ni sales como NaCl, solamente partiendo de una disolución de proteína y ajustando las condiciones de pH y temperatura para la formación de las fibras amiloides y el hidrogel. El criterio que se seguirá para evaluar la bondad de los resultados será el aspecto del gel a simple vista (mayor o menor consistencia), considerando que el hidrogel será suficientemente consistente cuando al invertir el vial de vidrio en el que se encuentra el hidrogel éste no cae por acción de la gravedad. En algunos casos se considerará el resultado como “relativamente aceptable”, siendo casos en los que el hidrogel presenta cierta consistencia pero cae pasados unos segundos.

Se prepararon disoluciones de proteína a diversas concentraciones (1 %, 2 % y 2.5 %). Se corroboró la concentración de las disoluciones a partir del máximo de absorbancia (280 nm) en espectros UV-Vis. Se muestra uno de los espectros a modo de ejemplo:

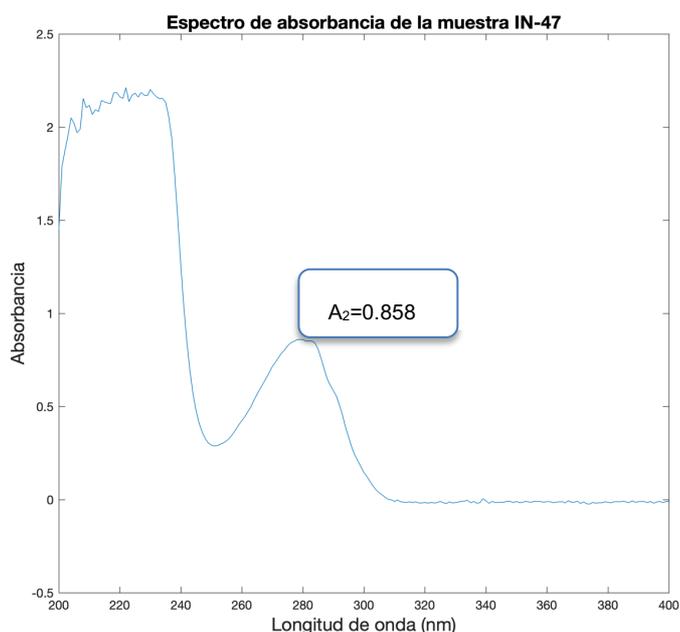


Figura 12. Espectro de absorbancia UV-Vis tomado diluyendo una muestra del 2.5 % en un factor 1/25

La concentración obtenida a partir del espectro fue del 2.3 %, algo menor de la teórica (2.5 %). Esta diferencia puede deberse principalmente a la ligera dilución que se produce en la muestra al añadir pequeñas gotas de HCl 1M para ajustar el pH a 2.

- Para un 1 % se sintetizó un único hidrogel, que no dio buen resultado
- Para un 2 % se sintetizaron dos hidrogeles, dando ambos buenos resultados

- Para un 2.5 % se sintetizaron ocho hidrogel; dando cuatro buenos resultados, uno un resultado relativamente aceptable (cierta consistencia, pero menor que los anteriores) y tres malos resultados.



Figura 13. Comparación entre un hidrogel con buen resultado (izquierda) y un hidrogel con mal resultado (derecha). Ambos hidrogel con concentración 2.5%. Puede apreciarse cómo en la imagen izquierda al invertir el vial el gel queda inmobilizado en la parte superior y el imán usado para la síntesis queda retenido en el gel. En la imagen derecha, por el contrario, el gel cae hacia la parte inferior tras invertir el vial.

5.1.2 Síntesis de hidrogel con BTCA

Se llevaron a cabo síntesis con el agente de entrecruzamiento BTCA a partir de disoluciones de proteína al 1 %, 1.33 %, 2 % y 2.5 %.

- Para un 1 % se prepararon dos muestras, ninguna dio buen resultado.
- Para un 1.33 % se preparó una muestra, que dio buen resultado.
- Para un 2 % se prepararon siete muestras; de las cuales tres dieron buen resultado, una un resultado relativamente aceptable y tres malos resultados. En dos de las que dieron malos resultados no se aplicó agitación durante el tratamiento térmico. En la tercera se ensayó una aproximación mixta con BTCA+NaCl 150 mM tras tratamiento térmico.

5.1.3. Síntesis de hidrogel con NaCl

En este caso se ensayaron en total cuatro estrategias alterando dos parámetros: la concentración del NaCl en el hidrogel (150 mM ó 200 mM) y la adición del NaCl de forma previa o posterior al tratamiento térmico. Se trabajó con concentraciones del 0.67 %, 1 %, 1.33 %, 1.5 %, 2 % y 2.5 %.

- NaCl 150 mM antes del calentamiento:
 - Para un 1 % se preparó una única muestra, que no dio buen resultado
 - Para un 2 % se preparó una muestra, que dio buen resultado
 - Para un 2.5 % se preparó una muestra, que dio buen resultado

- NaCl 150 mM después del calentamiento:
 - Para un 1.33 % se preparó una muestra, que no dio buen resultado
 - Para un 2 % se prepararon dos muestras. Una dio buen resultado pero la segunda no. Esta segunda fue en la que se siguió la estrategia mixta NaCl+BTCA descrita anteriormente
- NaCl 200 mM antes del calentamiento:
 - Para un 0.67 % se preparó una muestra, que no dio buen resultado
 - Para un 1.33 % se preparó una muestra, que dio buen resultado
 - Para un 1.5 % se preparó una muestra, que dio buen resultado
- NaCl 200 mM después del calentamiento:
 - Para un 0.67 % se preparó una muestra, que no dio buen resultado
 - Para un 1.33 % se preparó una muestra, que dio buen resultado
 - Para un 1.5 % se preparó una muestra que, dio buen resultado

A continuación se presenta una tabla a modo de resumen de los resultados obtenidos para cada una de las estrategias anteriormente descritas:

Tabla 1. Resumen de los resultados obtenidos en las distintas estrategias de síntesis de hidrogeles con betalactoglobulina. En rojo, se señalan las muestras que dieron malos resultados. En verde, las que dieron buen resultado. En naranja, las que dieron resultados relativamente aceptables. La muestra IN-41 aparece señalada con un asterisco porque se usó una estrategia mixta BTCA+NaCl, por lo que aparece en ambos apartados. Las siglas n.a. en las muestras IN-38 e IN-39 significan “no agitación”.

	0.67%	1%	1.33%	1.5%	2%	2.5%
Control	-----	IN-7	-----	-----	IN-8 IN-40	IN-9 IN-42 IN-43 IN-44 IN-45 IN-46 IN-47 IN-48
BTCA	-----	IN-4 IN-13	IN-31	-----	IN-1 IN-5 IN-14 IN-35 IN-38 (n.a.) IN-39 (n.a.) IN-41*	IN-6 IN-15
NaCl 150 mM (antes)	-----	IN-10	-----	-----	IN-11	IN-12
NaCl 150 mM (después)	-----	-----	IN-30	-----	IN-34 IN-41*	-----
NaCl 200 mM (antes)	IN-17	-----	IN-18	IN-19	-----	-----
NaCl 200 mM (después)	IN-25	-----	IN-24	IN-26	-----	-----

5.1.4. Visualización de fibras amiloides por TEM

Algunas muestras fueron seleccionadas para comprobar, mediante microscopía electrónica de transmisión, la presencia de fibras amiloides en los hidrogeles.

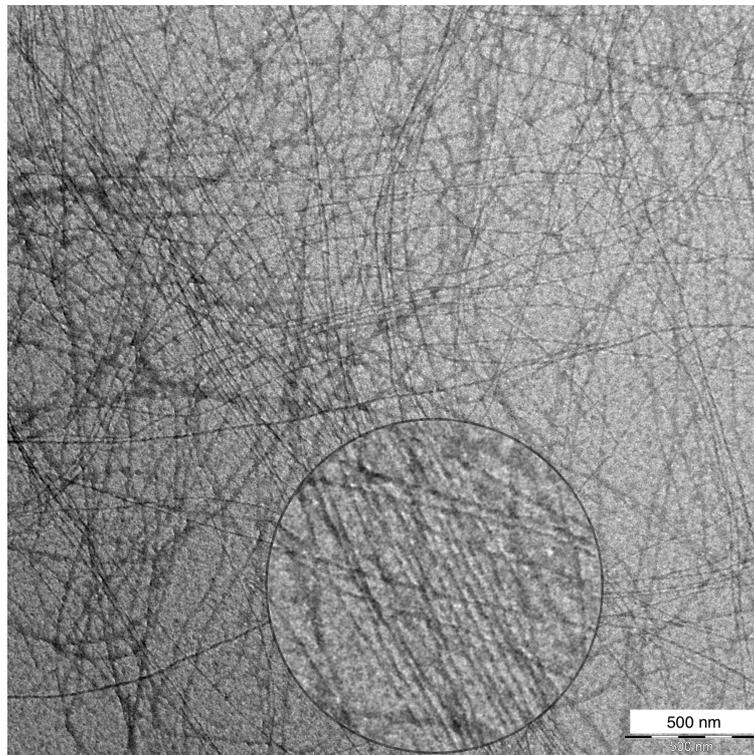


Figura 14. Imagen TEM LIBRA 120 PLUS de Carl Zeiss SMT de la muestra IN-1 (concentración de proteína del 2 % y estrategia con BTCA). Se puede observar la presencia de fibras amiloides. Rodeada en negro se presenta ampliada una zona en la que se observa un apilamiento ordenado de las fibras.

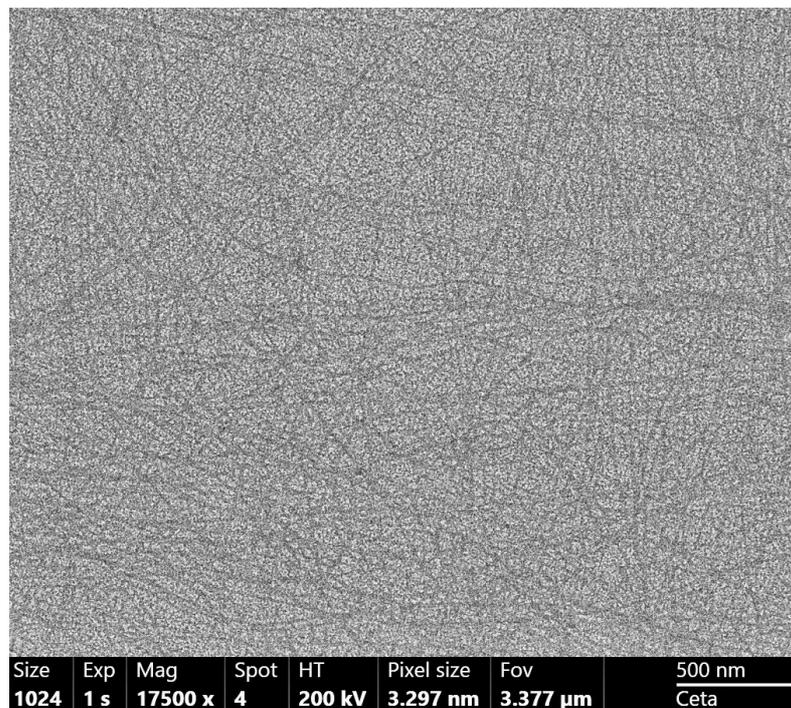


Figura 15. Imagen TEM HAADF Thermo Fisher Scientific TALOS F200X.e3 de la muestra IN-1 (concentración de proteína del 2 % y estrategia con BTCA).

Las figuras 14 y 15 corresponden a una misma muestra y preparación pero fueron tomadas por distintos equipos. Puede apreciarse que el equipo TEM HAADF Thermo Fisher Scientific TALOS F200X.e3 requiere una mayor concentración de agente de contraste para obtener una visualización clara de las fibras amiloides.

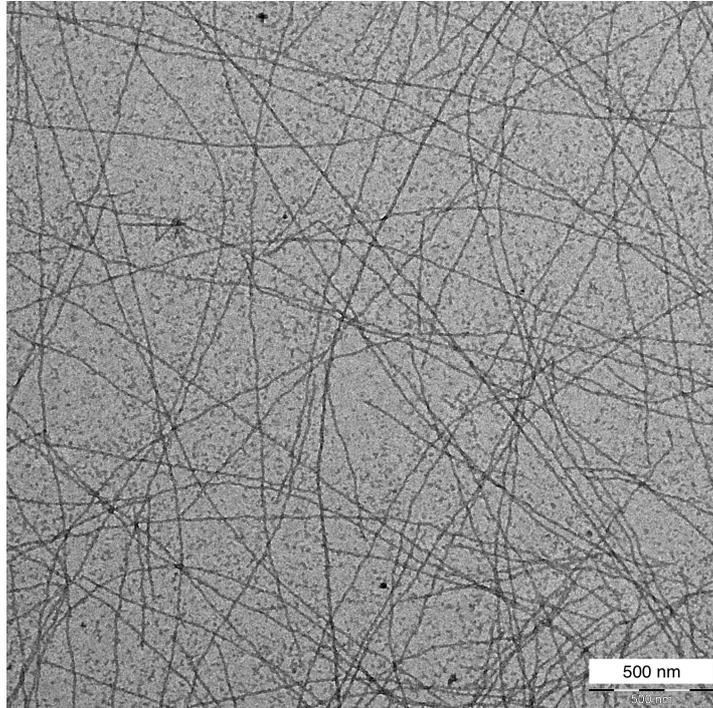


Figura 16. Imagen TEM LIBRA 120 PLUS de Carl Zeiss SMT de la muestra IN-7 (concentración de proteína del 1 %, estrategia control). Se puede observar la presencia de fibras amiloides.

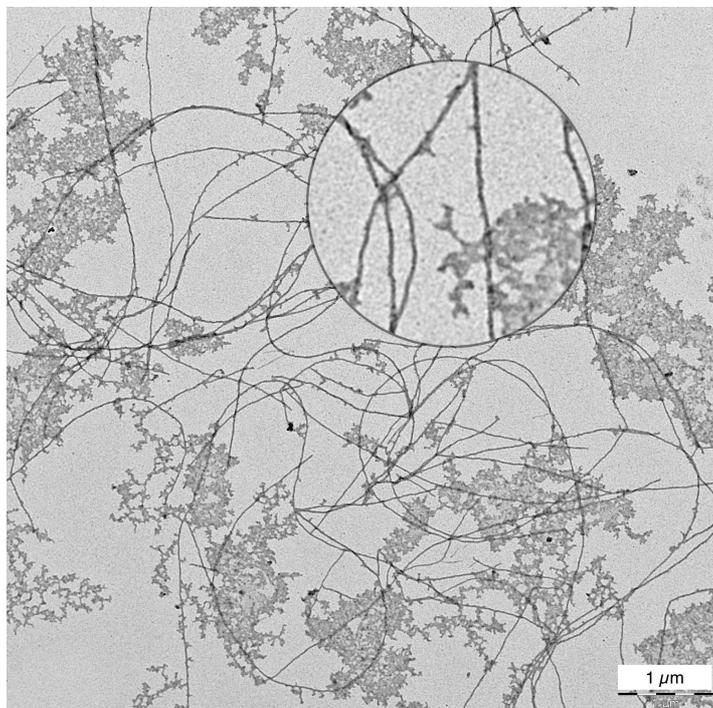


Figura 17. Imagen TEM LIBRA 120 PLUS de Carl Zeiss SMT de la muestra IN-31 diluida con agua miliQ en un factor 1/100 (concentración de proteína del 1.33 %, estrategia con BTCA). Se puede observar la presencia de fibras amiloides.

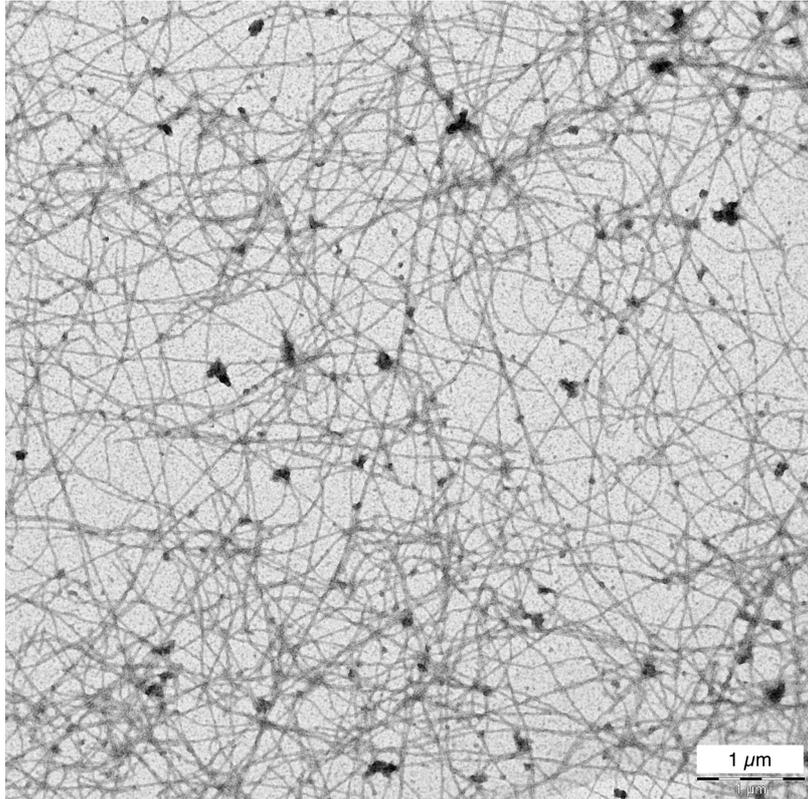


Figura 18. Imagen TEM LIBRA 120 PLUS de Carl Zeiss SMT de la muestra IN-35 diluida con agua miliQ en un factor 1/100 (concentración de proteína del 2 %, estrategia con BTCA). Se puede observar la presencia de fibras amiloides.

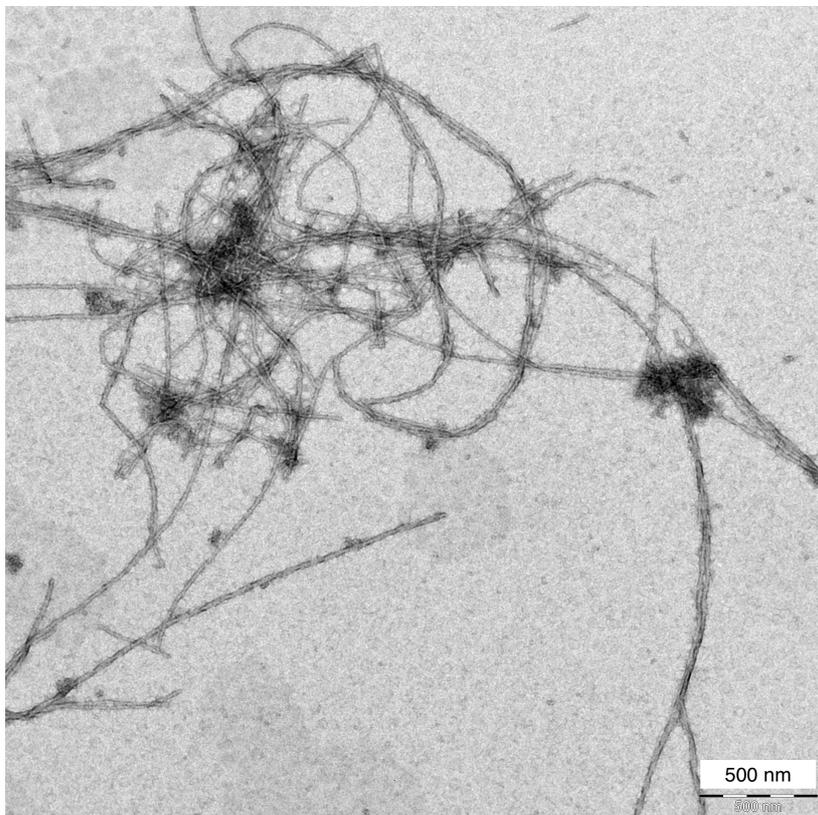


Figura 19. Imagen TEM LIBRA 120 PLUS de Carl Zeiss SMT de la muestra IN-35 diluida con agua miliQ en un factor 1/100 (concentración de proteína del 2 %, estrategia con BTCA). Se puede observar la presencia de fibras amiloides.

En la imagen siguiente se muestran las medidas del grosor de las fibras amiloides de betalactoglobulina, tomadas con ayuda del programa de edición de imagen ImageJ. El grosor medio obtenido es de unos 13 nm.

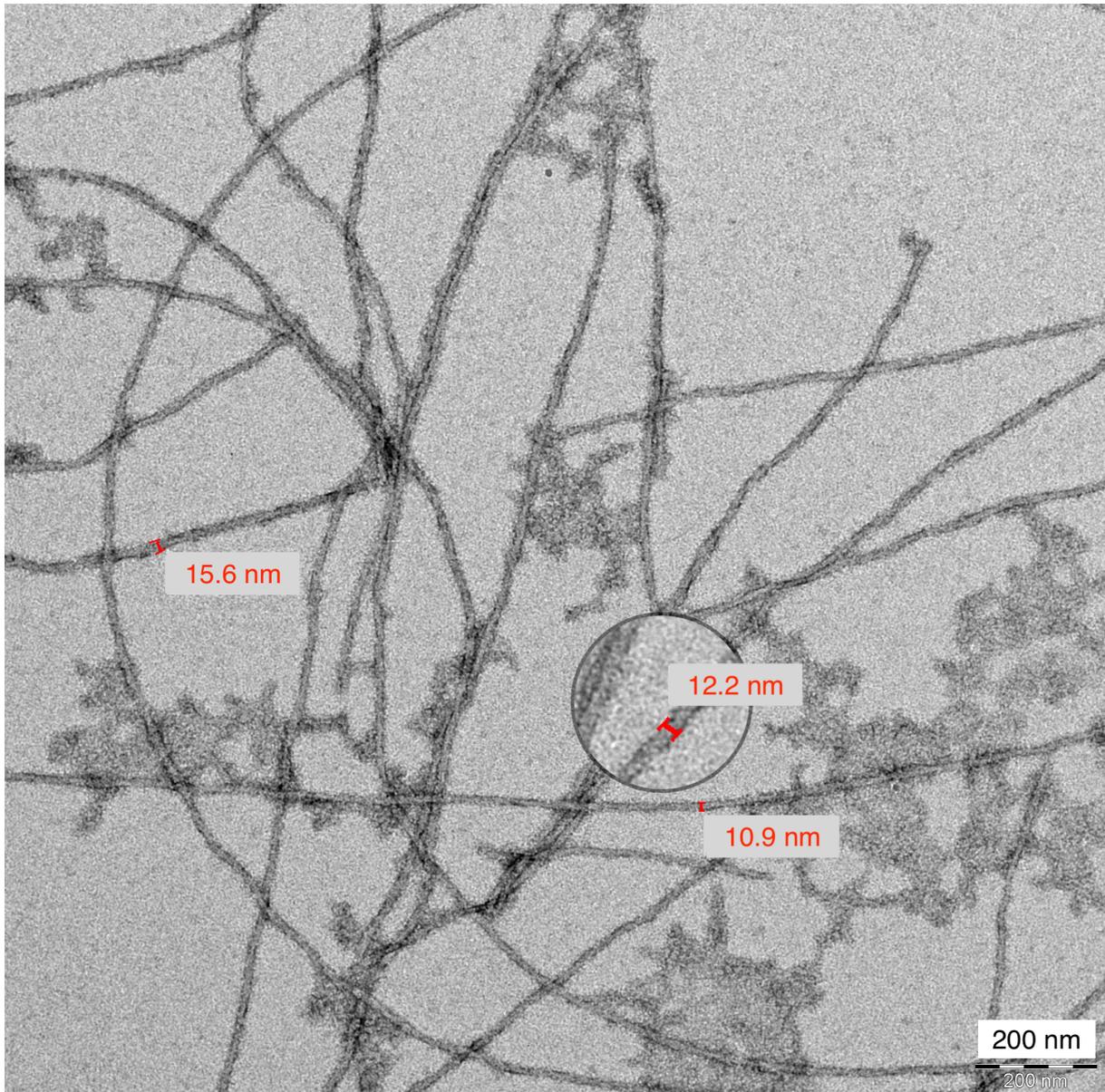


Figura 20. Imagen TEM LIBRA 120 PLUS de Carl Zeiss SMT de la muestra IN-31 diluida con agua miliQ en un factor 1/100 (concentración de proteína del 1.33 %, estrategia con BTCA).

5.1.5. Síntesis de aerogels de fibras amiloides de betalactoglobulina

A continuación se muestran fotografías de los aerogels de betalactoglobulina obtenidos por liofilización que dieron mejores resultados. No se dispone de fotografías a nivel macroscópico de aquellos obtenidos por secado con CO₂ supercrítico. El criterio para determinar la bondad de un aerogel a simple vista es que presente un aspecto esponjoso, homogéneo y que no esté excesivamente fracturado. Los aerogels expuestos en las fotografías siguientes fueron obtenidos añadiendo 2 mL de hidrogel en un pocillo de la placa tituladora. También se ensayó la síntesis de aerogels liofilizando

directamente en los viales de vidrio donde se formaron los hidrogeles. Esta estrategia se desechó tras obtener hidrogeles altamente fracturados y adheridos a las paredes del vial. Una segunda estrategia fallida fue la adición de únicamente 0.5 mL por pocillo. El resultado obtenido se muestra en la Figura 21:



Figura 21. Estrategia fallida de síntesis de aerogeles por adición de un volumen insuficiente de hidrogel.



Figura 22. Aerogel obtenido por liofilización a partir del hidrogel IN-8 (2% betalactoglobulina, estrategia control). En el círculo de la esquina superior derecha de la imagen aparece la estructura microscópica vista por SEM AURIGA (FIB.FESEM) de Carl Zeiss SMT.

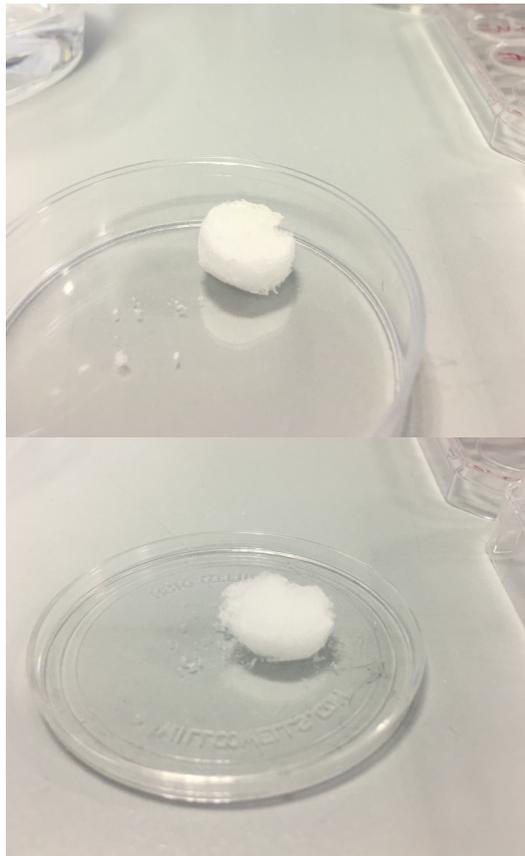


Figura 23 Arriba: aerogel obtenido por liofilización a partir del hidrogel IN-11 (2% betalactoglobulina, estrategia NaCl 150 mM antes del tratamiento térmico). Abajo :aerogel obtenido por liofilización a partir del hidrogel IN-12 (2.5% betalactoglobulina, estrategia NaCl 150 mM antes del tratamiento térmico)

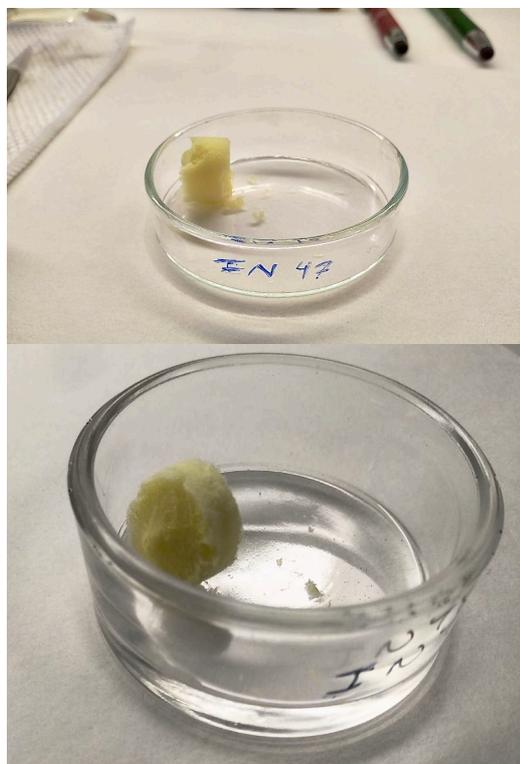


Figura 24. Arriba: aerogel obtenido por liofilización a partir del hidrogel IN-47 (2.5 % betalactoglobulina, estrategia control). Abajo: aerogel obtenido por liofilización a partir del hidrogel IN-48 (2.5% betalactoglobulina, estrategia control)

5.1.6. Visualización de aerogeles de fibras amiloides de betalactoglobulina por SEM

A continuación se muestran imágenes de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución de los aerogeles obtenidos por liofilización y por secado con CO₂ supercrítico.

5.1.6.a. Aerogeles obtenidos por liofilización

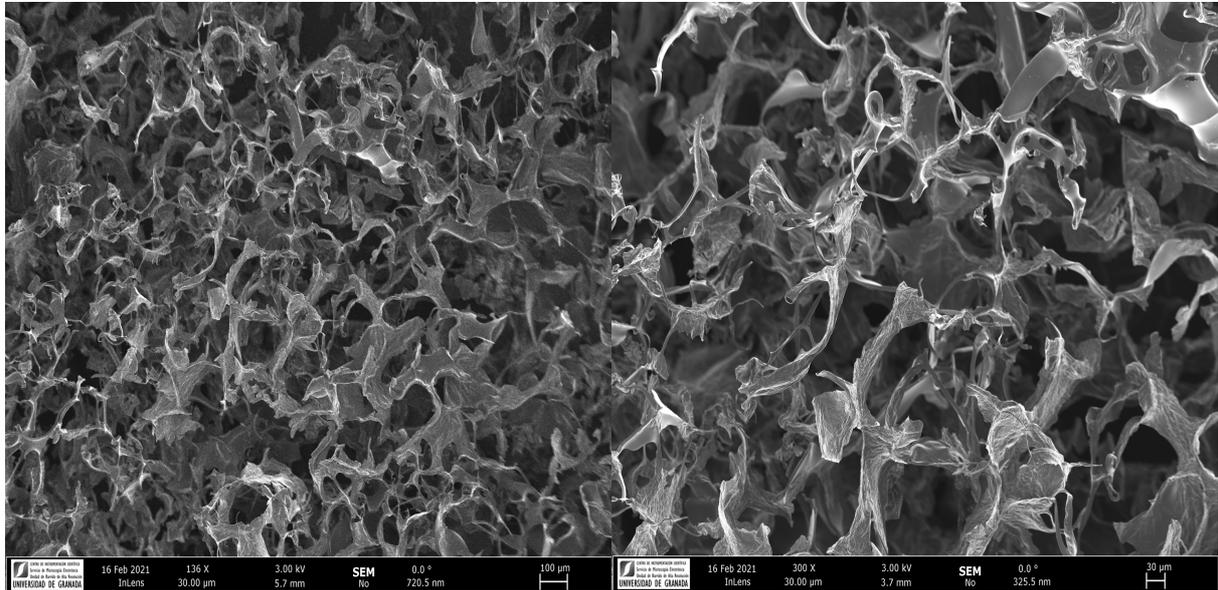


Figura 25. Imágenes SEM AURIGA (FIB.FESEM) de Carl Zeiss SMT (escala 100 µm izquierda, 30 µm derecha) del aerogel obtenido por liofilización del hidrogel IN-8 (2 % betalactoglobulina, estrategia control).

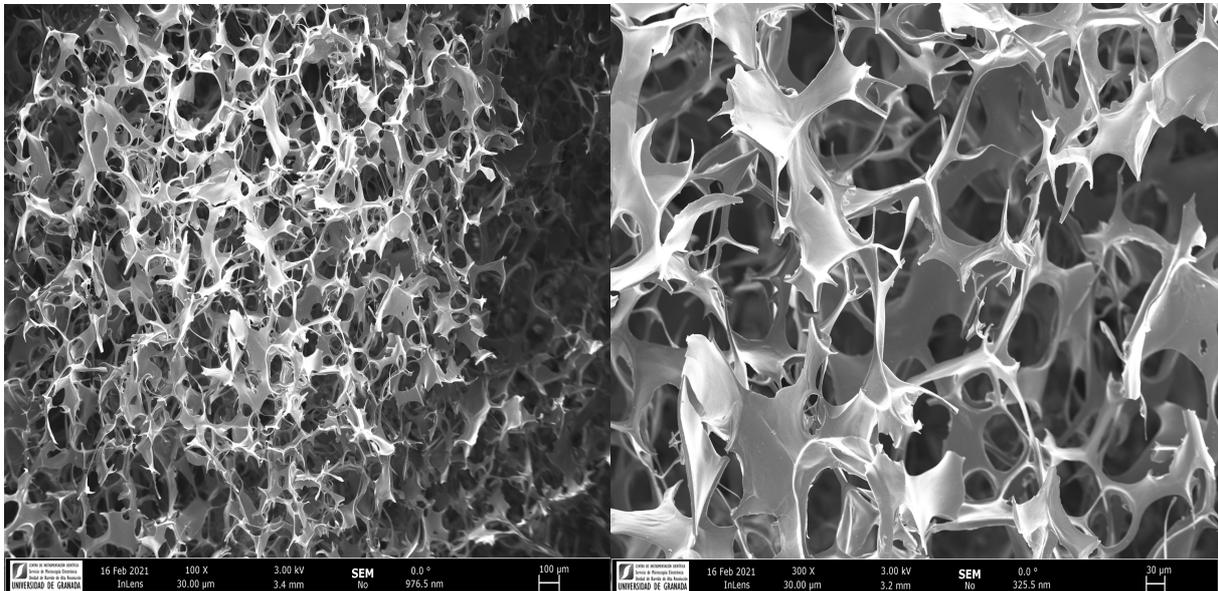


Figura 26. Imágenes SEM AURIGA (FIB.FESEM) de Carl Zeiss SMT del aerogel obtenido por liofilización del hidrogel IN-11 (2 % betalactoglobulina, estrategia NaCl 150 mM previo a tratamiento térmico).

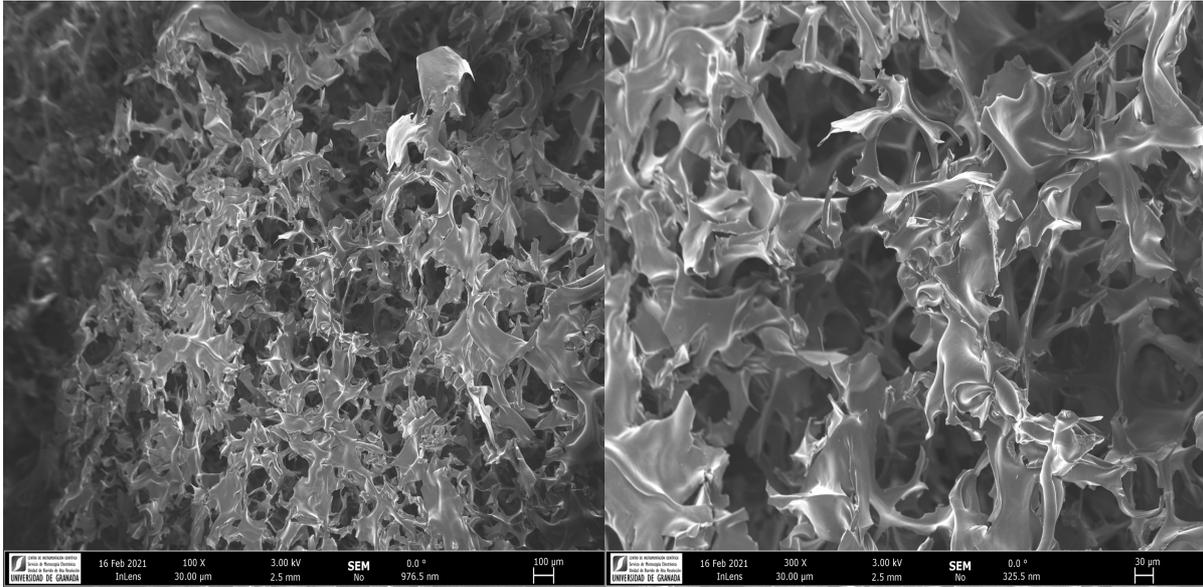


Figura 27. Imágenes SEM AURIGA (FIB.FESEM) de Carl Zeiss SMT del aerogel obtenido por liofilización del hidrogel IN-12 (2.5 % betalactoglobulina, estrategia NaCl 150 mM previo a tratamiento térmico).

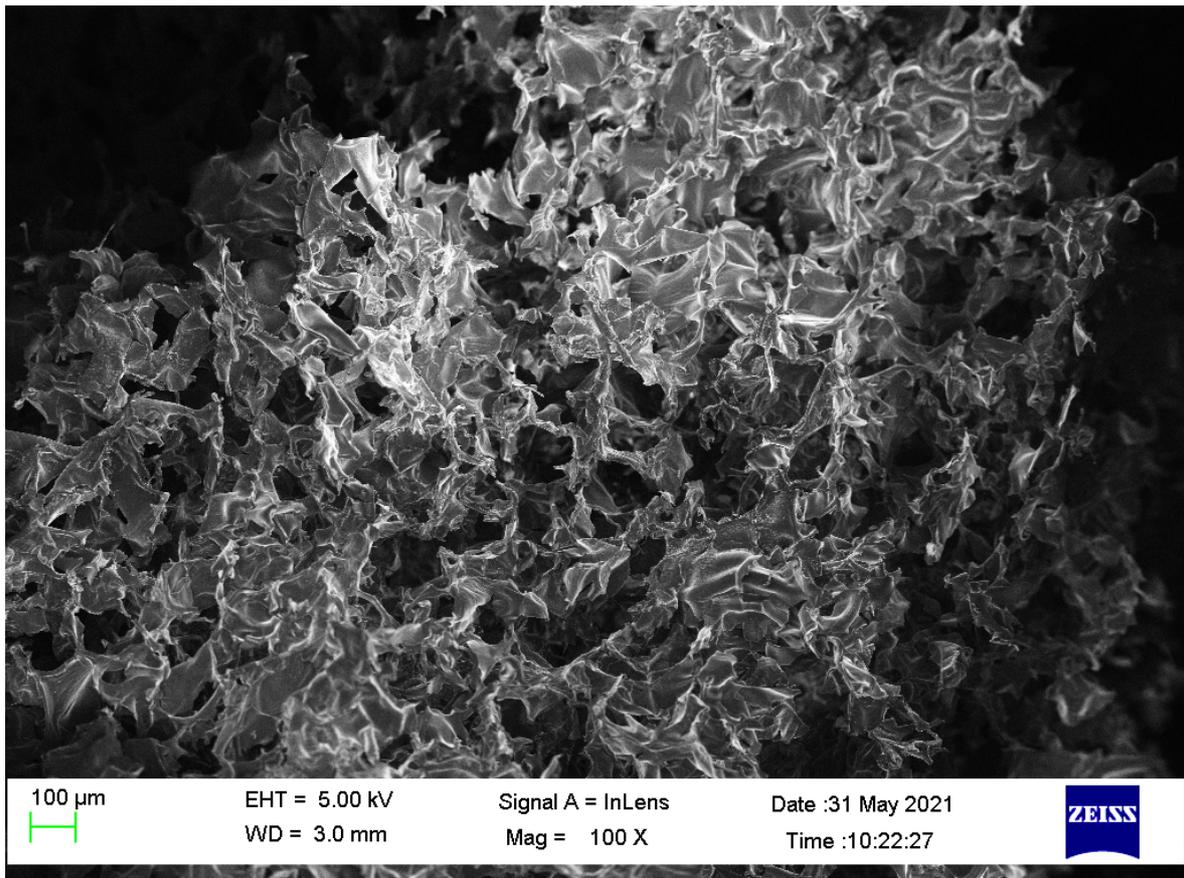


Figura 28. Imagen SEM de alta resolución por emisión de campo GEMINI (FESEM) de Carl Zeiss del aerogel obtenido por liofilización del hidrogel IN-47 (2.5 % betalactoglobulina, estrategia control).

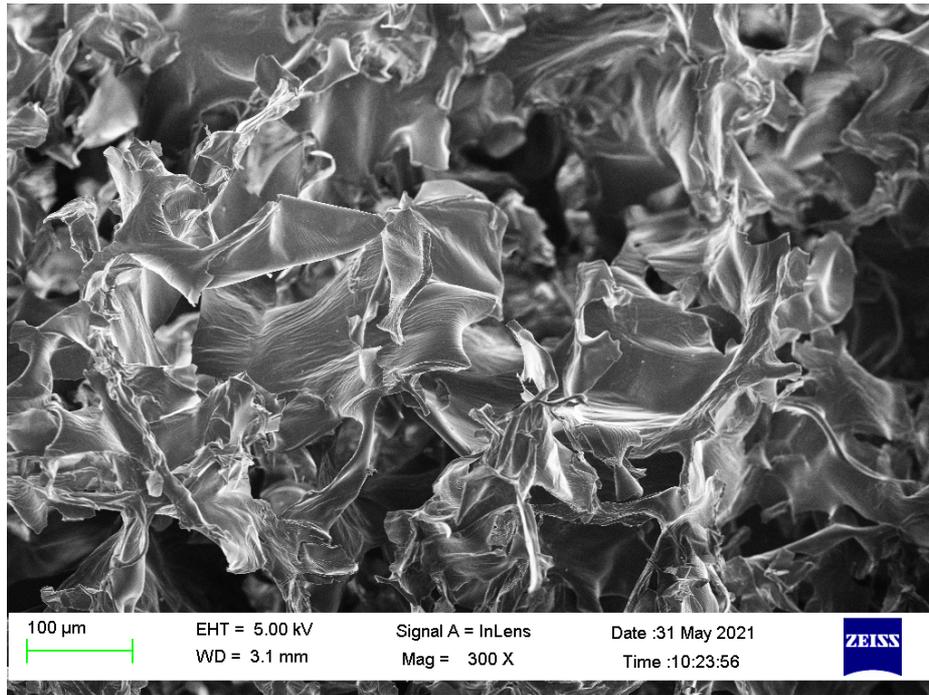


Figura 29. Imagen SEM de alta resolución por emisión de campo GEMINI (FESEM) de Carl Zeiss del aerogel obtenido por liofilización del hidrogel IN-47 (2.5 % betalactoblogulina, estrategia control).

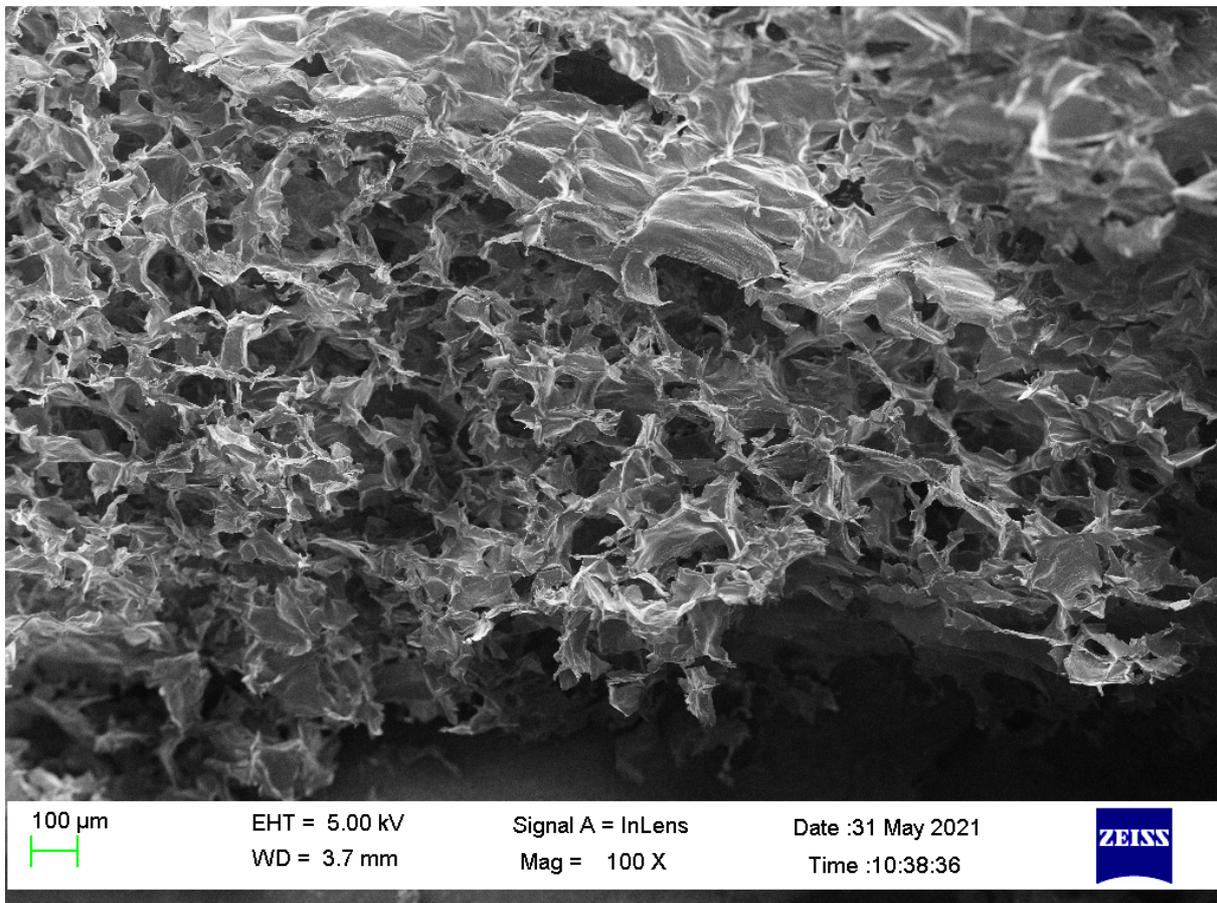


Figura 30. Imagen SEM de alta resolución por emisión de campo GEMINI (FESEM) de Carl Zeiss del aerogel obtenido por liofilización del hidrogel IN-48 (2.5 % betalactoblogulina, estrategia control).

5.1.6.a. Aerogeles obtenidos por secado con CO₂ supercrítico.

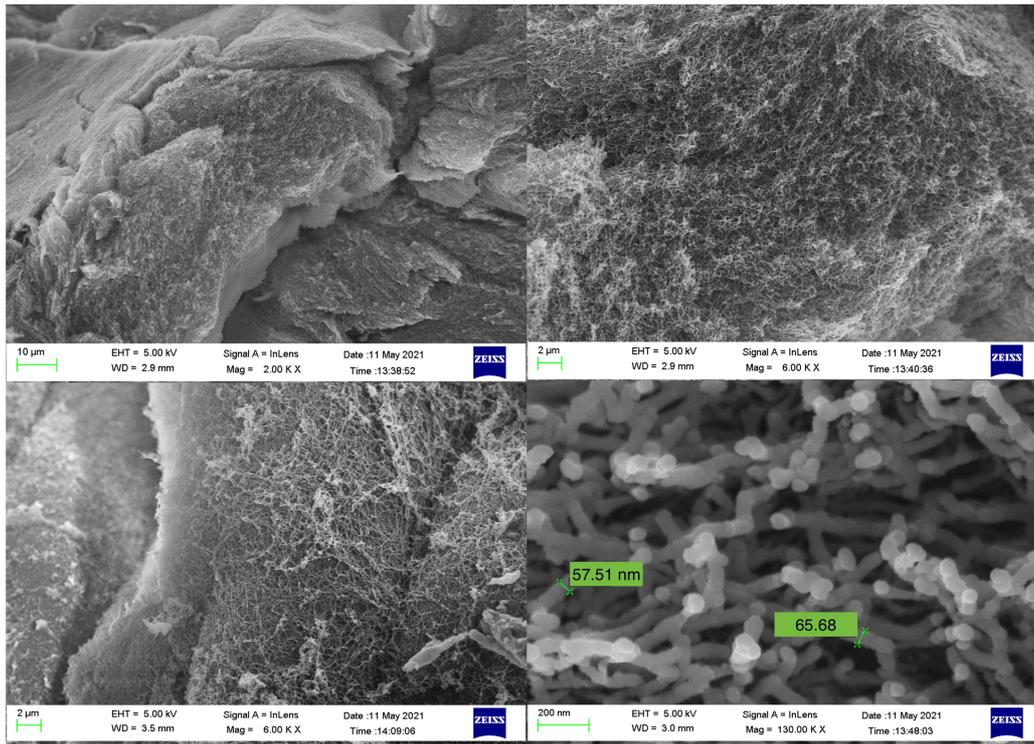


Figura 31. Imágenes SEM de alta resolución por emisión de campo GEMINI (FESEM) de Carl Zeiss a distintos aumentos del aerogel obtenido a partir del hidrogel IN-42 (2.5 % betalactoglobulina, estrategia control). En la imagen inferior derecha se muestra la medida del grosor de las fibras observadas. Este grosor es de unos 60 nm.

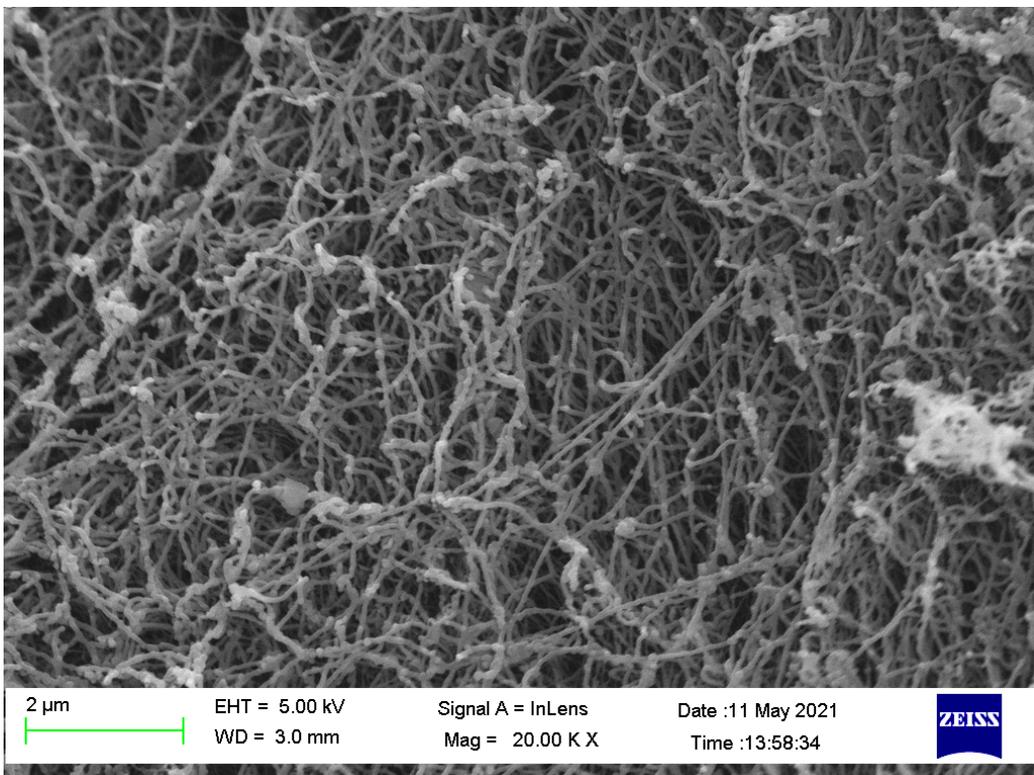


Figura 32. Imagen SEM de alta resolución por emisión de campo GEMINI (FESEM) de Carl Zeiss del aerogel obtenido a partir del hidrogel IN-42 (2.5 % betalactoglobulina, estrategia control).

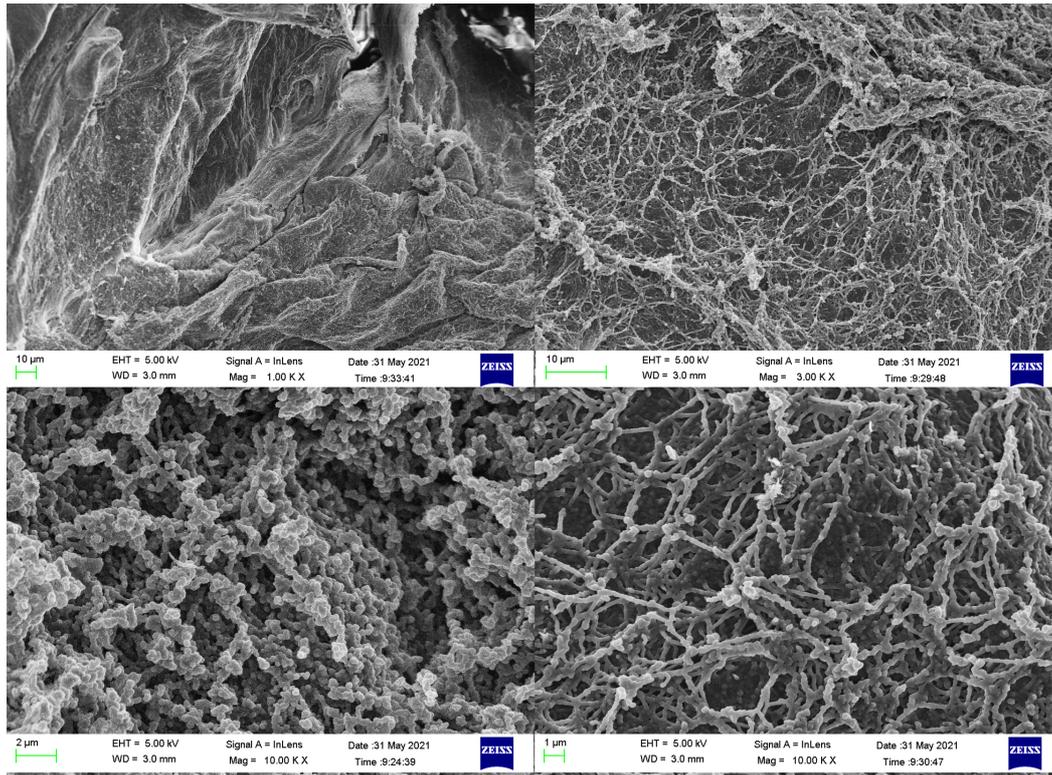


Figura 33. Imágenes SEM de alta resolución por emisión de campo GEMINI (FESEM) de Carl Zeiss a distintos aumentos del aerogel obtenido a partir del hidrogel IN-47 (2.5 % betalactoglobulina, estrategia control)

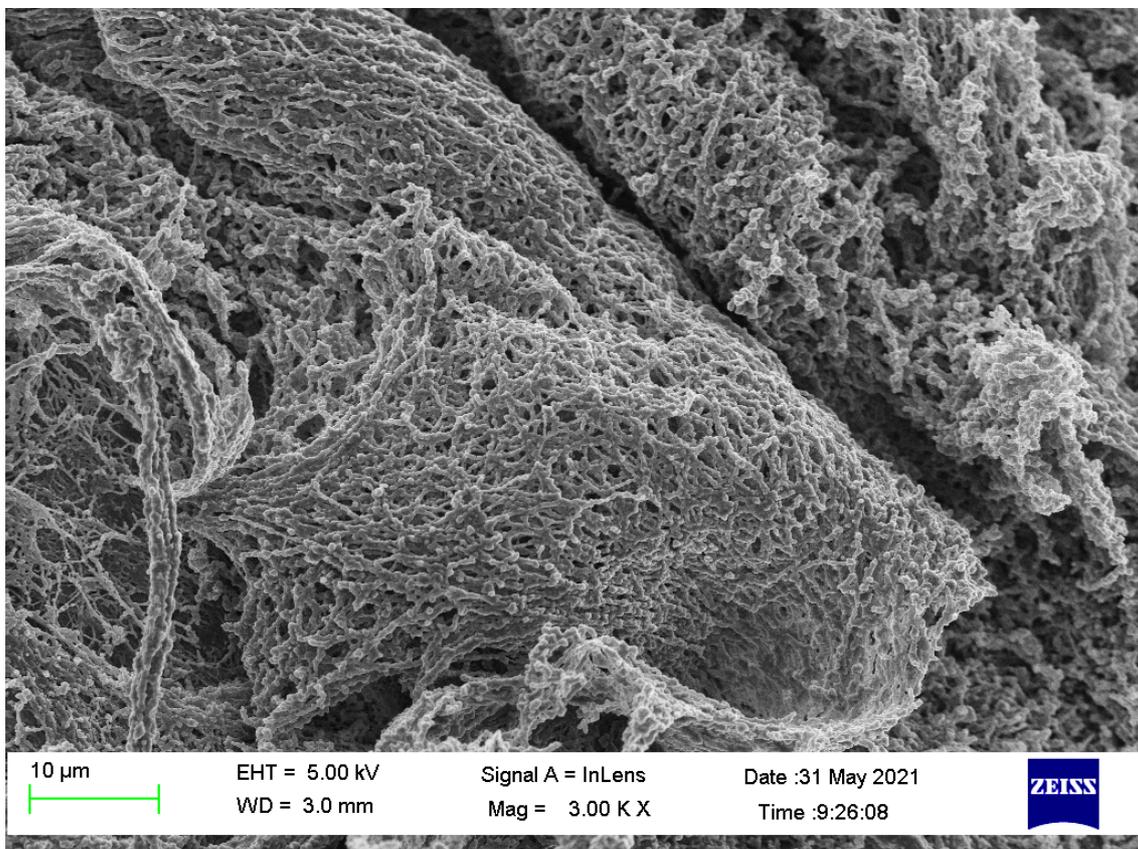


Figura 34. Imagen SEM de alta resolución por emisión de campo GEMINI (FESEM) de Carl Zeiss del aerogel obtenido a partir del hidrogel IN-47 (2.5 % betalactoglobulina, estrategia control).

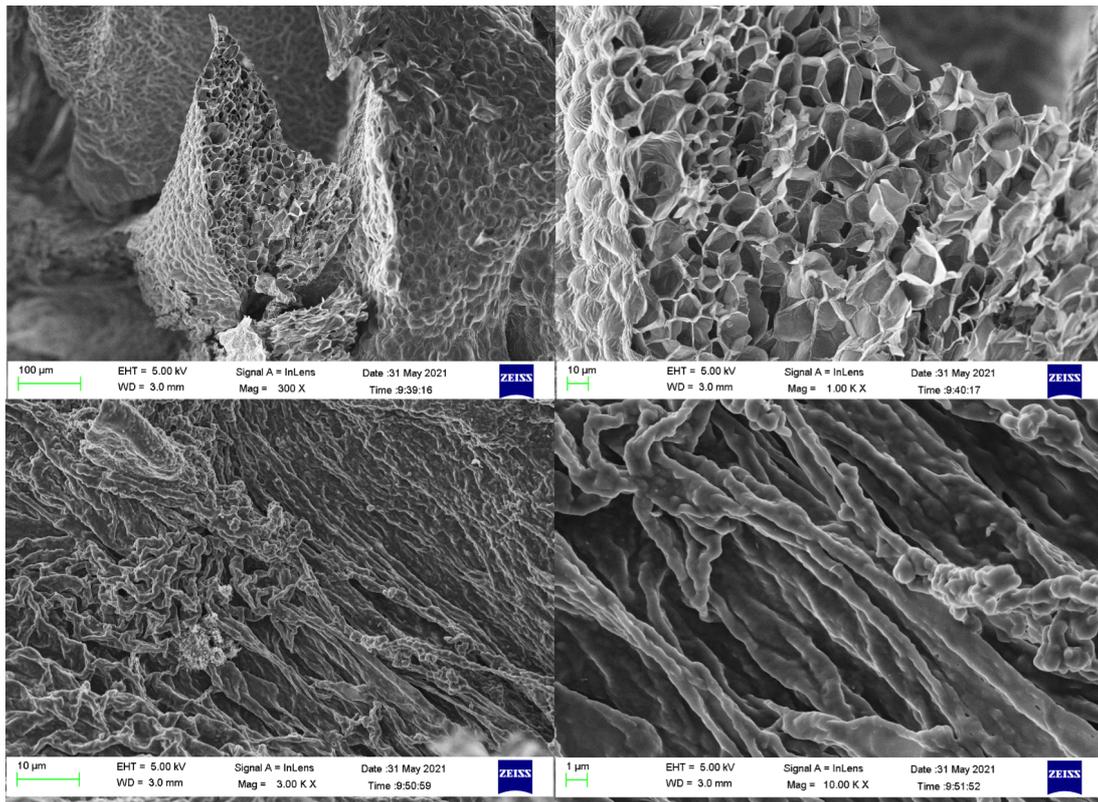


Figura 35. Imágenes SEM de alta resolución por emisión de campo GEMINI (FESEM) de Carl Zeiss a distintos aumentos del aerogel obtenido a partir del hidrogel IN-48 (2.5 % betalactoglobulina, estrategia control)

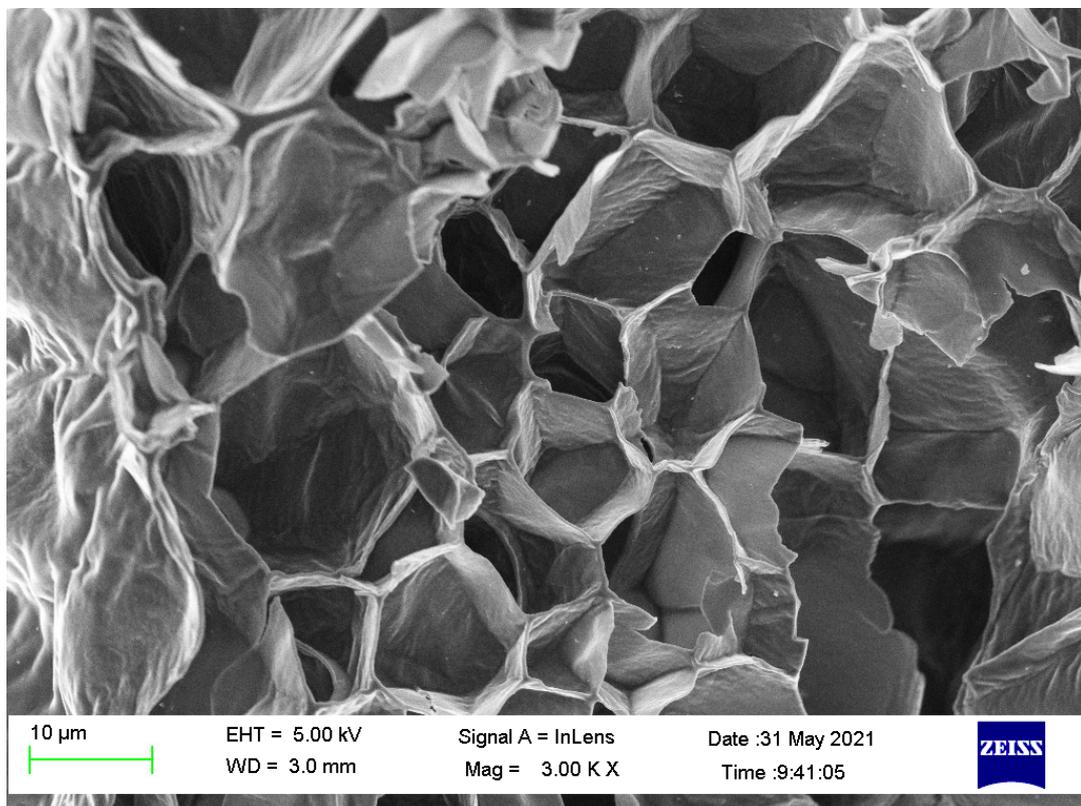


Figura 36. Imagen SEM de alta resolución por emisión de campo GEMINI (FESEM) de Carl Zeiss del aerogel obtenido a partir del hidrogel IN-48 (2.5 % betalactoglobulina, estrategia control).

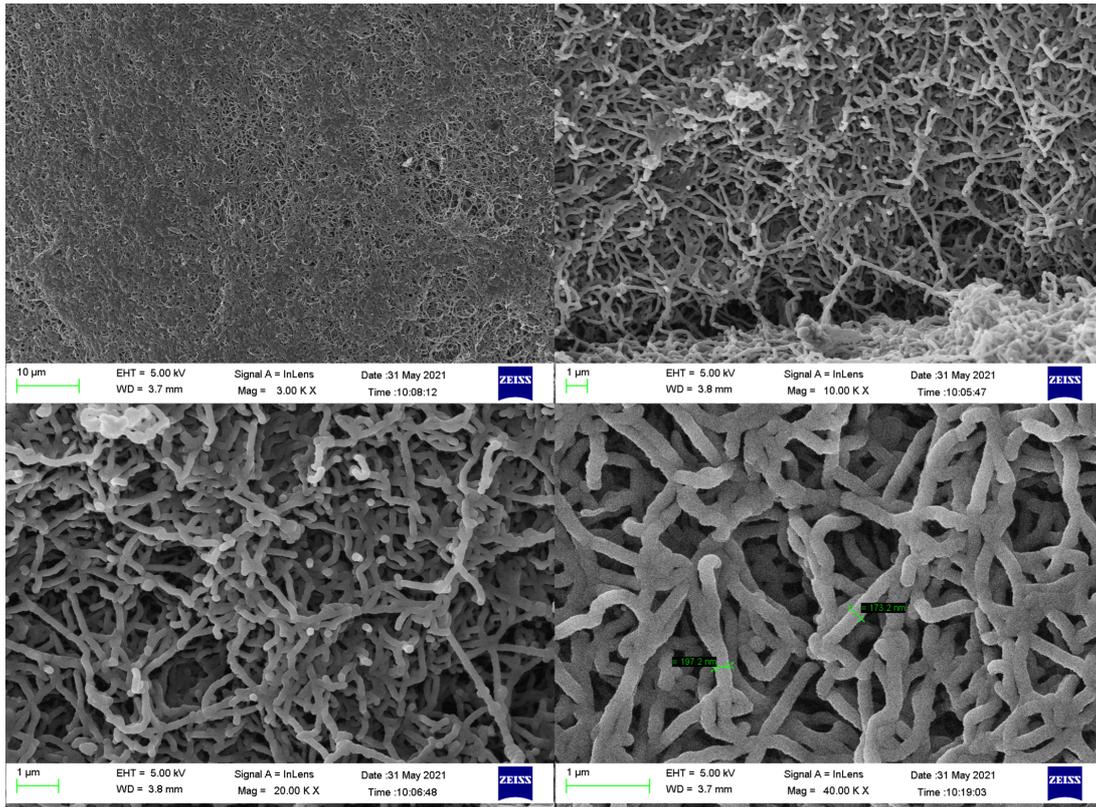


Figura 37. Imágenes SEM de alta resolución por emisión de campo GEMINI (FESEM) de Carl Zeiss a distintos aumentos del aerogel obtenido a partir del hidrogel IN-48 (2.5 % betalactoglobulina, estrategia control). Ensayo con fijación con OsO_4 . Se muestra la medida del grosor de las fibras (unos 185 nm).

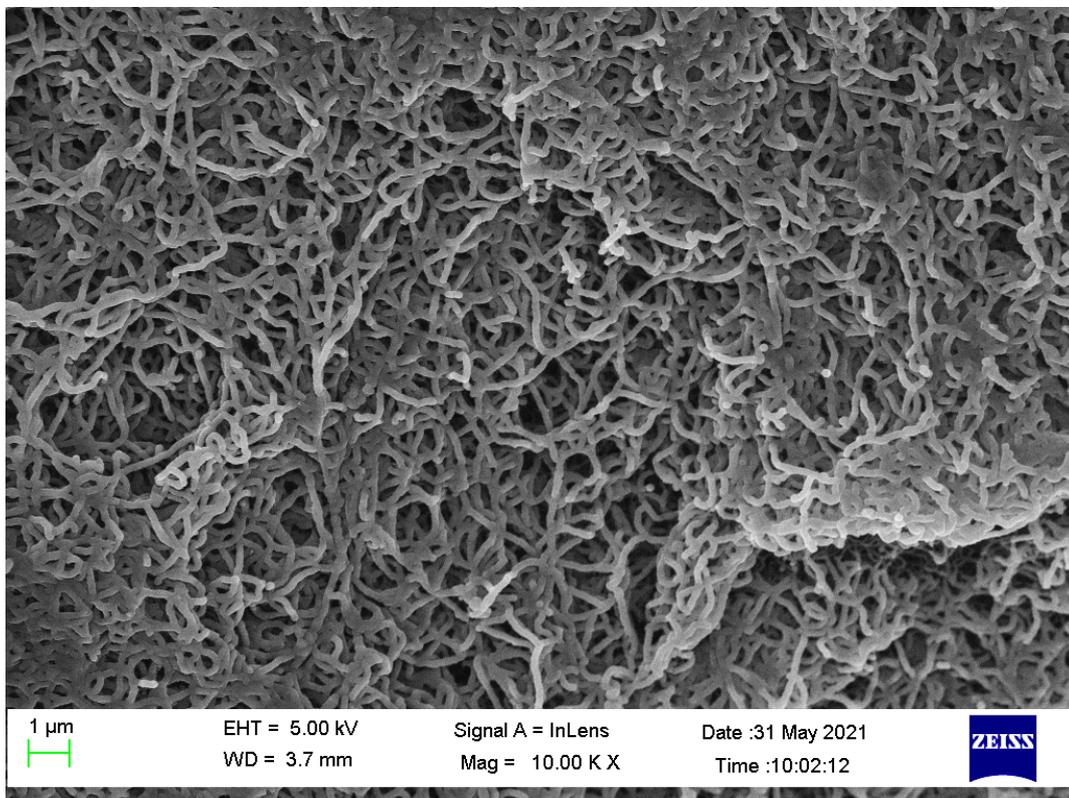


Figura 38. Imagen SEM de alta resolución por emisión de campo GEMINI (FESEM) de Carl Zeiss del aerogel obtenido a partir del hidrogel IN-48 (2.5 % betalactoglobulina, estrategia control). Ensayo con fijación con OsO_4

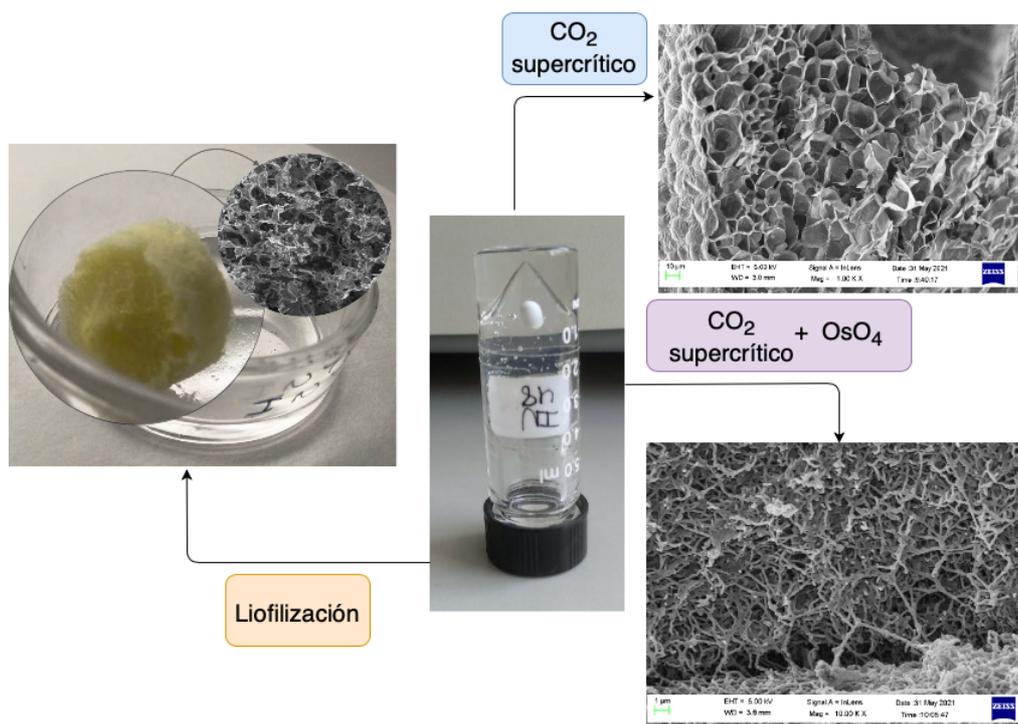


Figura 39. Resumen de las estrategias de secado seguidas para el hidrogel IN-48 y los resultados observados por SEM de alta resolución por emisión de campo GEMINI (FESEM) de Carl Zeiss.

5.2. Resultados con apoferritina

5.2.1 Síntesis de hidrogeles con BTCA

Siguiendo esta estrategia se llevó a cabo la síntesis de dos hidrogeles de apoferritina:

- Uno con un 1.33 % de concentración, que no dio buen resultado
- Uno con un 2 % de concentración, que no dio buen resultado

5.2.2. Síntesis de hidrogeles con NaCl

Para la síntesis de hidrogeles de apoferritina con NaCl se siguieron tres estrategias diferentes: adición de NaCl 150 mM tras el tratamiento térmico, adición de NaCl 200 mM tras tratamiento térmico y adición de NaCl 200 mM antes del tratamiento térmico.

- NaCl 150 mM después del calentamiento:
 - Se preparó un hidrogel al 1.33 %, que no dio buen resultado
 - Se preparó un hidrogel al 2 %, que dio un resultado relativamente aceptable
- NaCl 200 mM después del calentamiento
 - Se preparó un hidrogel al 0.67 %, que no dio buen resultado
 - Se preparó un hidrogel al 1.33 %, que no dio buen resultado
 - Se preparó un hidrogel al 1.5 %, que no dio buen resultado

- NaCl 200 mM antes del calentamiento
 - Se preparó un hidrogel al 0.67 %, que no dio buen resultado
 - Se preparó un hidrogel al 1.33 %, que dio buen resultado
 - Se preparó un hidrogel al 1.5 %, que no dio buen resultado

A modo de resumen se presenta la siguiente tabla con los resultados obtenidos en los hidrogeles de apoferritina a distintas concentraciones de proteína y con las diversas estrategias:

Tabla 2. Resumen de los resultados obtenidos en las distintas estrategias de síntesis de hidrogeles con apoferritina. En rojo, se señalan las muestras que dieron malos resultados. En verde, las que dieron buen resultado. En naranja, las que dieron resultados relativamente aceptables

	0.67%	1.33%	1.5%	2%
BTCA	-----	IN-33	-----	IN-37
NaCl 150 mM (después)	-----	IN-32	-----	IN-36
NaCl 200 mM (antes)	IN-20	IN-21	IN-22	-----
NaCl 200 mM (después)	IN-27	IN-28	IN-29	-----



Figura 40. Hidrogeles de fibras amiloides de apoferritina. Ambos hidrogeles tienen una concentración de proteína del 2%. Para el hidrogel de la izquierda se siguió la estrategia de adición de NaCl 150 mM tras tratamiento térmico, dando un resultado relativamente aceptable. En el hidrogel de la derecha la estrategia seguida fue la adición de BTCA, no dio buen resultado.

5.2.3. Visualización de fibras amiloides por TEM

Las imágenes mostradas en este apartado corresponden a muestras de hidrogeles diluidas en un factor 1/100 con agua MilliQ.

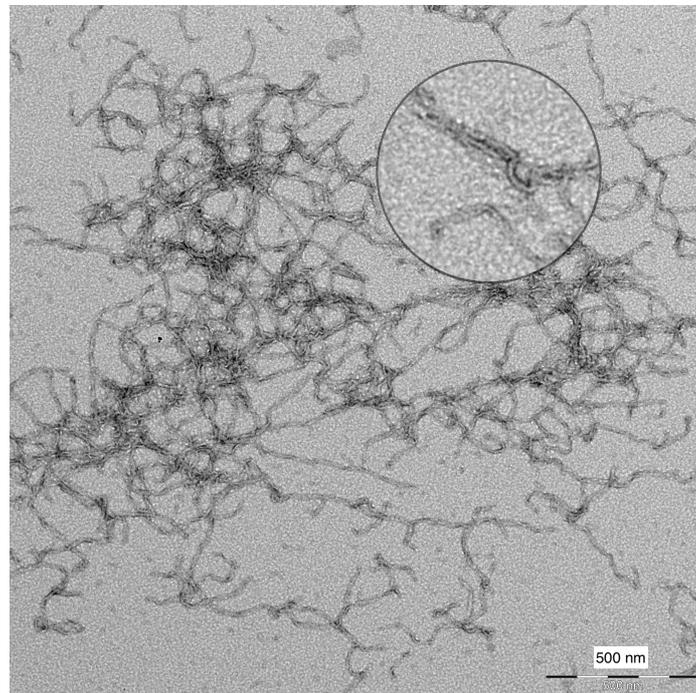


Figura 41. Imagen TEM LIBRA 120 PLUS de Carl Zeiss SMT de la muestra IN-36 (2 % NaCl 150 mM tras tratamiento térmico). Se observa la presencia de fibras amiloides de apoferritina.

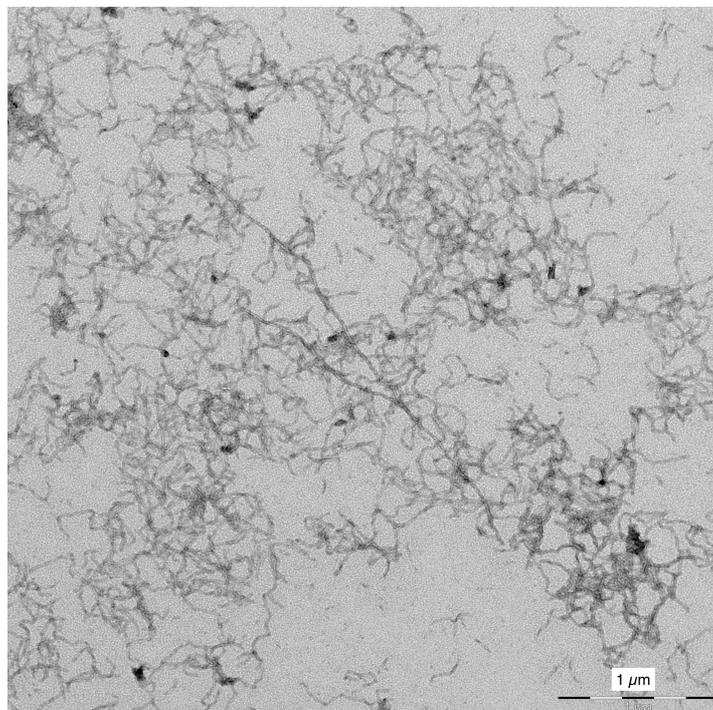


Figura 42. Imagen TEM LIBRA 120 PLUS de Carl Zeiss SMT de la muestra IN-37 (2 % BTCA). Se observa la presencia de fibras amiloides de apoferritina.

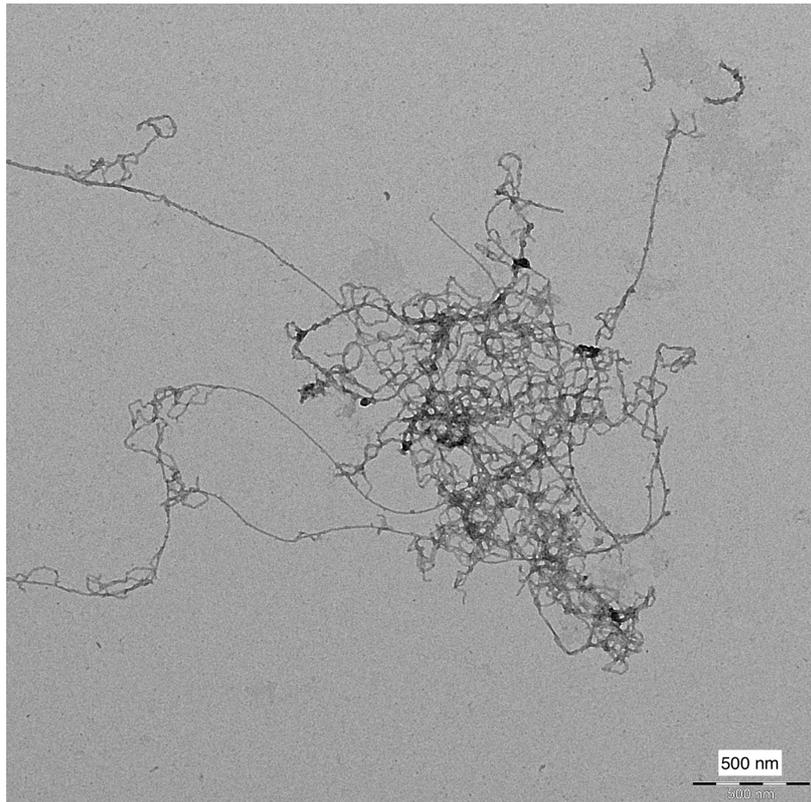


Figura 43. Imagen TEM LIBRA 120 PLUS de Carl Zeiss SMT de la muestra IN-21 (1.33 % NaCl 200 mM antes del tratamiento térmico). Se observa la presencia de fibras amiloides de apoferritina.

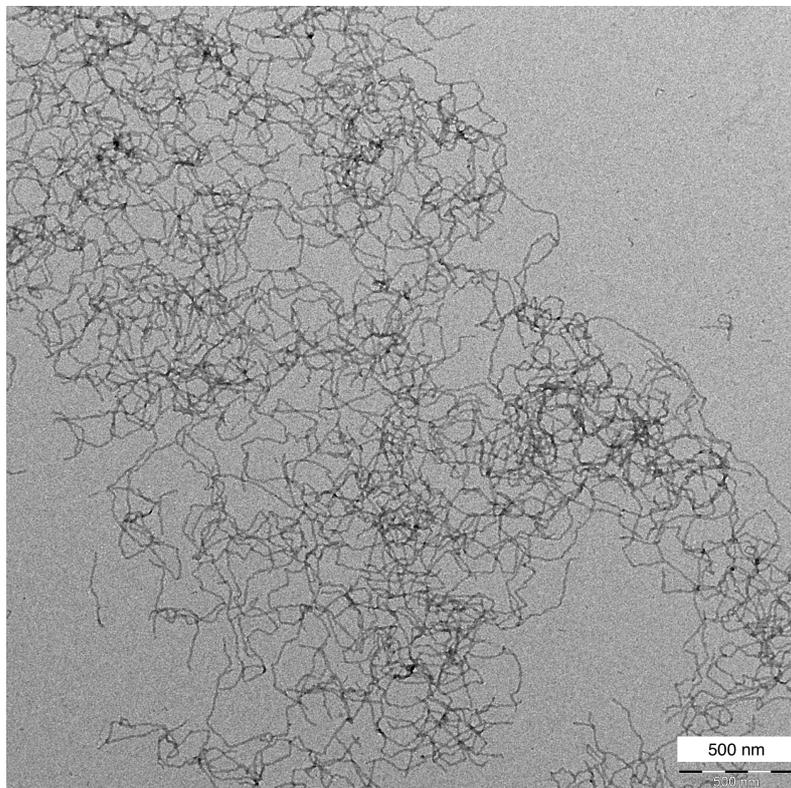


Figura 44. Imagen TEM LIBRA 120 PLUS de Carl Zeiss SMT de la muestra IN-29 (1.5 % NaCl 200 mM tras tratamiento térmico). Se observa la presencia de fibras amiloides de apoferritina.

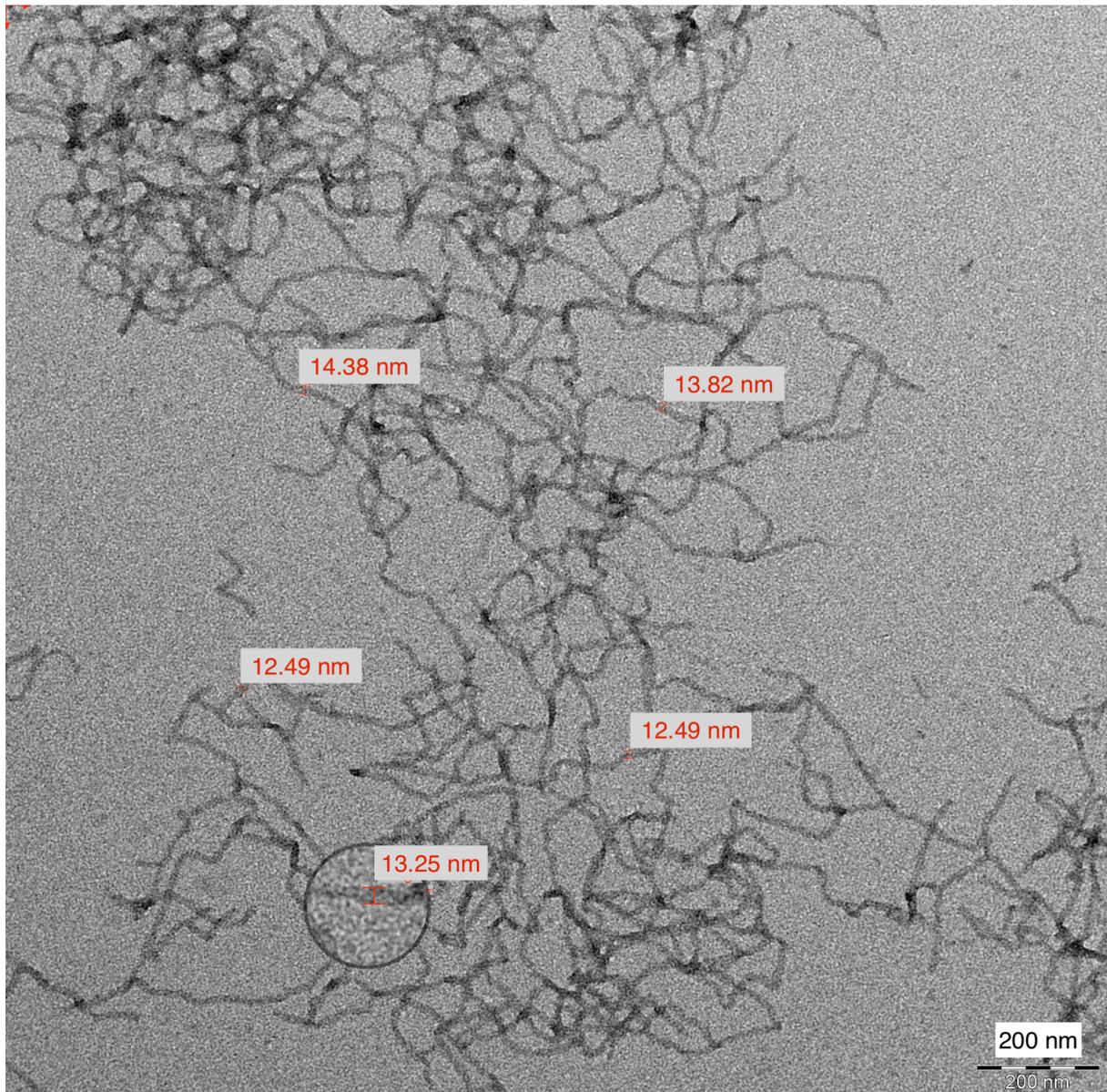


Figura 45. Imagen TEM LIBRA 120 PLUS de Carl Zeiss SMT de la muestra IN-29 (1.5 % NaCl 200 mM tras tratamiento térmico) diluida en un factor 1/100. Se observa la presencia de fibras amiloides de apoferritina. Se presentan sobre la imagen las medidas del grosor de las fibras: aproximadamente 13 nm.

5.2.4. Síntesis de aerogeles de fibras amiloides de apoferritina

En la imagen inferior se muestran los aerogeles obtenidos a partir de los hidrogeles siguientes: Por su metodología (uso de placa microtituladora y adición de 2 ml de hidrogel en cada pocillo) fue la síntesis de aerogeles de apoferritina más exitosa.

- IN-32: concentración del 1.33 %. NaCl 150 mM tras tratamiento térmico
- IN-33: concentración del 1.33 %. BTCA.
- IN-36: concentración del 2%. NaCl 150 mM tras tratamiento térmico
- IN-37: concentración del 2%. BTCA.

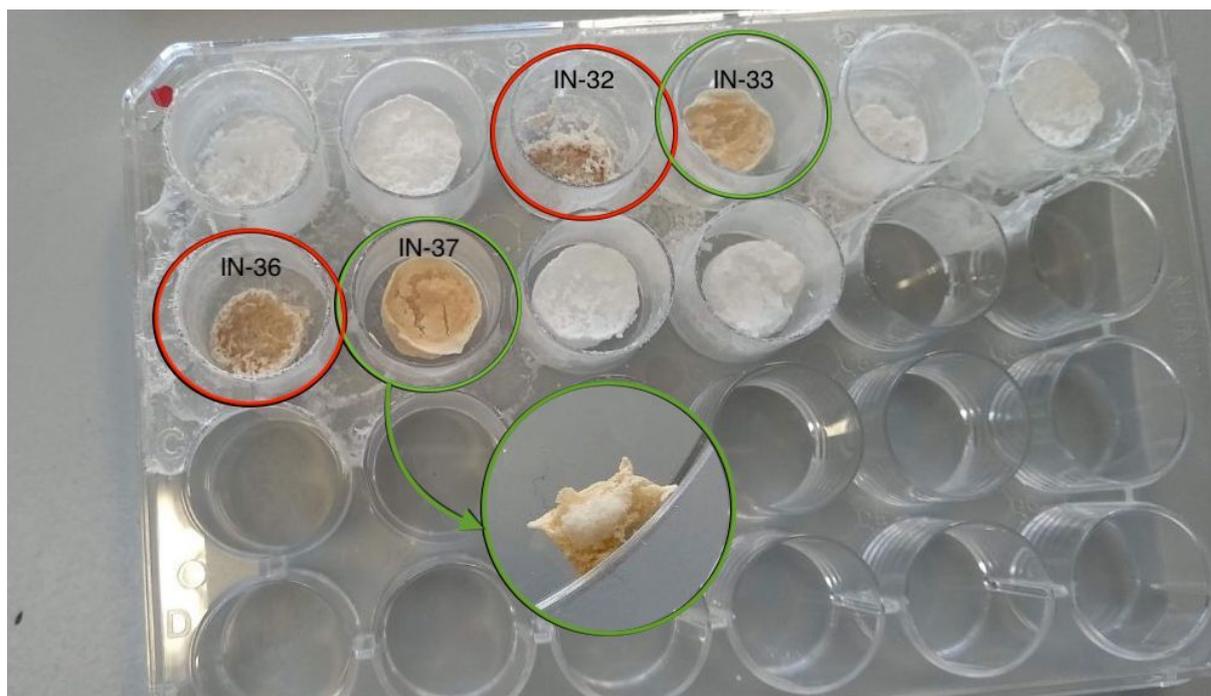


Figura 46. Aparecen rodeados en verde los aerogeles con un aspecto satisfactorio y, en rojo, aquellos que no dieron un buen resultado. Los otros aerogeles que aparecen en la imagen son de betalactoglobulina

Para las muestras IN-20, IN-21 e IN-22 (hidrogeles de apoferritina obtenidos por adición de NaCl 200 mM antes del tratamiento térmico, concentraciones del 0.67 %, 1.33 % y 1.5 %) se ensayó la obtención de hidrogeles por liofilización en el vial de vidrio de síntesis del hidrogel. El resultado fue desfavorable: no se obtuvo nada parecido a un aerogel sino lo que se muestra en la imagen inferior. Tras ello se concluyó que la placa microtituladora era un soporte mucho más adecuado para la síntesis de aerogeles:



Figura 47. Intento de síntesis de aerogel a partir de la muestra IN-22 (hidrogel de apoferritina al 1.5 % con adición de NaCl 200 mM previa al tratamiento térmico)

A continuación, se expone el resultado de los aerogeles obtenidos por liofilización a partir de los hidrogeles de apoferritina formados por la adición de NaCl 200 mM tras tratamiento térmico (concentraciones del 0.67 %, 1.33 % y 1.5 %). El resultado no fue satisfactorio debido probablemente a que el volumen de hidrogel de partida fue insuficiente (0.5 mL). Tras este resultado se trabajó con volúmenes superiores (2 mL), obteniendo los resultados más satisfactorios mostrados en la Figura 46.

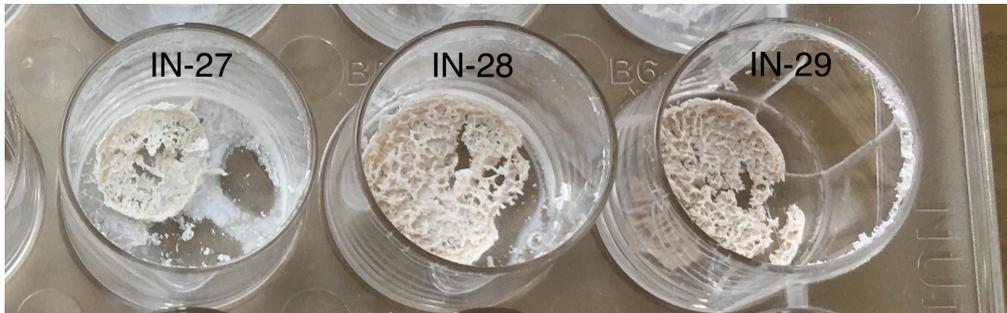


Figura 48. Intento de síntesis de aerogeles con un volumen de 0.5 mL en cada pocillo.

5.2.5. Visualización de aerogeles por SEM

Se muestra una imagen de microscopio electrónico de barrido del aerogel obtenido por liofilización a partir de un hidrogel de apoferritina al 1.33 % con BTCA

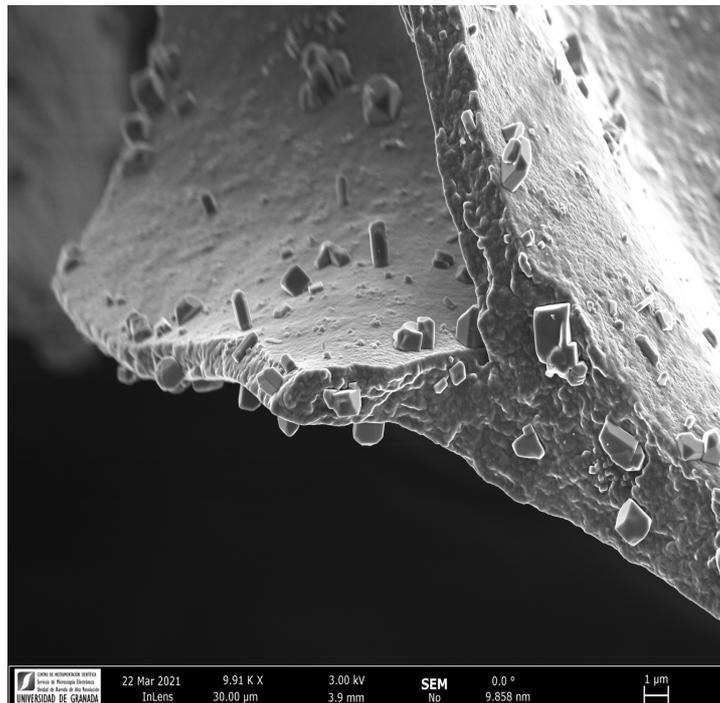


Figura 49. Imagen SEM AURIGA (FIB.FESEM) de Carl Zeiss SMT del aerogel IN-33 (concentración del 1.33 % BTCA, secado por liofilización).

En la visualización por SEM no pudo apreciarse la estructura porosa del aerogel. Podría encontrarse una posible causa en el colapso del aerogel durante el proceso de preparación de muestra para SEM. Los aerogeles obtenidos resultaban en ocasiones bastante frágiles y no siempre fue posible la fijación al soporte de SEM manteniendo la integridad del aerogel.

5.3. Discusión de resultados

5.3.1. Síntesis de hidrogeles

En este trabajo se han expuesto los resultados obtenidos en las diversas síntesis de hidrogeles de fibras amiloides de betalactoglobulina (apartado 5.1.1.) y apoferritina (apartado 5.2.1.) siguiendo diferentes estrategias: cambios en la concentración y adición o no de sales y agentes de entrecruzamiento. Se ha observado que la estrategia de síntesis seguida resulta considerablemente más exitosa para la betalactoglobulina que para la apoferritina, razón por la cual se optó por insistir con la primera proteína.

Por otro lado, se ha podido apreciar que un aumento en la concentración de proteína generalmente favorece la obtención de hidrogeles. Ninguna síntesis resultó favorable para hidrogeles con una concentración de un 1% o inferior. Finalmente, se estimó que una concentración del 2.5 % de betalactoglobulina resultaba adecuada.

No se apreció una ventaja significativa en la síntesis de hidrogeles añadiendo sales (NaCl a distintas concentraciones tanto antes como después del tratamiento térmico) y agentes de entrecruzamiento (BTCA). De hecho, la adición de estas sustancias una vez formado el gel tras el tratamiento térmico podría resultar inútil por quedar éstas en la superficie del gel relativamente solidificado, sin llegar a penetrarlo; o incluso perjudicial por requerir agitación, que puede contribuir a una ligera ruptura del gel.

Puede apreciarse una cierta aleatoriedad en algunos de los resultados obtenidos, (véase Tablas 1 y 2) en las que aparecen muestras replicadas que en unos casos llegan a gelificar y en otros casos no. Una posible explicación a este fenómeno podría encontrarse en el funcionamiento inestable de la placa calentadora utilizada en el tratamiento térmico. En algunas ocasiones, la introducción de la muestra en el baño de aceite a 90 °C provocaba una desestabilización de la temperatura, que llegaba a alcanzar los 120-130 °C. De acuerdo a [41], el calentamiento de un sol proteico a una temperatura muy superior a la requerida para la desnaturalización de la proteína conlleva la formación de un metasol, que no gelifica tras enfriar. Este proceso podría estar relacionado con la β -eliminación de enlaces disulfuro y la ruptura de enlaces peptídicos. Este hecho también explicaría los malos resultados obtenidos para aquellas muestras que se introdujeron en un horno a 150 °C con intención de favorecer el entrecruzamiento del BTCA.

5.3.2. Visualización de fibras amiloides por TEM

Se utilizó microscopía electrónica de transmisión con el objetivo de caracterizar y corroborar la presencia de fibras amiloides en los hidrogeles. En algunos casos, se pudo observar la presencia de fibras en hidrogeles cuya síntesis no resultó exitosa (véase Figura 15, Figura 42, Figura 44). Por tanto, la no-formación de fibras no podrá ser el motivo de los malos resultados obtenidos en determinadas síntesis. Se han buscado, por tanto, explicaciones alternativas como las expuestas en el apartado anterior (formación de un metasol por exceso de temperatura).

Ambos tipos de fibras amiloides obtenidas (betalactoglobulina y apoferritina) presentan un grosor similar (unos 13 nm), que además concuerda con el valor hallado en estudios previos (10 ± 2 nm) [42],

considerando un cierto margen de error en la toma de medidas por un método relativamente impreciso. Respecto a la morfología de las fibras se observan ciertas diferencias. En las fibras de betalactoglobulina se aprecia una forma de *cable*, muy similar a la presentada por *Jurado et al.* Las fibras de betalactoglobulina obtenidas en este trabajo a pH 2 y 90 °C con una incubación de 5 horas (Figura 50a) son comparables a las sintetizadas en [42] a pH 2, 80 °C y 12 horas de incubación (Figura 50c). Las fibras de apoferritina sintetizadas para este TFG (pH 2, 90° C, 5 h) (Figura 50b) no muestran esta morfología tipo cable, encontrándose cambios de dirección más frecuentes y angulosos. En las fibras de apoferritina presentadas por *Jurado et al.* (pH 2, 80°, 12 h) en la Figura 50d se observa una morfología más recta, con cambios de dirección más suaves y menos frecuentes. La principal explicación a estas diferencias morfológicas entre las fibras de apoferritina encontradas en la bibliografía y las sintetizadas en este trabajo podría hallarse en el tiempo de incubación: 12 h para el primer caso y 5 h en el segundo. Sí pueden encontrarse similitudes entre las fibras de apoferritina sintetizadas y las obtenidas por *Jurado et al.* a 50 °C durante 24 h. Podría esperarse que unas síntesis a 80 °C y unos tiempos de incubación mayores (12 h-24 h) hubieran dado lugar a las morfologías expuestas en Figura 50d y Figura 51a. En futuros trabajos resultaría valioso estudiar la capacidad de gelificación de fibras con estas morfologías, pudiéndose quizás encontrar unas condiciones adecuadas para la formación de hidrogeles de apoferritina, objetivo que no ha sido alcanzado en este trabajo.

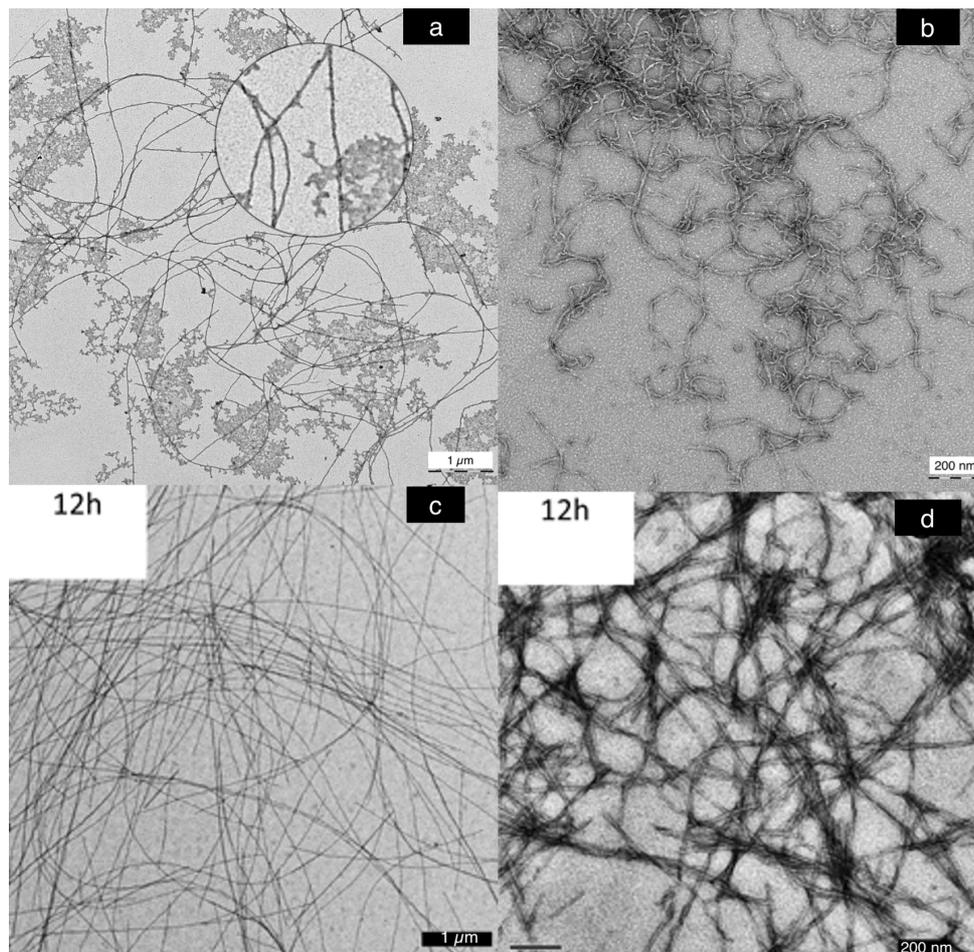
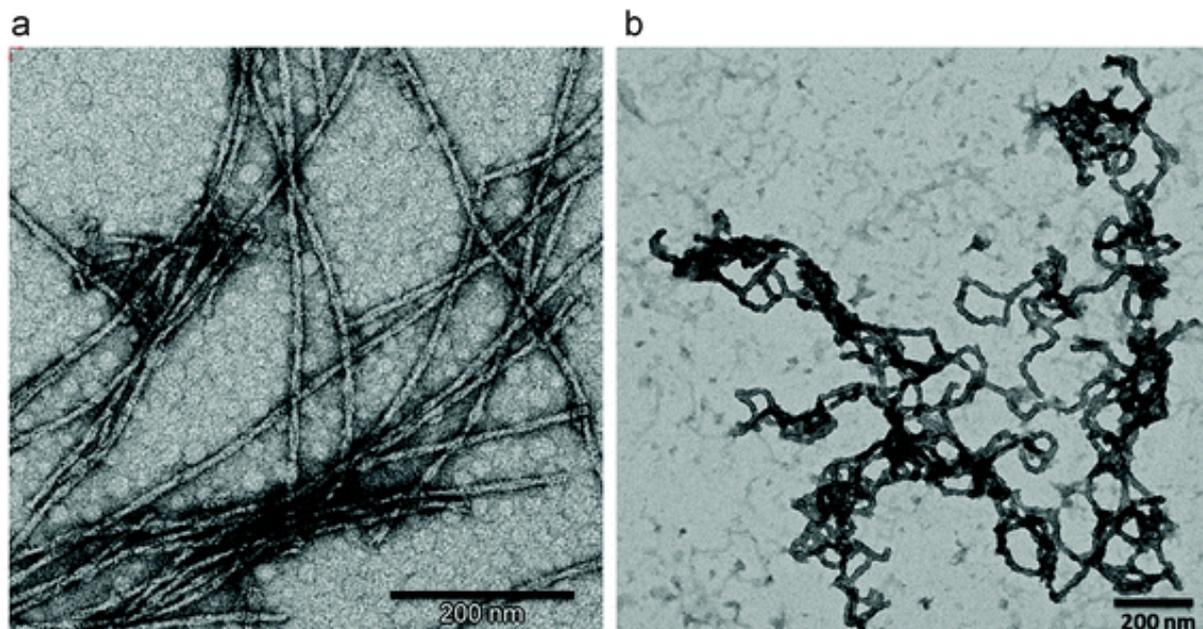


Figura 50. (a y b): Imágenes obtenidas para este trabajo. (c y d): Imágenes adaptadas de [42]. (A) Fibras de betalactoglobulina (90 °C, 5 h). (B) Fibras de apoferritina (90 °C, 5 h). (C) Fibras de betalactoglobulina (80 °C, 12 h). (D) Fibras de apoferritina (80 °C, 12 h). pH=2 en A, B, C, D.



*Figura 51. Fibras amiloides de apoferritina obtenidas a 80 °C (a) y 50 °C (b) a pH 2 con un periodo de incubación de 24 h. Nota: Adaptado de “Apoferritin fibers: A new template for 1D fluorescent hybrid nanostructures.” Por Jurado et al., 2016, *Nanoscale*, 8(18), (pp. 9648–9656). <https://doi.org/10.1039/c6nr01044j>. [42].*

5.3.3. Síntesis de aerogeles.

En la bibliografía se han encontrado un total de cuatro publicaciones en las que se lleva a cabo la síntesis de aerogeles a partir de fibras amiloides de betalactoglobulina. En dos casos el paso de hidrogel a aerogel se lleva a cabo por liofilización [43, 44] y en otros dos casos por secado con CO₂ supercrítico [32, 45]. En la Figura 52 se presenta el aspecto macroscópico de dichos aerogeles:



Figura 52. (A) Aerogel obtenido por liofilización congelando previamente a -196 °C [43]. (B) Aerogel obtenidos por secado con CO₂ supercrítico [32].

Puede observarse que el aspecto de los aerogeles varía en función del método de secado. El secado por liofilización produce aerogeles opacos mientras que el secado por CO₂ supercrítico produce aerogeles más translúcidos, con un aspecto más cercano al del hidrogel original. Este fenómeno ocurre debido a que en la liofilización la estructura del gel cambia dramáticamente mientras que en el secado por CO₂ supercrítico ésta se preserva en un mayor grado [46]. Los aerogeles de fibras amiloides de betalactoglobulina expuestos en este trabajo en el apartado 5.1.5 fueron obtenidos por liofilización y presentan un aspecto más próximo al aerogel de la Figura 52A que al de la Figura 52B, tal y como

podría esperarse. Podrían apreciarse pequeñas diferencias debidas a la temperatura y velocidad de congelación previa al secado. Para el aerogel expuesto en la Figura 52A ésta fue de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, llevando a cabo una congelación rápida con nitrógeno líquido. Por el contrario, en este trabajo la congelación se realizó lentamente a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un congelador. Desafortunadamente, no se dispone de fotografías de los aerogel obtenidos por secado con CO_2 supercrítico durante la realización de este trabajo. Por ello, no será posible establecer una comparación entre los aerogel sintetizados y los presentados en la bibliografía.

Respecto a los aerogel obtenidos a partir de fibras amiloides de apoferritina, cabe señalar que los hidrogeles IN-33 e IN-37 (1.33 % y 2 %, estrategia con BTCA) fueron los únicos que dieron lugar a aerogel con un aspecto aceptable. Resulta llamativo el hecho de que los hidrogeles de partida no presentasen buena consistencia. El BTCA, por tanto, podría ser un factor clave en la síntesis de aerogel de apoferritina, siendo ésta una línea interesante a seguir en investigaciones futuras. Deberá perfeccionarse, sin embargo, la síntesis de hidrogeles suficientemente consistentes si se desea utilizar CO_2 supercrítico como método de secado ya éste es un requisito a nivel técnico para la consecución de esta estrategia.

5.3.4. Visualización por SEM

El método de secado de un aerogel, así como la velocidad de congelación en el caso de aerogel obtenidos por liofilización, afecta a la morfología que éste presenta a nivel microscópico. La liofilización produce un cambio muy significativo en la estructura inicial del hidrogel mientras que el cambio estructural se minimiza en el secado por CO_2 supercrítico. Este hecho puede apreciarse en las imágenes SEM obtenidas de la bibliografía y mostradas en la Figura 53.

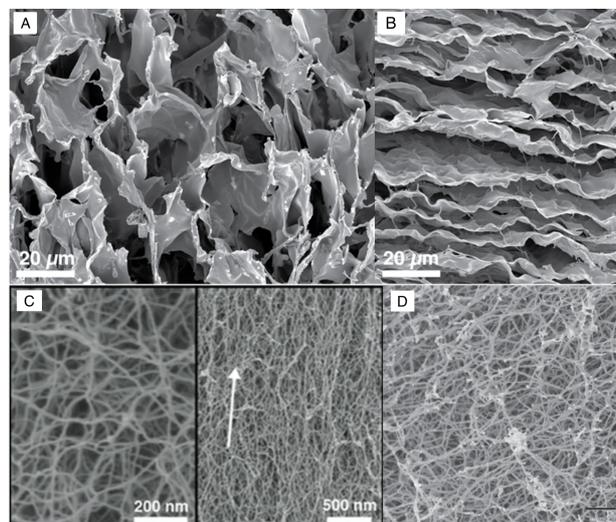


Figura 53. Morfología a nivel microscópico de aerogel obtenidos por (A) liofilización previa congelación lenta a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. (B) liofilización previa congelación rápida a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ [44] (C y D) secado con CO_2 supercrítico [32, 45].

Los resultados obtenidos en este trabajo para el secado por liofilización (previa congelación lenta a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) y por CO_2 supercrítico concuerdan con los presentados en la Figura 53, observándose morfologías muy similares tanto en un caso como en otro.

En el secado por liofilización puede apreciarse una pequeña diferencia entre la morfología observada en un aerogel en el que se siguió una estrategia de síntesis con NaCl y un aerogel en el que se siguió una estrategia control. En el primer caso se observa una superficie más lisa, sin pliegues, mientras que el detalle ampliado en la imagen derecha de la Figura 54 permite observar una superficie más plegada, con un aspecto similar al de un papel extendido tras ser comprimido. No se conocen los motivos responsables de estas diferencias, aunque resultaría de interés indagar sobre este hecho en trabajos futuros.

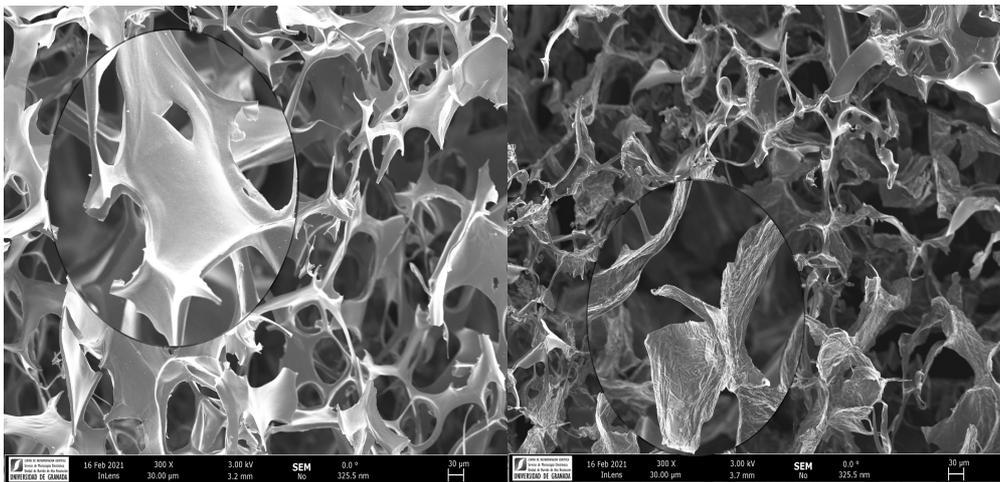


Figura 54. Izquierda: aerogel obtenido siguiendo una estrategia con NaCl. Derecha: aerogel obtenido siguiendo una estrategia control.

En el secado por CO₂ supercrítico de la muestra IN-48 se ensayaron dos estrategias: en la primera se realizó una fijación con OsO₄ previa al secado y en la segunda no. El OsO₄ ayuda a mantener la estructura original de las muestras de origen biológico en la preparación para SEM [47]. En la Figura 55 puede apreciarse la mayor integridad de las fibras de gel en el caso en el que se usó OsO₄ durante la preparación de la muestra.

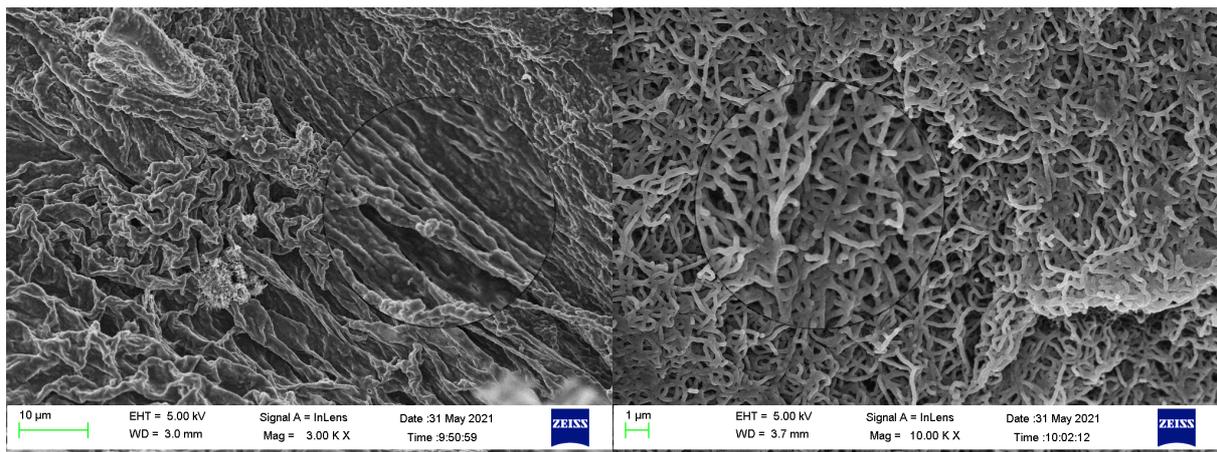


Figura 55. Izquierda: secado de la muestra IN-48 por CO₂ supercrítico sin OsO₄. Derecha: secado de la muestra IN-48 por CO₂ supercrítico previo tratamiento con OsO₄

Por otro lado, en la muestra IN-48 sin OsO₄ y a menos aumentos pudo observarse una estructura tipo panal de abeja con poros de entre 10 y 30 micras que no se observó en otras muestras con preparaciones idénticas. No se ha encontrado explicación a este hecho.

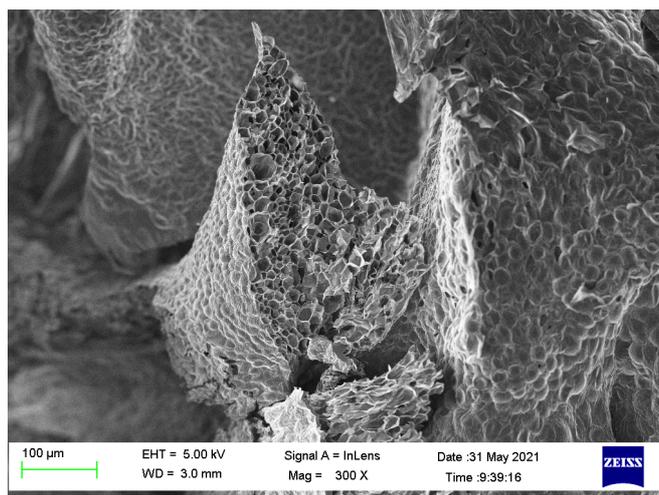


Figura 56. Estructura en forma de panal de abeja obtenida mediante el secado por CO₂ supercrítico de la muestra IN-48

Se aprecia cierta inconsistencia en el grosor de las fibras medido en distintas muestras preparadas en condiciones idénticas. Ver Figura 31d y Figura 37d. En el segundo caso el grosor es unas 3 veces superior. Se desconocen las razones de estas diferencias.

6. CONCLUSIONES

1. Es posible obtener hidrogeles de fibras amiloides de betalactoglobulina con una alta consistencia a partir de concentraciones de proteína del 1.33 %.
2. No es necesaria la adición de sales como NaCl o agentes de entrecruzamiento como BTCA para obtener hidrogeles de fibras amiloides de betalactoglobulina.
3. No se ha logrado una síntesis exitosa de hidrogeles de fibras amiloides de apoferritina para las concentraciones de trabajo en las condiciones de síntesis seguidas (pH 2, 90 °C, 5 horas de incubación).
4. Se ha confirmado que para unas condiciones de síntesis de pH 2, 90 °C y 5 horas de incubación las fibras amiloides de betalactoglobulina presentan una morfología diferente a las fibras amiloides de apoferritina. En ambos casos el grosor de las fibras es de unos 13 nm.
5. La síntesis de hidrogeles precursores añadiendo BTCA podría favorecer la formación de aerogeles de apoferritina por liofilización.
6. Se ha confirmado que el método de secado seguido para la obtención del aerogel afecta a su estructura microscópica, produciéndose una mayor alteración respecto a la estructura del hidrogel en el secado por liofilización que en el secado por CO₂ supercrítico.
7. Cuando los hidrogeles de fibras amiloides de betalactoglobulina se sintetizan añadiendo NaCl, los aerogeles correspondientes obtenidos por liofilización presentan estructuras con unas superficies más lisas frente a aquellos en los que se siguió una estrategia control.
8. El OsO₄ podría resultar de utilidad en la conservación de la estructura para la obtención de aerogeles de fibras amiloides de betalactoglobulina por secado con CO₂ supercrítico.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Fitzpatrick, S. E., Staiger, M. P., Deb-choudhury, S. & Ranford, S. (2018). *Chapter 6. Protein-based Aerogels: Processing and Morphology*. En Sabu, T., Phothan, L.A. & Mavelil-Sam, R. (Eds.), *Biobased Aerogels* (pp. 67–102). Reino Unido: The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781782629979-00067>
- [2] Kistler, S.S. (1931). Coherent Expanded Aerogels and Jellies. *Nature*, 127, (p.741). <https://doi.org/10.1038/127741a0>
- [3] Tewari, P.H., Hunt, A.J. (1986). En J. Fricke (ed.), *Aerogels: Proc. First Int. Symp., ISA 1*, Springer, Berlin, (p. 31).
- [4] Nita, L. E., Ghilan, A., Rusu, A. G., Neamtu, I., & Chiriac, A. P. (2020). New trends in bio-based aerogels. *Pharmaceutics*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12050449>
- [5] Maleki, H., Durães, L., García-González, C. A., del Gaudio, P., Portugal, A., & Mahmoudi, M. (2016). Synthesis and biomedical applications of aerogels: Possibilities and challenges. *Advances in Colloid and Interface Science*, 236, (p.1–27). <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.05.011>
- [6] Du, A., Zhou, B., Zhang, Z., & Shen, J. (2013). A special material or a new state of matter: A review and reconsideration of the aerogel. *Materials*, 6(3), (p. 941–968). <https://doi.org/10.3390/ma6030941>
- [7] Buchtová, N., & Budtova, T. (2016). Cellulose aero-, cryo- and xerogels: towards understanding of morphology control. *Cellulose*, 23(4), (p. 2585–2595). <https://doi.org/10.1007/s10570-016-0960-8>
- [8] Brinker, C.J. & Scherer, G.W. (1990). *Chapter 1. Introduction*. En *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of sol-gel processing* (pp. 1-17). Londres, Reino Unido: ACADEMIC PRESS LIMITED
- [9] Zhao, S., Malfait, W. J., Guerrero-Alburquerque, N., Koebel, M. M., & Nyström, G. (2018). Biopolymer Aerogels and Foams: Chemistry, Properties, and Applications. *Angewandte Chemie - International Edition*, 57(26), 7580–7608. <https://doi.org/10.1002/anie.201709014>
- [10] Kien-Woh, K., & Yusoff, R., (2018). *Chapter 7. Hybrid Green Aerogels: Processing and Morphology*. En Sabu, T., Phothan, L.A. & Mavelil-Sam, R. (Eds.), *Biobased Aerogels* (pp. 103–128). Reino Unido: The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781782629979-00103>
- [11] Mallepally, R. R., Marin, M. A., Surampudi, V., Subia, B., Rao, R. R., Kundu, S. C., & McHugh, M. A. (2015). Silk fibroin aerogels: Potential scaffolds for tissue engineering applications. *Biomedical Materials (Bristol)*, 10(3), 35002. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/10/3/035002>
- [12] AerogelTechnologies. (10 de junio de 2021). *Airloy®*. <http://www.aerogeltechnologies.com>
- [13] Cabot. (10 de junio de 2021). *Products and solutions*. <https://www.cabotcorp.com/solutions/products-plus/aerogel>
- [14] TiemFactoryInc. (10 de junio de 2021). *SUFA*. <https://www.tiem.jp/en/about-us>
- [15] Medical Technology. (10 de junio de 2021). *Aerogelex*. https://medical-technology.nridigital.com/medical_technology_nov19/aerogelex
- [16] BuyAerogel. (10 de junio de 2021). *Products by use*. <http://www.buyaerogel.com/products-by-use>
- [17] Viggiano, R. (10 de junio de 2021). *Aerogels: Overview and Outlook for Future Space and Terrestrial Applications at NASA*. NASA Glenn Research Center. <https://ntrs.nasa.gov/api/citations/20180005488/downloads/20180005488.pdf>

- [18] Koshy, R.R. & Pothan, L.A. (2018). *Chapter 9. Biodegradation of Polysaccharide and Protein Based Aerogels*. En Sabu, T., Phothan, L.A. & Mavelil-Sam, R.(Eds.), *Biobased Aerogels* (pp. 151–157). Reino Unido: The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781782629979-00151>
- [19] He, Z., Zhang, X., & Batchelor, W. (2016). Cellulose nanofibre aerogel filter with tuneable pore structure for oil/water separation and recovery. *RSC Advances*, 6(26), (pp. 21435–21438). <https://doi.org/10.1039/c5ra27413c>
- [20] García-González, C. A., Budtova, T., Durães, L., Erkey, C., Del Gaudio, P., Gurikov, P., Koebel, M., et al. (2019). An Opinion Paper on Aerogels for Biomedical and Environmental Applications. *Molecules*, 24(9), (p. 1815). MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24091815>
- [21] Pettignano, A., Bernardi, L., Fochi, M., Geraci, L., Robitzer, M., Tanchoux, N., & Quignard, F. (2015). Alginate acid aerogel: A heterogeneous Brønsted acid promoter for the direct Mannich reaction. *New Journal of Chemistry*, 39(6), (pp. 4222–4226). <https://doi.org/10.1039/c5nj00349k>
- [22] Vollhardt, K. P. C., & Schore, N. E. (2009). *Organic chemistry: structure and function* (6th ed.). W.H. Freeman.
- [23] Selvasekaran, P., & Chidambaram, R. (2021). Food-grade aerogels obtained from polysaccharides, proteins, and seed mucilages: Role as a carrier matrix of functional food ingredients. *Trends in Food Science and Technology*, 112(April), (pp. 455–470). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.021>
- [24] Mikkonen, K. S., Parikka, K., Ghafar, A., & Tenkanen, M. (2013). Prospects of polysaccharide aerogels as modern advanced food materials. *Trends in Food Science and Technology*, 34(2), (pp. 124–136). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.10.003>
- [25] Abhari, N., Madadlou, A., & Dini, A. (2017). Structure of starch aerogel as affected by crosslinking and feasibility assessment of the aerogel for an anti-fungal volatile release. *Food Chemistry*, 221, (pp. 147–152). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.072>
- [26] García-González, C. A., López-Iglesias, C., Cocheiro, A. & Álvarez-Lorenzo, C. (2018). *Chapter 16. Biomedical Applications of Polysaccharide and Protein Based Aerogels*. En Sabu, T., Phothan, L.A. & Mavelil-Sam, R. (Eds.), *Biobased Aerogels* (pp. 295–323). Reino Unido: The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781782629979-00067>
- [27] Zhao, J.; Lu, C.; He, X.; Zhang, X.; Zhang, W.; Zhang, X. (2015). Polyethylenimine-grafted cellulose nanofibril aerogels as versatile vehicles for drug delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 7, (pp. 2607–2615). <https://doi.org/10.1021/am507601m>
- [28] Knowles, T. P. J.; Mezzenga, R. Amyloid Fibrils as Building Blocks for Natural and Artificial Functional Materials. *Adv. Mater.* 2016, 28 (31), 6546–6561.
- [29] 2. MaHam, A.; Tang, Z.; Wu, H.; Wang, J.; Lin, Y. Protein-Based Nanomedicine Platforms for Drug Delivery. *Small* 2009, 5 (15), 1706–1721.
- [30] 3. Maji, S. K.; Perrin, M. H.; Sawaya, M. R.; Jessberger, S.; Vadodaria, K.; Rissman, R. A.; Singru, P. S.; Nilsson, K. P. R.; Simon, R.; Schubert, D.; Eisenberg, D.; Rivier, J.; Sawchenko, P.; Vale, W.; Riek, R. Functional Amyloids as Natural Storage of Peptide Hormones in Pituitary Secretory Granules. *Science* 2009, 325 (5938), 328–332).
- [31] Woodard, D., Bell, D., Tipton, D., Durrance, S., Cole, L., Li, B., & Xu, S. (2014). Gel formation in protein amyloid aggregation: A physical mechanism for cytotoxicity. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094789>
- [32] Nyström, G., Fernández-Ronco, M. P., Bolisetty, S., Mazzotti, M., & Mezzenga, R. (2016). Amyloid Templated Gold Aerogels. *Advanced Materials*, 28(3), (pp. 472–478). <https://doi.org/10.1002/adma.201503465>

- [33] Yang, L., Li, H., Yao, L., Yu, Y., & Ma, G. (2019). Amyloid-Based Injectable Hydrogel Derived from Hydrolyzed Hen Egg White Lysozyme. *ACS Omega*, 4(5), (pp. 8071–8080). <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03492>
- [34] Jacob, R. S., Ghosh, D., Singh, P. K., Basu, S. K., Jha, N. N., Das, S., Sukul, P. K., Patil, S., Sathaye, S., Kumar, A., Chowdhury, A., Malik, S., Sen, S., & Maji, S. K. (2015). Self healing hydrogels composed of amyloid nano fibrils for cell culture and stem cell differentiation. *Biomaterials*, (pp. 54, 97–105). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.03.002>
- [35] Xiang, L. W., & Melton, L. D. (2018). Interactions of β -lactoglobulin with small molecules. In *Encyclopedia of Food Chemistry*, 2, (pp. 560-565). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21488-1>
- [36] Jurado Palomares, J. (2017). Nanoestructuras híbridas bioinorgánicas. Aplicaciones en nanomedicina. [Tesis Doctoral, Universidad de Granada]. <https://digibug.ugr.es/handle/10481/54942>
- [37] Chang, X., Chen, D., & Jiap, X. (2008). Chitosan-based aerogels with high adsorption performance. *Journal of Physical Chemistry B*, 112(26), (pp. 7721–7725). <https://doi.org/10.1021/jp8011359>
- [38] Wu, Q., Andersson, R. L., Holgate, T., Johansson, E., Gedde, U. W., Olsson, R. T., & Hedenqvist, M. S. (2014). Highly porous flame-retardant and sustainable biofoams based on wheat gluten and in situ polymerized silica. *Journal of Materials Chemistry A*, 2(48), (pp. 20996–21009). <https://doi.org/10.1039/c4ta04787g>
- [39] Anderson, T.F. (1951) Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. *Trans NY Acad Sci*, 13, (pp.130-134). <https://doi.org/10.1111/j.2164-0947.1951.tb01007.x>
- [40] Harris, D. C. (2016). Análisis químico cuantitativo (3a. ed.). Barcelona, Spain: Editorial Reverté. Recuperado de <https://elibro.net/es/lc/ugr/titulos/46773>.
- [41] Totosaus, A., Montejano, J. G., Salazar, J. A., Guerrero, I. (2002). A review of physical and chemical protein-gel induction. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, (pp. 589-601) <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00623>
- [42] Jurado, R., Castello, F., Bondia, P., Casado, S., Flors, C., Cuesta, R., Domínguez-Vera, J. M., Orte, A., & Gálvez, N. (2016). Apoferritin fibers: A new template for 1D fluorescent hybrid nanostructures. *Nanoscale*, 8(18), (pp. 9648–9656). <https://doi.org/10.1039/c6nr01044j>
- [43] Peydayesh, M., Suter MK., Bolisetty, S., Boulos, S., Handschin, S., Nyström, L., Mezzenga, R. (2020). Amyloid Fibrils Aerogel for Sustainable Removal of Organic Contaminants from Water. *Advanced Materials*, 32(12), 1907932. <https://doi.org/10.1002/adma.201907932>
- [44] Nyström, G., Fong, W. K., & Mezzenga, R. (2017). Ice-Templated and Cross-Linked Amyloid Fibril Aerogel Scaffolds for Cell Growth. *Biomacromolecules*, 18(9), 2858–2865. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00792>
- [45] Shen, Y., Nyström, G., & Mezzenga, R. (2017). Amyloid Fibrils form Hybrid Colloidal Gels and Aerogels with Dispersed CaCO₃ Nanoparticles. *Advanced Functional Materials*, 27(45), (pp. 1–9) <https://doi.org/10.1002/adfm.201700897>
- [46] Betz, M., García-González, C. A., Subrahmanyam, R. P., Smirnova, I., & Kulozik, U. (2012). Preparation of novel whey protein-based aerogels as drug carriers for life science applications. *Journal of Supercritical Fluids*, 72, (pp. 111–119). <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.08.019>
- [47] Dwiranti, A., Masri, F., Rahmayenti, D. A., & Putrika, A. (2019). The effects of osmium tetroxide post-fixation and drying steps on leafy liverwort ultrastructure study by scanning electron microscopy. *Microscopy Research and Technique*, 82(7), (pp. 1041–1046). <https://doi.org/10.1002/jemt.23251>