



Departamento de
Química Analítica
Universidad Zaragoza



Trabajo de fin de grado

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL USO DE NANOMATERIALES EN ADITIVOS PARA ALIMENTACIÓN ANIMAL

Lucía Navascuez Marqueta

Dirección: María Sierra Jiménez García-Alcalá
Departamento de Química Analítica, Laboratorio GEAS
Universidad de Zaragoza, 2021

Resumen

En estos últimos años ha aumentado la demanda del consumo de productos animales, lo que ha llevado a una necesidad del aumento de productividad y eficacia alimenticia en el sector. Para obtener un mayor rendimiento productivo se les suministra antibióticos a los animales y en consecuencia aparecen mecanismos de resistencia a estos antibióticos en los consumidores de productos animales. Dentro del emergente mundo de los nanomateriales, los nanomateriales base plata han surgido como una alternativa al uso de antibióticos en producción animal.

El objetivo general de este trabajo es la caracterización de distintas especies de plata (Nanopartículas de plata (AgNPs) y Ag (I)) en distintas muestras de pienso para pollos sometidas a procesos de lixiviación en agua y digestión "in vitro" y además estudiar la acumulación de dichas especies de plata en diversos tipos de tejidos animales. Se ha determinado el contenido total de plata en las muestras de pienso para así, poder determinar cuánta plata es liberada al medio acuoso tras una lixiviación mediante las técnicas de Espectroscopía de Absorción Atómica con llama (EAA-llama) y Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS). Además, mediante ambas técnicas se ha determinado la concentración total de plata liberada tras un proceso de digestión "in vitro" simulado para pollos. Utilizando el acoplamiento de Cromatografía Hidrodinámica (HDC) – ICP – MS se ha podido determinar que a partir de las muestras de pienso sólo se libera Ag(I) debido a que las AgNPs (presentes en el pienso) se transforman a Ag(I) durante dicho proceso de digestión "in vitro" simulado. Finalmente se ha determinado el contenido total de Ag acumulada en distintos tipos de tejidos (hígado y músculo) de pollos sometidos a un experimento "in vivo" alimentados con las muestras pienso estudiadas.

Abstract

During the last few years, the consumer demand of animal products has increased, that is the reason why an increase of poultry production and an enhancement of the food safety are required. To obtain a better production performance, antibiotics are provided to the animals, consequently resistance mechanisms had appeared due to the consumption of animal products containing these antibiotics. In the emergent world of nanomaterials, the silver-based nanomaterials have been introduced as an alternative to the use of antibiotics in the animal production.

The main goal of this work is the characterization of different species of silver (Nanoparticles of silver (AgNPs) and Ag(I)) in different samples of chicken's feed subjected to leaching processes, "in vitro" digestion, and the study of the accumulation of these silver species in different types of animal tissues. The total content of silver in the feed samples has been determined in order to determine the amount of silver liberated during the leaching process which was realised in an aqueous medium and using the techniques of Flame Atomic Absorption Spectroscopy (FAAS) and inductively coupled plasma – mass – spectrometry (ICP – MS). Also using the two mentioned techniques, the total concentration of silver released after the simulated "in vitro" digestion process has been determined. Besides, hydrodynamic chromatography coupled to inductively mass spectrometry (HDC)-ICP-MS was used for the determination of silver species (dissolved and particulate) in the chicken's feed samples, and it was concluded that only Ag(I) was released because the AgNPs (present in the samples of feed) are converted to Ag(I) during this process of "in vitro" digestion simulated previously. Finally, the quantification of the total content of Ag accumulated in different types of chicken tissues (liver and muscle) was conducted after the realization of an "in vivo" chicken experiment that consisted in feeding them with the studied samples of feed.

Agradecimientos

Realizar este trabajo ha supuesto para mi un importante avance tanto académica como personalmente. Es por eso por lo que me gustaría agradecer a todas las personas que de alguna manera se han visto implicadas.

En primer lugar, a mi directora, M.^a Sierra Jiménez, por no soltarme nunca de la mano y confiar en mí, por tu ayuda en la organización y planificación de este trabajo. Me gustaría agradecerte tu cooperación y tu valiosa ayuda. Me has ofrecido todas las herramientas necesarias para completar este trabajo. He aprendido mucho gracias a ti.

A Khaoula, por su implicación, capacidad de trabajo y su espíritu de alegría.

Y a mi familia por su apoyo incondicional y por su forma de creer en mí. Habéis sido un pilar fundamental en esta etapa.

Abreviaturas empleadas

NPs: Nanopartículas

AgNPs: Nanopartículas de plata

NMs: Nanomateriales

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

EAA – Llama: Espectroscopía de Absorción Atómica en llama

ICP – MS: Espectroscopía de masas con plasma acoplado inductivamente

Sp – ICP – MS: Espectroscopía de masas con plasma de acoplamiento inductivo en modo de detección de partículas individuales

HDC: Cromatografía hidrodinámica

LD: Límite de detección

LC: Límite de cuantificación

PB: Tampon fosfato de sodio

PBS: Tampon bifosfato de sodio

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1.- Nanomateriales y su caracterización	1
1.1.1.- Caracterización de AgNPs y especies derivadas por EAA – Llama	2
1.1.2.- Caracterización de AgNPs y especies derivadas por ICP – MS	2
1.1.3.- Caracterización de AgNPs y especies derivadas por HDC – ICP – MS	3
1.2.- Determinación del contenido total de especies de plata en muestras biológicas	3
1.3.- Estudios de liberación de especies de plata a partir de muestras alimenticias en procesos de digestión “in vitro”	4
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO	4
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	5
3.1.- INSTRUMENTACIÓN: APARATOS Y MATERIALES	5
INSTRUMENTOS	5
APARATOS	5
MATERIALES	5
3.2.- REACTIVOS, DISOLUCIONES PATRÓN Y MUESTRAS.....	5
REACTIVOS.....	5
DISOLUCIONES PATRÓN	5
MUESTRAS.....	6
3.3.- PROCEDIMIENTOS	6
3.3.1.- CARACTERIZACIÓN DEL PIENSO	6
3.3.2.- DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE Ag EN EL PIENSO POR ATAQUE EN HORNO MICROONDAS E ICP – MS.....	7
3.3.3.- ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE Ag TOTAL EN AGUA.....	7
3.3.4.- ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE Ag TOTAL EN EL PROCESO DE DIGESTIÓN IN VITRO	9
3.3.5.- ESTUDIO DE DIFERENTES ESPECIES LIBERADAS DEL PIENSO EN LA DIGESTIÓN IN VITRO POR HDC – ICP – MS.....	10
3.3.6.- DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE Ag TOTAL EN DISTINTOS TIPOS DE TEJIDOS DE POLLO	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
4.1.- CARACTERIZACIÓN DEL PIENSO	12
HUMEDAD	12
pH Y CONDUCTIVIDAD.....	12
4.2.- DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE Ag EN EL PIENSO POR ATAQUE MICROONDAS E ICP – MS.....	13
4.3.- ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE Ag TOTAL EN AGUA.....	13
DETERMINACIÓN POR EAA – Llama	14

DETERMINACIÓN POR ICP – MS	15
4.4.- ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE Ag TOTAL EN EL PROCESO DE DIGESTIÓN IN VITRO	16
DETERMINACIÓN POR EAA – Llama	16
DETERMINACIÓN POR ICP – MS	18
4.5.- ESTUDIO DE DIFERENTES ESPECIES LIBERADAS EN LA DIGESTIÓN IN VITRO POR HDC – ICP – MS	20
4.6.- DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE Ag TOTAL EN DISTINTOS TIPOS DE TEJIDOS DE POLLO	23
5. CONCLUSIONES	23
6. BIBLIOGRAFÍA	24

1. INTRODUCCIÓN

Según la Comisión Europea, un Nanomaterial es todo aquel material natural, secundario o fabricado que contiene partículas en estado disperso o en forma de agregado o aglomerado, y en el que al menos un 50% de las partículas en la granulometría numérica poseen una o más dimensiones externas en el rango de tamaños comprendido entre 1 nm y 10 nm.¹ La reducción del tamaño de estos materiales a escala nanométrica les confiere unas propiedades diferentes a las del material en tamaño macroscópico. Por ejemplo, las nanoestructuras presentan mayor área superficial, mayor reactividad química y mayor selectividad.²

Debido a propiedades como su estabilidad química, actividad catalítica, baja toxicidad para las células eucariotas³ y su fuerte actividad antibacteriana, las nanopartículas de plata en estos últimos años han ganado mucho interés hasta el punto de convertirse en una de las categorías de productos de mayor crecimiento en la industria de la nanotecnología (Según un informe de investigación de mercado realizado por Bourne research).⁴

Las nanopartículas de plata están presentes en gran variedad de campos. Por ejemplo, en el ámbito médico son usadas para recubrimiento de instrumental quirúrgico o apósticos para heridas para evitar el crecimiento bacteriano.⁴ También tienen propiedades antivirales, se ha demostrado que el tratamiento *in vitro* con AgNPs interacciona con el virus VIH e inhibe su capacidad para unirse con las células huésped⁵. Además, encontramos las AgNPs en detergentes, pinturas para paredes, productos cosméticos, chupetes o incorporadas en la industria textil. En el sector alimentario también se emplean como alternativa a métodos de conservación de alimentos⁶.

Un emergente campo de investigación son las AgNPs en aditivos para alimentación animal como alternativa a los antibióticos. Los antibióticos tradicionalmente se han utilizado como promotores del crecimiento en la alimentación animal para obtener mayores rendimientos productivos. Esto ha llevado a un alarmante aumento de los mecanismos de resistencia a los antibióticos para los consumidores de productos animales. Se ha demostrado que las AgNPs mejoran la microbiota de los pollos reduciendo su número de bacterias dañinas es por esto que se utilizan para mejorar el crecimiento y rendimiento de estos animales.⁷

1.1.- Nanomateriales y su caracterización

Debido a la gran diversidad de los nanomateriales (NMs) no existe un procedimiento estándar para su caracterización y determinación. Para caracterizar un nanomaterial se deben conocer diversas propiedades como son: forma, tamaño/área superficial, conductividad eléctrica, fuerza, solubilidad, estructura cristalina, carga y composición.

Mediante técnicas microscópicas (microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido (SEM)⁸ o microscopía de fuerzas atómicas (AFM)), espectroscópicas (espectroscopía infrarroja con transformada de fourier (FT-IR), Raman, Rayos – X o LIBS) o de separación instrumentales se puede obtener información acerca de los parámetros físicos. La microscopía electrónica (EM) permite visualizar los NMs mientras que las técnicas espectroscópicas y de dispersión de la luz permiten obtener información sobre ellos. Mediante dispersión de Raman mejorada en superficie (SERS) se obtiene información acerca de su superficie. Además, mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) se obtiene información acerca de sus grupos funcionales e información sobre su composición elemental mediante espectroscopía de plasma inducido por láser (LIBS). Otra opción para determinar y cuantificar NMs es la espectroscopia de masas

con plasma acoplado inductivamente en el modo de detección individual de partículas (sp – ICP – MS) o las técnicas espectroscópicas de absorción atómica (EAA).

Por último, las técnicas de separación se están volviendo cada vez más relevantes a la hora de estudiar el comportamiento de los NMs debido a que, entre otras razones, son capaces de determinar su tamaño hidrodinámico y son fáciles de acoplar a detectores potentes como el ICP – MS. Como técnicas de separación encontramos el fraccionamiento de campo de flujo (FFF)⁹, la cromatografía hidrodinámica (HDC), la cromatografía de exclusión molecular (SEC) y en algunos artículos recientes la cromatografía en fase reversa (RPLC).^{10 11 12}

En este trabajo se emplean las técnicas EAA – Llama, ICP – MS para determinar y cuantificar las AgNPs y especies derivadas y por último se acopla la HDC al ICP – MS para conseguir caracterizarlas.

1.1.1.- Caracterización de AgNPs y especies derivadas por EAA – Llama

La espectroscopía de absorción atómica en llama es un método rápido y preciso de análisis mediante el cual se pueden determinar más de 60 elementos. Cuenta con límites de detección de concentraciones entorno a los mgL^{-1} y con rangos lineales de 1 orden de magnitud. Su principal limitación es la baja sensibilidad, que puede mejorarse mediante técnicas de separación o preconcentración. En particular, para el caso de la plata se pueden realizar extracciones líquido – líquido, extracción del punto de nubosidad, extracción en fase sólida y microextracción líquido – líquido dispersiva.¹³

La llama es el sistema de atomización por el cual se obtienen los átomos del elemento a analizar en fase gas, en estado fundamental y en estado libre. El fundamento consiste en que estos átomos formados en la llama absorben radiación y nos permiten obtener una señal analítica relacionable con la concentración del elemento en la muestra origen (líquida). Hay distintos tipos de llamas según el comburente y combustible utilizado, las más comunes son aire/acetileno y N_2O /acetileno, la segunda alcanza temperaturas mayores. La radiación es emitida por la lámpara de cátodo hueco que emite luz a una determinada longitud de onda en función del elemento químico a analizar. Para el caso de la plata, el monocromador solo permite pasar la luz de $\lambda = 328\text{nm}$ cuya intensidad luminosa será transformada por el detector en una señal analítica medible.

No se encuentran muchas referencias con respecto a la caracterización de AgNPs mediante EAA – Llama. Usando una microextracción líquido – líquido dispersiva y mediante esta técnica, Wu *et al.*, 2018¹⁴ determinaron el contenido de AgNPs muestras de agua del medio ambiente.

1.1.2.- Caracterización de AgNPs y especies derivadas por ICP – MS

La espectroscopía de masas por plasma acoplado inductivamente proporciona un método de análisis rápido, simultáneo y multielemental capaz de determinar de forma cuantitativa el 90% de los elementos de la tabla periódica. Cuenta con una alta sensibilidad y unos límites de detección de concentraciones alrededor de los μgL^{-1} – ngL^{-1} . Cuenta además con una buena precisión, exactitud y un alto grado de selectividad.

En este caso no hablamos de una técnica óptica, a diferencia de la EAA – Llama. Lo que se mide no es la radiación sino el número de iones en función de su relación masa/carga. La muestra líquida es bombeada a través de un nebulizador para crear un aerosol que se introduce en un plasma de gas Ar donde tiene lugar el proceso de ionización a presión atmosférica. Los iones analitos generados en el plasma atraviesan la interfase y se introducen en el espectrómetro de masas manteniendo alto vacío donde serán separados y detectados.

En comparación con la EAA – Llama, existen numerosas referencias de cuantificaciones de AgNPs realizadas en diferentes muestras. La mayoría de ellas realizadas mediante el single particle – ICP – MS ya nombrado. Para detectar y medir las NPs en suspensiones líquidas se requiere de este modo operativo de la técnica, llamado sp-ICP-MS, basado en medir suspensiones de partículas a frecuencias de adquisición muy altas para que cada partícula registrada sea una partícula individual. De esta manera, la intensidad neta de cada partícula es proporcional al número de átomos del elemento a medir (por tanto, también a la masa del elemento por partícula) y, si se conoce la composición, forma y densidad, también lo será al tamaño de la partícula¹⁵. Esta técnica se ha llevado a cabo en multitud de determinaciones, *Samin V. Jenkis et al., 2015*¹⁶ la aplicaron para determinar NPs plasmónicas en sangre, concluyendo que este modo operativo es capaz de distinguir las NPs primarias de las aglomeradas en la sangre. *E.Verleisen et al., 2015*¹⁷ trabajaron con sp-ICP-MS para confirmar los resultados obtenidos mediante TEM en la liberación de AgNPs a partir de productos de decoración en pastelería.

1.1.3.- Caracterización de AgNPs y especies derivadas por HDC – ICP – MS

La cromatografía hidrodinámica (HDC) proporciona un método versátil y robusto para la separación de partículas en suspensión basado en su tamaño debido al gradiente de concentraciones generado dentro del capilar. De forma que cada partícula tiene asociado un tiempo de retención en función a su tamaño efectivo. Las partículas de mayor tamaño recorren la columna a través de la región central, donde la velocidad es mayor, quedando menos retenidas que las de menor tamaño y saliendo antes de la columna. Por el contrario, las partículas de menor tamaño recorren la columna a través de las regiones cercanas a la pared, donde la velocidad es menor. La columna es empaquetada y está rellena por partículas no porosas. La única manera de conocer información como el diámetro, forma, composición y aglomeración de las partículas disueltas es mediante el acoplamiento de la cromatografía hidrodinámica a un sistema de detección como es el ICP – MS. De manera que mediante la combinación de ambas técnicas es posible caracterizar y cuantificar las AgNPs disueltas. La HDC es capaz de separar NPs de matrices complejas, pero con bajo poder de resolución. Lo que es más interesante es que puede separar las NPs metálicas de las correspondientes especies iónicas con suficiente resolución¹⁸. En los estudios realizados por *Pergantis et al., 2015*¹⁹ y *Rakcheev et al., 2018*²⁰ se muestra el elevado potencial de la HDC – ICP – MS para el análisis de AgNPs, AuNPs y NPs aglomeradas.

Se ha demostrado también¹⁰ que HDC acoplada al detector sp – ICP – MS puede ayudar a distinguir entre NPs esféricas y no esféricas ya que la HDC proporciona información sobre el diámetro de ellas y el modo sp – ICP – MS sobre el núcleo.

1.2.- Determinación del contenido total de especies de plata en muestras biológicas

En este trabajo fin de grado se determina el contenido total de especies de plata en distinto tipo de muestras mediante ICP – MS debido a sus idóneas prestaciones analíticas comentadas anteriormente. En estos procesos es muy importante la preparación de la muestra para el análisis. En este caso se trata la muestra sólida con HNO₃ y HCl y a través de una digestión mediante microondas se consigue la desaparición completa de la fase sólida. Es lo que se conoce como “ataque” a las muestras y el resultado es una disolución acuosa ácida adecuada para su posterior análisis mediante ICP – MS.

Existen varios estudios que para realizar la determinación total mediante ICP – MS utilizan como reactivos HNO₃ y H₂O₂^{21 22 23 24 25 26}. Sin embargo, *Verkerová,L et al., 2014*²⁷ y *Daskalakis, KD. Et al., 1997*²⁸ observaron que el H₂O₂ solo minimiza las pérdidas de plata durante el proceso en muestras con

un alto contenido de grasa mientras que el HCl sí que lo hace también para el resto de las muestras. Al añadir HCl a altas concentraciones se favorece la formación de los complejos solubles AgCl^{2-} y AgCl^{3-} de manera que la plata no precipita en forma de AgCl (especie que se forma cuando hay iones cloruro en concentraciones no muy altas) y no se pierde durante el proceso. Con respecto al HNO_3 , se utiliza porque las muestras con bajas concentraciones de Ag no son estables en ausencia de este ácido.

1.3.- Estudios de liberación de especies de plata a partir de muestras alimenticias en procesos de digestión “in vitro”

Los procesos de digestión “in vitro” a grandes rasgos constituyen una herramienta para el estudio y la comprensión de la biodisponibilidad y bioaccesibilidad de los nutrientes, fármacos y compuestos no – nutritivos. En nuestro trabajo en particular, la digestión “in vitro” se ha realizado con el objetivo de determinar cuánta cantidad de plata proveniente de las muestras de pienso es liberada tras el proceso y en qué forma.

A pesar de que son tendencia (en los últimos 40 años se han publicado más de 18000 artículos de investigación que emplean ensayos *in vitro* centrados en diversas cuestiones²⁹⁾ cuentan con una serie de limitaciones puesto que hay determinados parámetros y condiciones que tienen lugar en el proceso real que son imposibles de reproducir mediante estos ensayos. Además, no cuentan con factores genéticos, hormonales o diferencias entre organismos que pueden influir en el aparato digestivo de cada uno. Pese a ello cuentan con ventajas como la rapidez, inferior coste y no tienen restricciones éticas como ocurre con los experimentos “*in vivo*”.

La recreación de las condiciones fisiológicas de la digestión “*in vivo*” se consigue mediante la adición de disoluciones y enzimas simuladas, así como el ajuste de parámetros como pH, temperatura, tiempo y agitación.

Con respecto a las AgNPs, hay multitud de estudios para su determinación y caracterización tras el correspondiente proceso de digestión “*in vitro*” tanto en humanos como en animales. Por ejemplo, *Ramos et al., 2017*³⁰ han descrito la caracterización y determinación simultánea de AgNPs y de Ag disuelta en carne de pollo tras el proceso de digestión *in vitro* simulado para humanos. *Abad – Alvaro et al., 2019*³, pertenecientes a la Universidad de Zaragoza, también tienen un artículo donde realizan la digestión *in vitro* para cerdos para caracterizar las especies de Ag liberadas tras el proceso.

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

El objetivo general de este trabajo es la caracterización de distintas especies de plata (AgNPs y Ag (I)) en distintas muestras de pienso para pollos sometidas a procesos de lixiviación en agua, digestión “*in vitro*” y además estudiar la acumulación de dichas especies de plata en diversos tipos de tejidos animales. Para ello, los objetivos específicos propuestos han sido:

- Búsqueda de información bibliográfica sobre los nanomateriales como material emergente, poniendo especial atención a las AgNPs. Así como de su determinación y caracterización en diferentes muestras y en diferentes estudios de liberación en procesos de digestión “*in vitro*” mediante EAA – Llama, ICP – MS y HDC – ICP – MS.
- Caracterización de las muestras de pienso (pH, humedad y conductividad).
- Determinación mediante ICP – MS del contenido total de Ag de dos muestras de pienso específicas, que han sido el objeto de estudio del resto del trabajo, mediante un ataque por microondas.

- Determinación del contenido total de Ag liberada a partir de las dos muestras de pienso en medio acuoso tras el proceso lixiviación mediante EAA – Llama e ICP – MS.
- Determinación del contenido total de Ag liberada a partir de las dos muestras de pienso en el proceso de digestión “in vitro” diseñado para los pollos.
- Caracterización y cuantificación de especies de Ag (AgNPs y Ag(I)) liberadas a partir de las dos muestras de pienso en el proceso de digestión “in vitro” diseñado para los pollos por HDC – ICP – MS.
- Determinación del contenido total de Ag en diversos tejidos de pollos (músculo e hígado) sometidos a un experimento “in vivo” alimentados con los piensos estudiados.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1.- INSTRUMENTACIÓN: APARATOS Y MATERIALES

INSTRUMENTOS

El listado correspondiente a los instrumentos utilizados para la realización de este trabajo se encuentra en el **apartado A** en Anexos.

APARATOS

El listado correspondiente a los aparatos utilizados para la realización de este trabajo se encuentra en el **apartado B** en Anexos.

MATERIALES

El listado correspondiente a los materiales utilizados para la realización de este trabajo se encuentra en el **apartado C** en Anexos.

Todo el material usado para la preparación y manipulación de muestras ha sido previamente sumergido durante 24 horas en una disolución al 10% (v/v) de HNO₃ en agua MilliQ con el fin de reducir el riesgo por contaminación. Transcurrido ese tiempo, se aclara con agua ultrapura y se deja secar al aire antes de darle uso.

3.2.- REACTIVOS, DISOLUCIONES PATRÓN Y MUESTRAS

REACTIVOS

El listado correspondiente a los reactivos utilizados para la realización de este trabajo se encuentra en el **apartado D** en Anexos.

DISOLUCIONES PATRÓN

- Plata estándar para ICP-MS 994±3 mg/L (Sigma-Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania)
- Patrón de Rh para ICP-MS de 1001 ± 6 mg/L (Fluka Analytical, Suiza)
- 10 nm Silver Nanosphere. Nanoxact 0,02 mg/mL, 25 ml (Nanocomposix, San Diego, EE.UU.)
- 20 nm Silver Nanospheres. Nanoxact 0,02 mg/mL 25 mL (Nanocomposix, San Diego, EE.UU.)
- 40 nm Silver Nanospheres, citrate. Nanoxact 0,02 mg/mL, 25 mL (Nanocomposix, San Diego, EE.UU.)
- 60 nm Silver Nanospheres, citrate. Nanoxact 0,02 mg/mL, 25 mL (Nanocomposix, San Diego, EE.UU.)

Los patrones correspondientes a las AgNPs deben sonicarse al menos durante 5 minutos antes de ser utilizados para evitar su aglomeración.

Todas las disoluciones empleadas se han preparado a partir de los reactivos y patrones citados anteriormente utilizando agua ultrapura.

Las disoluciones se preparan por pesada en la balanza de precisión para poder calcular concentraciones exactas, puesto que las micropipetas poseen elevadas incertidumbres. Para la densidad de todas las disoluciones se ha supuesto la del agua: 1 g/mL.

MUESTRAS

Las distintas muestras de pienso se utilizaron como alimento de un experimento “in vivo” llevado a cabo por el grupo de investigación en colaboración con el departamento de producción animal y ciencia de los alimentos, dentro del proyecto “Tecnologías innovadoras para diagnóstico, prevención y eliminación de contaminantes emergentes (antibióticos) de las aguas del territorio POCTEFA (POCTEFA EFA 183 – 16/OUTBIOTICS)”. El experimento consistió en 4 tipos de ensayo diferentes realizados con un total de 850 pollos. Se les suministró un tipo de pienso u otro durante un tiempo determinado en función del grupo al que pertenecían (pienso con o sin Ag) y de la edad (polvo o pellet). Una vez acabado cada ensayo, se recogieron un total de 180 muestras representativas entre tejidos (músculo e hígado) y heces.

Las muestras utilizadas para los distintos apartados de este trabajo son:

- Pienso inicio polvo caolín control: dado durante la primera semana al grupo control
- Pienso inicio pellets caolín control: dado durante la segunda semana al grupo control
- Pienso inicio polvo plata Ag: dado durante la primera semana a los 2 grupos Ag
- Pienso inicio pellets plata Ag: dado durante la segunda a los 2 grupos Ag
- Pienso crecimiento control (pellets): dado al grupo control a partir de la tercera semana
- Pienso crecimiento Ag (pellets): dado a los 2 grupos Ag a partir de la tercera semana
- Muestras de músculo e hígado pertenecientes al experimento in vivo

De estas muestras se realizó la caracterización (determinación de humedad, pH y conductividad) para los seis piensos descritos. Para el resto de los estudios llevados a cabo en este TFG se trabajó con pienso crecimiento control (pellets) y pienso crecimiento Ag (pellets). La muestra de pienso crecimiento Ag contiene un nanomaterial base plata denominado caolín (8,32 mg NanoAg/g kaolin). La muestra de pienso control contiene la misma matriz sin el nanomaterial base plata.

3.3.- PROCEDIMIENTOS

3.3.1.- CARACTERIZACIÓN DEL PIENSO

DETERMINACIÓN DE HUMEDAD MEDIANTE SECADO EN ESTUFA

Para determinar el porcentaje de humedad de los 6 diferentes tipos de pienso se ha realizado un proceso de secado en estufa basado en la pérdida de peso de la muestra por evaporación del agua. Para ello se ha pesado 1 gramo de pienso en un vidrio de reloj y se ha llevado a la estufa a una temperatura constante de 105°C. Se ha realizado un seguimiento del peso de cada muestra cada hora. El procedimiento finaliza cuando el peso se mantiene constante.

pH Y CONDUCTIVIDAD

Para la determinación de pH y conductividad se han pesado 50 mg de cada tipo de pienso y se han llevado a un volumen total de 50 mL con agua MilliQ. Se ha mantenido durante 1 hora en agitación para su posterior medida. Se han realizado 2 réplicas de cada muestra. Los pesos exactos de cada muestra se encuentran en la **tabla 4 del apartado 1C** en Anexos.

3.3.2.- DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE Ag EN EL PIENSO POR ATAQUE EN HORNO MICROONDAS E ICP – MS

Para determinar el contenido total de Ag en las muestras de pienso crecimiento control y pienso crecimiento Ag se ha optado por la puesta en disolución del pienso mediante un ataque por microondas. Frente al ataque en abierto, cuenta con la ventaja de poder controlar de forma precisa parámetros como temperatura y presión, así como con una mayor rapidez. Dados los bajos contenidos de Ag en el pienso se utilizó como técnica de detección ICP-MS.

El procedimiento para la determinación consiste en añadir a un vaso de teflón (transparente a las MW) 100 mg de pienso, 7mL de HNO₃ y 3 mL de HCl. Para las muestras correspondientes al estudio de recuperación, se han añadido además 5mgL⁻¹ de Ag (I). Este método está basado en estudios previos reflejados en la introducción.

Se han preparado las muestras que aparecen a continuación, recopilando un total de 12 tubos de teflón. El contenido exacto de cada tubo se encuentra en la **tabla 7 del apartado 2A** de Anexos.

3x Blanco	3x Pienso Crecimiento Ag	3x Pienso Crecimiento Control	1x Recuperación del Blanco	1x Recuperación del Crecimiento Control	1x Recuperación del Crecimiento Ag
-----------	--------------------------	-------------------------------	----------------------------	---	------------------------------------

Una vez preparados todos los tubos, se cierran correctamente y se introducen al microondas. El programa tiene una duración de 30 minutos y se lleva a cabo bajo una presión de 800 psi y una temperatura de 200 °C. Tras los 30 minutos, se han dejado enfriar los vasos de teflón y posteriormente su contenido se ha transferido a un tubo de 50mL (previamente pesado con su tapón) que ha sido enrasado con HCl al 3%. Una vez transferidos y enrasados los 12 tubos, han sido centrifugados durante 17 minutos a 5000 rpm con el fin de eliminar las partículas sólidas suspendidas.

Para poder cuantificar se preparó la recta de calibrado. A partir de una disolución intermedia correspondiente a 1 mgL⁻¹, se prepararon patrones de concentración 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 50 µgL⁻¹ de Ag(I), todos ellos en un volumen total de 25 mL al 2% y 6% en volumen de HNO₃ y HCl respectivamente. Los pesos exactos se encuentran en la **tabla 8 del apartado 2B** en Anexos.

La disolución de optimización es una disolución de 10 µgL⁻¹ de Ag(I). El estandar interno es una disolución de 10 µgL⁻¹ de Rh. Tanto la disolución de optimización como la del estandar interno se prepararon en un volumen total de 50 mL al 1% en volumen de HNO₃. Los pesos exactos se encuentran en las **tablas 12 y 13 del apartado 2C** en Anexos, así como las condiciones instrumentales del ICP-MS (**tabla 11 del apartado 2C**) empleadas para la determinación.

Previamente a la determinación el ICP-MS se debe optimizar para obtener la máxima sensibilidad y un porcentaje de óxidos e iones divalentes inferior al 3% según recomendación del fabricante. Además, con la disolución de optimización de Ag (I) (10 mgL⁻¹) se optimizaron las condiciones de flujo de gas de nebulización y voltaje de la lente para obtener la máxima sensibilidad para Ag. Estas optimizaciones se realizan cada vez que se usa ICP-MS para las distintas determinaciones.

3.3.3.- ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE Ag TOTAL EN AGUA

La determinación de Ag procedente del pienso liberada en agua se lleva a cabo mediante ensayos de lixiviación. Para ello, 8 muestras se han sometido a agitación constante durante 3 periodos de tiempo diferentes: 10 minutos, 1 hora y 24 horas.

Las 8 muestras corresponden a:

1x Blanco	3x Pienso Crecimiento Ag	2x Pienso Crecimiento Control	1x Adición de Ag (I) al Blanco	1x Adición de Ag (I) Crecimiento Control
-----------	--------------------------	-------------------------------	--------------------------------	--

El contenido de las muestras de pienso corresponde a 50 mg de pienso enrasados con un volumen de 50 mL de agua MilliQ. Y el contenido de las muestras con adición es el mismo añadiendo 5 mgL⁻¹ de Ag(I).

Se ha realizado la determinación mediante EAA – Llama y mediante ICP – MS ya que para las muestras de pienso crecimiento Ag no se obtuvo suficiente sensibilidad para su determinación por EAA-llama.

DETERMINACIÓN POR EAA – Llama

En este caso se ha realizado la determinación de 2 formas distintas: con y sin centrifugación.

La primera ha consistido en, una vez concluido el tiempo de agitación, las muestras han sido centrifugadas durante 17 minutos a 5000 rpm. Posteriormente se han cogido 7,5 mL del sobrenadante y se han llevado a un volumen total de 15 mL con un 1% en volumen de HNO₃.

Y, por otro lado, con el fin de estudiar la influencia de la etapa de centrifugación durante el proceso, una vez concluido el tiempo de agitación se han dejado las muestras en un baño de hielo hasta que se ha formado el precipitado. De nuevo, 7,5 mL del sobrenadante han sido llevados a 15 mL con un 1% en volumen de HNO₃. El contenido de cada muestra, así como su correspondiente dilución para ambas determinaciones, se encuentra en las **tablas 15-20 del apartado 3A1 en Anexos**.

Para poder cuantificar, se ha preparado una recta de calibrado correspondiente a concentraciones de 1, 2, 3, 4, y 5 mgL⁻¹ de Ag(I) (preparadas a partir de una dilución intermedia del patrón comercial, correspondiente a 100 mgL⁻¹ de Ag(I)) en un volumen total de 15 mL al 1% en volumen de HNO₃. Los pesos y las concentraciones correspondientes a cada punto se encuentran en las **tabla 21, 24 y 27 del apartado 3A2** en Anexos (Se realizaron 3 rectas de calibrado en total).

Previo a medir hay que optimizar el espectrofotómetro seleccionando la longitud de onda, la intensidad de la corriente y la anchura de la rendija del monocromador adecuadas. Así como ajustando la altura del mechero y la posición de la lámpara. Los parámetros instrumentales empleados en la determinación se muestran en la **tabla 30 del apartado 3A3** en Anexos.

DETERMINACIÓN POR ICP – MS

Para llevar a cabo la determinación por ICP – MS todas las muestras han sido centrifugadas (17 min a 5000 rpm) ya que no se puede correr el riesgo de que quedara alguna partícula sólida en suspensión que afectara a los distintos componentes del ICP - MS. Y, en este caso, 150 µL del sobrenadante han sido llevados a un volumen total de 15 mL en 1% en volumen de HNO₃. El contenido de cada muestra y su dilución, para cada tiempo de agitación, se muestran en las **tablas 36-38 del apartado 3B1** de Anexos.

La recta de calibrado en este caso corresponde a concentraciones de 1, 5, 50 y 100 µgL⁻¹ de Ag(I) (preparadas también a partir de una dilución intermedia del patrón comercial, en este caso de concentración 1 mgL⁻¹) en un volumen total de 15 mL al 1% en volumen de HNO₃. Los pesos y las concentraciones correspondientes a cada punto se encuentran en la **tabla 39 apartado 3B2** en Anexos.

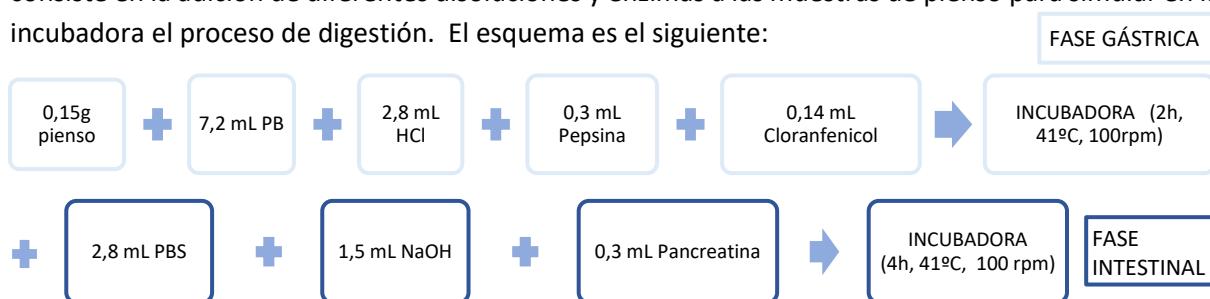
Se ha utilizado una disolución de estándar interno, equivalente a 10 µgL⁻¹ de Rh. Se utiliza una disolución de optimización de 10 µgL⁻¹ de Ag(I). Las condiciones instrumentales empleadas para la

determinación se encuentran en la **tabla 42 del apartado 3B3** en Anexos. Previamente a la determinación, se procedió a la optimización del ICP-MS según se describe en el apartado 3.3.2.

3.3.4.- ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE Ag TOTAL EN EL PROCESO DE DIGESTIÓN IN VITRO

En este apartado se determina la concentración de plata liberada a partir del pienso en un proceso de digestión in vitro. El protocolo de digestión está basado en los modelos propuestos por *Boisen & Fernandez, 1995³¹* y *Yegani et al., 2013³²* y se ha determinado el contenido total de Ag liberada mediante EAA – Llama e ICP – MS.

El proceso de digestión in vitro consta de 2 etapas: la fase gástrica y la fase intestinal. El procedimiento consiste en la adición de diferentes disoluciones y enzimas a las muestras de pienso para simular en la incubadora el proceso de digestión. El esquema es el siguiente:



Para ambas fases, previo a la incubadora, todos los tubos son agitados en el vórtex durante 1 minuto para asegurar la homogeneización de la mezcla. Después permanecen 2-3 minutos en el baño de ultrasonidos para evitar la agregación de las AgNPs.

El contenido y la preparación de cada disolución se encuentra en el **apartado 4A** en Anexos.

Las muestras que se han sometido a la digestión han sido las siguientes:

1x Blanco	2x patrón Ag (I) 5mgL ⁻¹	2x patrón de AgNPs (20nm) 1mgL ⁻¹	2x Pienso Crecimiento Control + 5mgL ⁻¹ Ag(I)	2x Pienso Crecimiento Control + 1 mgL ⁻¹ AgNPs
-----------	--	---	---	--

Para la preparación de los patrones y las muestras de pienso control con adición, el procedimiento es el mismo con la salvedad de que hay que añadir el volumen correspondiente de Ag(I) o AgNPs para obtener las concentraciones de 5 mgL⁻¹ y 1 mgL⁻¹ respectivamente. Se debe de tener en cuenta que el volumen final de la fase gástrica son 10 mL y el de la fase intestinal son 15 mL.

Además, para la determinación mediante ICP – MS se han preparado 2 muestras de pienso crecimiento control y 3 muestras de pienso crecimiento Ag sin ningún tipo de adición. Resultando un total de 9 muestras para la determinación mediante EAA – Llama y 14 muestras para la determinación mediante ICP – MS.

EAA – Llama

Para poder cuantificar el contenido de Ag liberada en cada muestra, se ha preparado una recta de calibrado correspondiente a concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5 y 7 mgL⁻¹ de Ag(I) en un volumen total de 15 mL al 1% en volumen de HNO₃. Para ello se ha realizado una dilución intermedia del patrón comercial correspondiente a 100 mgL⁻¹ de Ag(I). Los pesos y las concentraciones exactas para cada punto se encuentran en la **tabla 51 del apartado 4B2** en Anexos.

El contenido de las 9 muestras sometidas al proceso de digestión aparece detallado en las **tablas 48-50 del apartado 4B1** en Anexos. El estudio se ha realizado con y sin etapa de centrifugación.

Con respecto al primero, una vez acabado el tiempo de cada fase, las muestras han sido centrifugadas durante 17 minutos a 5000 rpm con el fin de separar la fase sólida de la líquida, disponiendo así de una disolución libre de partículas sólidas suspendidas. Con respecto al segundo, transcurrido el proceso de digestión, se han dejado las muestras en un baño de hielo el tiempo suficiente para formarse el precipitado correspondiente.

Tal y como se ha explicado en el apartado 3.3.3 correspondiente a EAA – Llama, hay que optimizar el espectrofotómetro como paso previo a la determinación. Los parámetros instrumentales con los que se han tomado las medidas se muestran en la **tabla 54 del apartado 4B3** en Anexos

ICP – MS

La determinación mediante ICP – MS se llevó a cabo con la etapa previa de centrifugación ya que como se ha comentado previamente es importante que en la disolución de medida no queden partículas sólidas suspendidas.

Las muestras a las que se ha adicionado Ag(I) y AgNPs han sido diluidas para obtener una concentración aproximada a un punto situado en la mitad de la recta de calibrado con el fin de obtener una menor incertidumbre. La dilución de cada muestra, así como su contenido exacto para ambas fases se encuentra en las **tablas 59-63 del apartado 4C1** en Anexos.

La recta de calibrado para cada fase de digestión corresponde a concentraciones de 1, 5, 10, 20, 25, 30 y 50 μgL^{-1} en un volumen total de 15 mL al 1% en volumen de HNO₃. Para ello se han tomado los volúmenes correspondientes de una dilución intermedia del patrón comercial, de concentración 1 mgL^{-1} . Los pesos y las concentraciones correspondientes a cada punto se encuentran en las **tablas 64** (fase gástrica) y **69** (fase intestinal) en Anexos.

Se utiliza como patrón interno 10 μgL^{-1} de Rh y como disolución de optimización de 10 μgL^{-1} de Ag(I).

Las condiciones instrumentales empleadas para la determinación se encuentran en las **tablas 67 y 72** de Anexos. Igualmente se procedió a la optimización del ICP-MS según se describe en apartado 3.3.2.

3.3.5.- ESTUDIO DE DIFERENTES ESPECIES LIBERADAS DEL PIENSO EN LA DIGESTIÓN IN VITRO POR HDC – ICP – MS

En el apartado anterior se estudia la concentración total de plata liberada en el proceso de digestión in vitro. En este estudio se ha utilizado un sistema acoplado de HDC-ICP-MS de manera que se utiliza el ICP – MS como sistema de detección. Como se ha explicado en la introducción mediante HDC vamos a conseguir diferenciar el tipo de especies de Ag liberadas (Ag (I) y/o AgNPs) a partir del pienso en el proceso de digestión in vitro.

La fase móvil utilizada fue previamente optimizada dentro del grupo de investigación con la siguiente composición: 0,013% de SDS + 1mM de penicilamina (ajustada a pH 7,5)¹⁸. En el **apartado 5A** de anexos se encuentra su modo de preparación.

Con respecto al acondicionamiento del cromatógrafo, previo a realizar las medidas hay que purgarlo para eliminar las posibles burbujas. También se lava y se homogeneiza la jeringuilla de inyección (de volumen 20 μL). Posteriormente, se acondiciona la columna durante un mínimo de 10 minutos con la fase móvil descrita anteriormente, que es la empleada para realizar las medidas. En el caso de que el cromatógrafo lleve varios días no operativo, antes de cambiar a la fase móvil con la que se va a realizar el estudio, se debe acondicionar durante unos 30 – 45 minutos con la fase móvil recomendada por el

fabricante (composición: 0,5 mM de Na₂HPO₄, 0,013% de SDS, 0,05% de Formaldehído y 0,05% de Triton X-100 y optimizada a pH = 7,8).

El flujo de la fase móvil es en todos los casos 1,6 mLmin⁻¹, que corresponde con el recomendado por el fabricante de la columna (La columna utilizada se encuentra en el listado de instrumentación: PL-PSDA Type 1 (5-300 nm)). El volumen de inyección es 50 µL. Para controlar el cromatógrafo, obtener y visualizar los cromatogramas en tiempo real, el software empleado es el *MassLynx*.

Las muestras sometidas a la digestión que se han medido por HDC-ICP-MS han sido las siguientes:

2x Pienso Crecimiento Ag

1x Patrón Ag(I)
5mgL⁻¹

1x Patrón AgNPs
1mgL⁻¹

2x Pienso Crecimiento Control + 5mgL⁻¹ Ag(I)

2x Pienso Crecimiento Ag + 1 mgL⁻¹ AgNPs

Se ha procedido de igual manera que en el apartado anterior para todas ellas, tanto para la fase gástrica como para la fase intestinal. En las **tablas 75-76 del apartado 5B** en Anexos se encuentran las cantidades exactas de reactivos añadidos.

Una vez acabadas las 6 horas totales (2h correspondientes a la fase gástrica y 4h correspondientes a la fase intestinal), se han centrifugado las muestras durante 17 minutos a 5000 rpm. Y esta vez, las diluciones se han calculado con respecto a los resultados de concentración total obtenidos en el apartado anterior. Los pesos exactos tomados de cada una se encuentran en la **tabla 77 del apartado 5C** en Anexos. Finalmente, los extractos obtenidos en la fase intestinal una vez diluidos se han trasvasado a los viales correspondientes para poder medir en el cromatógrafo.

Con respecto a las curvas de calibración, se han realizado dos: una para el estudio del tamaño de las NPs y otra para la determinación de la concentración de Ag en las distintas¹⁸. Para el primero, se ha construido una curva con los patrones de 10, 20, 40 y 60 nm, todos ellos correspondientes a una concentración de 250 µgL⁻¹ en un volumen final de 6 mL con agua milliQ. Por otro lado, para cuantificar la concentración de Ag, se han utilizado patrones de concentraciones correspondientes a 100, 250 y 350 µgL⁻¹ de Ag(I) a los que se ha añadido 1mM de penicilamina con el fin de estabilizar la Ag(I) e impedir interacciones con la columna del cromatógrafo. Los pesos y concentraciones exactas de cada una se encuentran en las **tablas 78 y 80 de los apartados 5D y 5E**, respectivamente, en Anexos. Una vez preparadas todas las disoluciones, se trasvaza un pequeño volumen de ellas a los viales correspondientes al igual que se ha hecho con las muestras.

Para la calibración en concentración se han realizado 2 réplicas de cada patrón sin columna. Además, el patrón de 250 µgL⁻¹ se ha medido también con columna para poder calcular la recuperación y ver si hay posibles pérdidas en la columna de HDC (sólo se hizo una réplica). Por otro lado, los patrones de AgNPs se han medido con y sin columna para poder calcular la recuperación. Se han realizado 2 réplicas también. La recuperación se calcula como el cociente entre el área del pico obtenido en la medida realizada con columna y el área del pico obtenido en la medida realizada sin columna para la misma muestra.

Para el tratamiento de datos (cálculo de áreas correspondientes) y la obtención de las gráficas de los picos obtenidos por HDC-ICP-MS se ha utilizado el software Origin Pro 8.

Con respecto a las condiciones instrumentales empleadas, se encuentran en la **tabla 82 del apartado 5F** en Anexos. Se ha utilizado también la disolución correspondiente a 10 µgL⁻¹ de Ag(I) para el proceso de optimización, como en los procedimientos anteriores. Con la salvedad de que, en este caso, la optimización se debe realizar previa al acoplamiento con el cromatógrafo.

3.3.6.- DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE Ag TOTAL EN DISTINTOS TIPOS DE TEJIDOS DE POLLO

Este apartado se ha realizado con la colaboración de 2 estudiantes de doctorado, miembros del grupo de investigación GEAS.

Se ha determinado el contenido total de Ag en muestras pertenecientes al grupo que recibió pienso con Ag durante 3 semanas y que fue sacrificado una vez acabado este periodo.

Las muestras de los distintos tejidos se han distribuido en tubos depositando 2g de muestra en cada uno. Posteriormente han sido molidas y se ha procedido a su puesta en disolución y determinación por ICP-MS del mismo modo que ha sido descrito en el apartado 3.3.2.

En la siguiente secuencia de **imágenes 1 -5** se puede observar el proceso de molido realizado para una muestra de tejido de músculo:



Una vez obtenido el contenido del tubo de la imagen de la izquierda ya se pueden atacar las muestras de la misma manera que en el apartado 3.3.2 para su posterior cuantificación mediante ICP – MS. Hay algunas excepciones como la cantidad depositada en los tubos de teflón, que es igual a 200mg en lugar de 50mg y las muestras de adición se realizan con $7 \mu\text{g L}^{-1}$ de Ag(I) debido al bajo contenido de Ag en el músculo.

La recta de calibrado para la cuantificación también es diferente, en este caso corresponde a concentraciones desde 0,3 hasta $50 \mu\text{g L}^{-1}$.

Imágenes 1 – 5: Proceso de molido para una muestra de músculo

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- CARACTERIZACIÓN DEL PIENSO

HUMEDAD

En el **apartado 1B** de Anexos se muestran los resultados obtenidos. Se puede observar cómo los valores de porcentaje de humedad son inferiores al 12% en todos los casos, que es el valor permisible para los alimentos concentrados para animales de experimentación.³³

pH Y CONDUCTIVIDAD

Con respecto al estudio preliminar de pH y conductividad, se siguió el procedimiento descrito en el apartado 3.3.2. En el **apartado 1D** se encuentran los resultados obtenidos.

Se puede apreciar como el pH del pienso en todos los casos es alrededor de 6, siendo ligeramente más ácido para el pienso de crecimiento pellet (control y Ag). Por otro lado, con respecto a los valores de conductividad, a pesar de ser ligeramente más altos que el del agua, son bajos, por lo que se puede concluir que el pienso contiene baja cantidad de iones.

4.2.- DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE Ag EN EL PIENSO POR ATAQUE MICROONDAS E ICP – MS

Para la determinación del contenido total de Ag en el pienso se siguió el procedimiento descrito en el apartado 3.3.2.

La recta de calibrado obtenida con patrón interno para el isótopo Ag¹⁰⁷ fue la siguiente: $y = 0,1457x - 0,0080 / R = 0,9998$. Los parámetros de calidad de la recta se encuentran detallados en el **apartado 2B** en Anexos (**tablas 9 y 10, figura 1**), junto con su representación y valores de intensidad obtenidos.

Los resultados detallados de cada réplica y muestra se encuentran en la **tabla 14 del apartado 2D** en Anexos. Los resultados finales obtenidos para los dos tipos de pienso analizados se presentan en la siguiente tabla (**tabla 3**):

	Concentración (mgkg ⁻¹)	DSR (%)
Crecimiento Control	0,0810	3,37
Crecimiento Ag	16,0	14,5

Tabla 3: Concentración de Ag obtenida para las muestras de pienso Crec. Control y Crec. Ag

Teóricamente en el pienso control no debería haber plata, pero sí que se ha obtenido trazas de la misma. Podemos apreciar como en el caso del pienso crecimiento Ag la desviación estándar relativa es algo elevada. No es de extrañar ya que el pienso presenta muy poca homogeneidad en la distribución de sus componentes, de manera que la composición de una pequeña muestra a otra puede variar significativamente.

El valor de la recuperación nos indica si ha habido posibles pérdidas en el proceso de puesta en disolución. Se realizaron estudios de recuperación para el blanco, para el control y para el pienso con plata para ver si afecta la matriz. En los 3 casos se obtienen valores superiores al 90%, siendo muy cercanas al 100% en el caso del blanco y del crecimiento Ag. Podemos concluir entonces que la pérdida de plata durante el proceso ha sido mínima, siendo ligeramente mayor para la muestra del pienso crecimiento control.

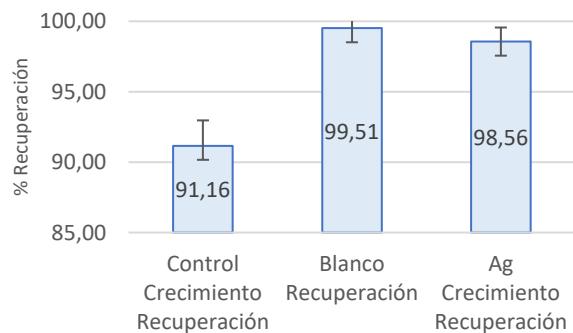


Figura 1: Valores de recuperación obtenidos para la determinación del contenido total de Ag en el estudio de las muestras de pienso

4.3.- ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE Ag TOTAL EN AGUA

Es importante este estudio de liberación del Ag total en agua para estudiar la biodisponibilidad de las AgNPs a partir del pienso utilizado. Conviene estudiar si realmente se liberan al medio o si la matriz las estabiliza impidiendo su liberación.³

Para determinar la cantidad de Ag liberada en el proceso de lixiviación en agua ultrapura se ha seguido el procedimiento del apartado 3.3.3.

La determinación se realizó por EAA - Llama y por ICP-MS debido a los bajos contenidos encontrados en el proceso de liberación en agua para las muestras de pienso crecimiento control y crecimiento Ag.

DETERMINACIÓN POR EAA- Llama

Como se ha descrito en el apartado 3.3.3 correspondiente a la determinación por EAA – Llama, se ha realizado el procedimiento con y sin etapa de centrifugación para estudiar sus efectos.

Como las medidas se tomaron en diferentes días, se realizaron varias rectas de calibrado que corresponden a las siguientes ecuaciones:

- Recta 1: $y = 0,0544x + 0,0064 / R = 0,9991$
Estudio de liberación durante 10 minutos y 1 hora sin centrifugado. Y durante 24 horas con centrifugado.
- Recta 2: $y = 0,0601x - 0,0015 / R = 0,9991$
Estudio de liberación durante 10 minutos y 1 hora con centrifugado.
- Recta 3: $y = 0,0614x + 0,0027 / R = 0,9991$
Estudio de liberación durante 24 horas sin centrifugado.

En el **apartado 3A4** en anexos se muestran detallados los test t estadísticos realizados para comparar las 3 rectas obtenidas. Se observa que la diferencia entre las rectas 2 y 3 no es significativa, por lo que asumimos que la diferencia entre ellas no es real. Sin embargo, si comparamos las rectas 1 y 2 sí que podemos afirmar que son significativamente distintas, lo mismo pasa con la 1 y 3.

La representación gráfica, los valores de absorbancia y los correspondientes parámetros analíticos obtenidos se encuentran en el **apartado 3A2** en Anexos.

Con respecto a los resultados del porcentaje de Ag liberada, no se han podido obtener para las muestras de pienso Crecimiento Control y de pienso Crecimiento Ag. La razón es debida a que las concentraciones obtenidas se encuentran por debajo del límite de cuantificación resultando así imposibles de cuantificar. En la **tabla 4** se encuentran los LC obtenidos para cada recta. Por lo que podemos concluir que el porcentaje de liberación es muy pequeño para los distintos tiempos de agitación.

	Recta 1	Recta 2	Recta 3
LC (mgL^{-1})	0,216	0,0859	0,0515

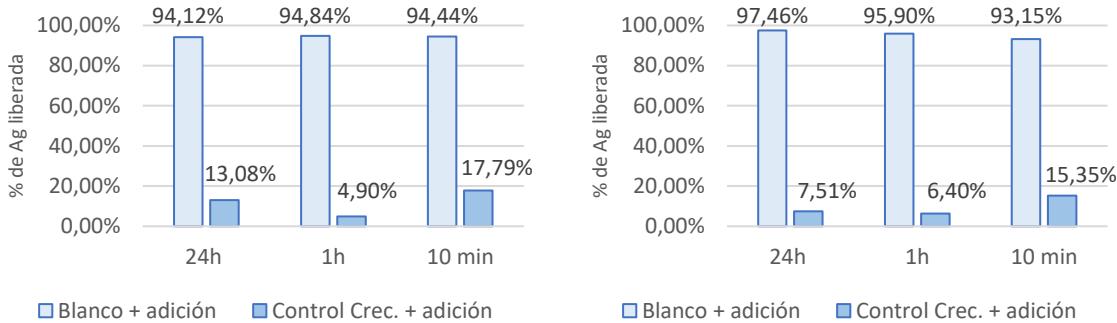
Tabla 4: Límites de cuantificación obtenidos para las 3 rectas de calibrado realizadas

Debido a esto se ha realizado el estudio de liberación en agua mediante ICP – MS.

Con respecto al cálculo del % de Ag liberada en las muestras de adición, en el siguiente gráfico (**figura 2 y 3**) se muestran los porcentajes obtenidos sin y con la etapa de centrifugación para los 3 tiempos de agitación (24h, 1h y 10 min). Los valores de absorbancia y concentraciones obtenidos para cada muestra se encuentran en el **apartado 3A5** en Anexos.

El porcentaje se ha calculado refiriendo la concentración de Ag obtenida tras la lixiviación a la concentración real inicial de patrón añadida a la muestra de control crecimiento.

Se observa que son muy similares y superiores al 90% para el Blanco. Por el contrario, son significativamente distintos para el pienso Crecimiento Control. Esto nos indica que, durante el proceso, en el blanco apenas existe pérdida de Ag(I) mientras que en el pienso sí que hay una pérdida notable de Ag(I). Por tanto, esto nos lleva a pensar que la matriz del pienso de alguna manera estabiliza la plata añadida (mediante alguna interacción o formación de complejos) y el % de liberación es muy pequeño para los distintos tiempos de agitación.



Figuras 2-3: Porcentajes de liberación obtenidos para la determinación del contenido total de Ag liberado en agua por EAA – Llama sin (2) y con (3) etapa de centrifugación

De la misma manera que en el apartado anterior, podemos concluir que apenas existe pérdida de Ag(I) durante el proceso de lixiviación para el blanco (es liberada en casi su totalidad), mientras que el porcentaje de liberación para el proceso del pienso Crecimiento Control es muy pequeño debido al efecto que la matriz del pienso ejerce sobre la plata adicionada.

Con respecto a la comparación de los resultados obtenidos con y sin centrifugación, los porcentajes de liberación obtenidos son ligeramente inferiores cuando se centrifuga. Lo cual nos indica que se pierde Ag(I) al centrifugar probablemente porque se queda retenida en el sólido, aunque las diferencias son muy pequeñas y como sólo se realizó una réplica pueden estar dentro de la propia incertidumbre de los resultados (94,12% frente a 97,46% sin y con centrifugación respectivamente para 24h).

DETERMINACIÓN POR ICP – MS

Para determinar el porcentaje de Ag liberada en medio acuoso por ICP – MS se siguió el procedimiento descrito en el apartado 3.3.3 correspondiente. En este caso sólo se realizó el estudio con centrifugación, necesaria para evitar la introducción de sólidos en el ICP-MS.

La recta de calibrado obtenida con patrón interno para el isótopo Ag¹⁰⁷ fue la siguiente: $y = 0,1260x + 0,0008 / R = 0,9996$. La representación gráfica, los valores de absorbancia y los correspondientes parámetros analíticos obtenidos se encuentran en el **apartado 3B2** en Anexos.

Los resultados de la concentración de Ag liberada para las muestras correspondientes al pienso Crecimiento Control siguen estando por debajo del límite de cuantificación ($LC = 0,0143 \mu\text{gL}^{-1}$), por lo que no se han podido determinar.

Para el pienso Crecimiento Ag, teniendo en cuenta la concentración total de Ag en el pienso obtenida en el apartado 4.2, se ha calculado el porcentaje de liberación de Ag en función del tiempo. Los resultados finales obtenidos se muestran en la siguiente tabla (**tabla 5**).

	% Ag Liberada	DSR (%)
10 min	1,40	9,43
1 hora	2,13	12,2
24 horas	3,06	3,38

Tabla 5: Porcentajes de liberación obtenidos para la determinación del contenido total de Ag liberado tras el proceso de lixiviación por ICP – MS

Se observa que la cantidad de Ag liberada aumenta ligeramente con el tiempo de agitación. Los resultados en concentración de cada muestra (se hicieron 3 réplicas de cada una) se detallan en el

apartado 3B4 en Anexos. Por otro lado, se observa que el porcentaje de plata liberado es muy pequeño, por lo tanto, la matriz no está permitiendo que la plata se libere al medio acuoso.

Con respecto al porcentaje de Ag liberada en las muestras con adición, en la **figura 4** a continuación se aprecia como los % para el blanco son elevados y notablemente mayores a los % obtenidos para la muestra de pienso Control Crecimiento. Esto nos lleva a concluir que la matriz del pienso es de nuevo la causante de que no se libere la plata para los distintos tiempos estudiados.

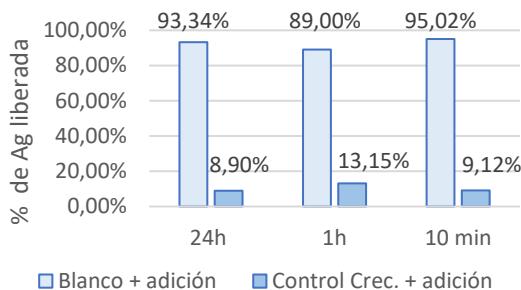


Figura 4: Porcentajes de liberación obtenidos para las muestras de adición en la determinación del contenido total de Ag liberado tras el proceso de lixiviación por ICP – MS

Los cálculos detallados de los porcentajes se encuentran en el **apartado 3B4** en Anexos

4.4.- ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE Ag TOTAL EN EL PROCESO DE DIGESTIÓN IN VITRO

Como se ha comentado en el apartado 1.3, los procesos de digestión in vitro son importantes porque permiten conocer la biodisponibilidad y bioaccesibilidad de nutrientes o especies como los aditivos en el pienso en nuestro caso, tras el correspondiente proceso de digestión. Cuentan con numerosas ventajas frente a los experimentos in vivo ya citadas anteriormente, sin dejar de tener en cuenta que hay eventos que tienen lugar en la digestión in vivo que son imposibles de reproducir.

Para realizar el estudio de la liberación de Ag total en el proceso de digestión in vitro se siguió el procedimiento descrito en el apartado 3.3.4. Cómo se ha explicado el proceso de digestión "in vitro" para pollos de acuerdo a los modelos propuestos por Boisen & Fernandez, 1995³¹ y Yegani *et al.*, 2013³² consta dos etapas: Fase gástrica y Fase intestinal. Para estudiar el comportamiento de las distintas especies de plata en el proceso de digestión "in vitro", no sólo se ha llevado a cabo con las muestras de pienso, sino que también se ha realizado el mismo experimento con patrones de Ag (I) y de AgNPs. La determinación de la Ag total liberada en cada una de las etapas se ha realizado por EAA - Llama (solo se pudieron determinar los patrones de Ag (I) y AgNPs) y por ICP-MS.

EAA – Llama

Con respecto a la determinación mediante EAA – Llama, tal y como se menciona en el procedimiento, se realizó el estudio con y sin etapa de centrifugación para valorar su influencia.

La recta de calibrado obtenida corresponde a la ecuación $y = 0,0575x + 0,0063 / R = 0,9997$.

Los valores de absorbancia obtenidos para la recta, así como sus parámetros de calidad, parámetros analíticos y la representación gráfica se encuentran en el **apartado 4B2** de Anexos.

Fase gástrica

Las concentraciones obtenidas para los patrones de Ag (I) de 5 mgL^{-1} y de AgNPs de 1 mgL^{-1} tras la etapa de centrifugación son inferiores al límite de cuantificación ($LC = 0,0917 \text{ mgL}^{-1}$), por lo que no se han podido determinar (los resultados se encuentran en la **tabla 56 del apartado 4B4** en Anexos). Por lo tanto, se puede concluir que se pierde tanto Ag (I) como AgNPs al centrifugar, probablemente porque precipita con el HCl añadido y se queda en la fase sólida.

Con respecto al estudio de estos mismos patrones sin centrifugación, se ha obtenido el porcentaje de Ag liberada comparando la concentración obtenida con la concentración real inicial. Los porcentajes de Ag liberada se muestran en la **tabla 6**. Ambas concentraciones se encuentran en la **tabla 55 del apartado 4B4** en anexos para cada patrón. Se observa una gran influencia del proceso de centrifugación en los % de plata liberada.

Se observa que el porcentaje liberado sin centrifugación es notablemente mayor para la plata iónica que para las nanopartículas. Por tanto, concluimos que las AgNPs durante la fase gástrica apenas se liberan al medio.

	SIN CENTRIFUGACIÓN	CON CENTRIFUGACIÓN		
	% de plata liberada	DSR (%)	% de plata liberada	DSR (%)
Ag (I)	76,3	2,33	< LC	< LC
AgNPs	15,6	0,44	< LC	< LC
Crec. Control + Ag (I)	18,2	7,62	6,00	6,71
Crec. Control + AgNPs	< LC	< LC	< LC	< LC

* LC = $0,0917 \text{ mgL}^{-1}$

Tabla 6: Porcentajes de liberación de Ag obtenidos para la fase gástrica por EAA – Llama

Para estudiar el efecto de la matriz de pienso en el proceso de liberación en la digestión “in vitro” se procedió a añadir 1 mgL^{-1} de AgNPs sobre el pienso control. La concentración obtenida no se pudo cuantificar debido a que las concentraciones obtenidas son inferiores al límite de cuantificación ($\text{LC} = 0,0917 \text{ mgL}^{-1}$) con y sin etapa de centrifugación. También se realizó un estudio de adición de 5 mgL^{-1} de Ag(I) sobre el control. Los resultados obtenidos sobre el porcentaje de liberación de Ag (I) en esta fase gástrica en presencia de control con y sin centrifugación se muestran en la **figura 5**. Las concentraciones obtenidas se encuentran en las **tablas 55 y 56 del apartado 4B4** en Anexos.

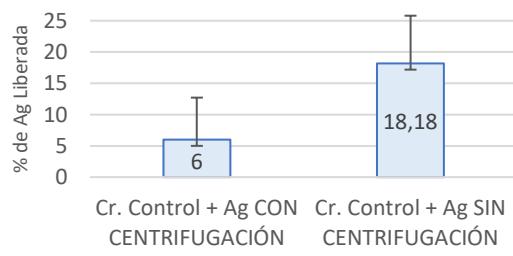


Figura 5: Porcentajes de liberación de Ag obtenidos en las muestras de adición para la fase gástrica por EAA – Llama

Se puede observar como el porcentaje obtenido es mayor cuando no se centrifuga, podemos concluir de nuevo que en la etapa de centrifugación se pierde parte de Ag.

Por otro lado, los porcentajes de liberación son bajos, lo que nos indica que en la fase gástrica se pierde gran parte de Ag. Una explicación puede ser que, al añadir HCl, se forma el correspondiente cloruro de plata que precipita, quedándose en la fase sólida, reduciendo así la cantidad de Ag restante en la fase líquida.

Fase intestinal

Las concentraciones obtenidas para esta fase se encuentran dentro del rango lineal por lo que todas las muestras han sido cuantificadas.

En la siguiente tabla (**tabla 7**) se encuentran los resultados obtenidos para los patrones correspondientes a 5 mgL^{-1} de Ag y 1 mgL^{-1} de AgNPs y las muestras de control con adición de 5 mgL^{-1} de Ag(I) y 1 mgL^{-1} de AgNPs. El porcentaje de plata liberada ha sido calculado con la concentración

obtenida referida a la concentración real inicial (se muestran en las **tablas 57 y 58 del apartado 4B4** en Anexos).

	SIN CENTRIFUGACIÓN	CON CENTRIFUGACIÓN		
	% de plata liberada	DSR (%)	% de plata liberada	DSR (%)
Ag (I)	90,8	8,99	53,5	3,38
AgNPs	20,5	2,75	4,75	13,0
Crec. Control + Ag (I)	80,9	5,54	78,8	4,66
Crec. Control + AgNPs	15,3	0,68	13,6	5,28

Tabla 7: Porcentajes de liberación de Ag obtenidos para la fase intestinal por EAA - Llama

En el caso de los patrones, se puede observar como el porcentaje de Ag (I) liberada es mayor tanto con, cómo sin la etapa de centrifugación, concluimos así que apenas se liberan AgNPs tras las 2 fases de digestión. Por otro lado, de nuevo observamos cómo estos porcentajes son mayores cuando no se centrifuga, quedando retenida la plata en el sólido.

Con respecto al pienso control con adición de Ag (I) y AgNPs se aprecia como los porcentajes obtenidos son ligeramente inferiores si se centrifuga, sin embargo, la diferencia no es sustancial. El porcentaje de liberación para la muestra de Crecimiento Control + AgNP es significativamente inferior al del Crecimiento Control + Ag, lo que refleja que al finalizar la digestión se han perdido gran parte de las AgNPs durante el proceso.

También podemos observar en la **figura 6** cómo en la fase intestinal se recupera gran parte de la plata perdida en la fase gástrica.

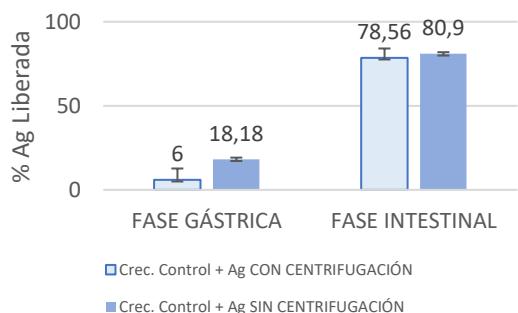


Figura 6: Porcentajes de liberación para la muestra de adición de Ag(I) para ambas fases de la digestión

ICP – MS

Se realizó también el estudio de digestión “in vitro” mediante ICP – MS, consiguiendo cuantificar todas las muestras que mediante EAA – Llama quedaban por debajo del límite de cuantificación, exceptuando al pienso crecimiento control en la primera fase de la digestión ($LC = 0,0136 \mu\text{gL}^{-1}$).

Para la fase gástrica la recta de calibrado obtenida con patrón interno midiendo para el isótopo Ag^{107} fue la siguiente: $y = 0,1377x - 0,0091 / R = 0,9989$. Y para la fase intestinal resultó ser: $y = 0,1202x - 0,0047 / R = 0,9999$. Los parámetros de calidad de la recta y parámetros analíticos junto con las representaciones e intensidades de ambas se muestran en los **apartados 4C2 y 4C5** en Anexos.

En la siguiente tabla (**tabla 8**) se muestran los resultados obtenidos para ambas fases. El porcentaje se ha calculado refiriendo la concentración de Ag obtenida tras la digestión a la concentración real inicial en el caso de los patrones y al contenido de Ag total obtenido en el apartado 4.2 para el caso de ambos piensos. Las concentraciones correspondientes a cada muestra se encuentran en las **tablas 68 y 73 de los apartados 4C4 y 4C7** en Anexos.

	FASE GÁSTRICA		FASE INTESTINAL	
	% de plata liberada	DSR (%)	% de plata liberada	DSR (%)
Crec. Control	< LC	< LC	82,1	22,3
Crec. Ag	30,9	4,59	47,2	9,17
Ag (I)	4,35	0,36	35,3	4,24
AgNPs	8,68	0,04	30,5	0,30
Crec. Control + Ag (I)	<LC	< LC	57,0	1,11
Crec. Control + AgNPs	38,9	16,3	55,1	5,65

* LC = 0,0136 µgL⁻¹ (fase gástrica) y 0,0217 µgL⁻¹ (fase intestinal)

Tabla 8: % de liberación de Ag obtenidos para las fases de la digestión “in vitro” por ICP – MS

Para los patrones de Ag(I) y AgNPs los porcentajes de liberación en la fase gástrica son bajos (4,35 y 8,68%). En la determinación por EAA-llama estaban por debajo del LC. Para la fase intestinal son mayores (35,3 y 30,5 respectivamente para Ag(I) y AgNPs). Para Ag(I) es inferior al obtenido por EAA-llama con centrifugación (53,5%) y para AgNPs es superior al obtenido por EAA-llama con centrifugación (4,75%). No encontramos explicación a estas diferencias, aunque dados los contenidos de estas disoluciones, para hacer la determinación por ICP-MS hay que hacer diluciones mayores y se ha podido cometer algún error.

Con respecto al pienso crecimiento control sin adición, que no se ha podido cuantificar para la primera fase (LC = 0,0136 µgL⁻¹), los resultados obtenidos para la segunda son irreproducibles debido también a los bajos contenidos liberados teniendo en cuenta la concentración de plata también baja en este pienso y como ya se ha mencionado antes, el pienso no es una muestra homogénea y la composición puede variar de forma muy condicionante de una pequeña porción de muestra a otra.

Para el pienso crecimiento Ag, los resultados obtenidos son reproducibles y se observa como el porcentaje de Ag liberada es mayor una vez transcurridas las 2 fases de digestión (47,2%) que transcurrida solo la primera (30,9%).

Con respecto a los resultados obtenidos de las muestras de pienso control con adición los resultados son muy similares a los de la muestra de pienso crecimiento Ag. En torno al 39% para control más Ag(I) en la fase gástrica, y en torno al 55% en la fase intestinal tanto para control más Ag(I) y control más AgNPs. Los resultados se encuentran a continuación en la **figura 7**.

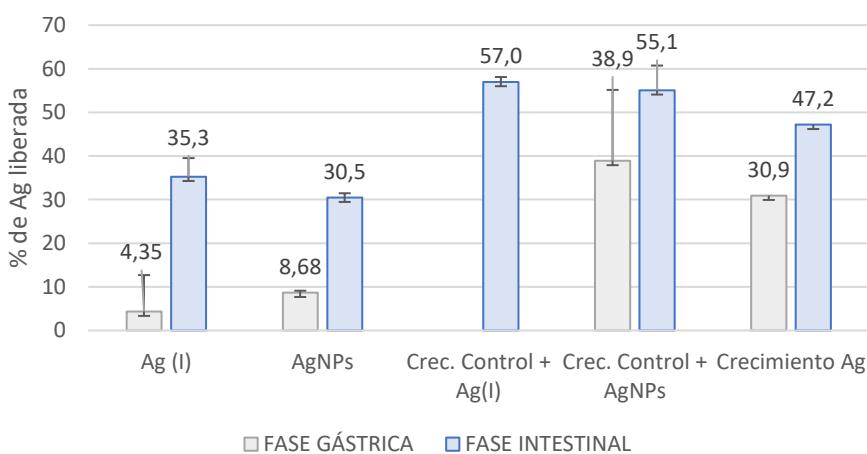


Figura 7: Porcentajes de liberación de Ag obtenidos para ambas fases de la digestión “in vitro” por ICP – MS

Se puede observar como el porcentaje de recuperación es mayor para la Ag(I) que para las AgNPs, lo cual indica que a lo largo del proceso de digestión se pierden más AgNPs, es probable que la etapa de centrifugación tenga gran influencia. Conclusión que también se ha obtenido mediante EAA – Llama.

Con respecto a la comparación de los porcentajes de liberación obtenidos para cada fase, los resultados obtenidos para la fase intestinal son mayores que para la fase gástrica. También se había observado mediante el estudio EAA – Llama.

4.5.- ESTUDIO DE DIFERENTES ESPECIES LIBERADAS EN LA DIGESTIÓN IN VITRO POR HDC – ICP – MS

En el apartado anterior se estudia la concentración total de plata liberada en el proceso de digestión in vitro. Como se ha comentado, el acoplamiento de HDC – ICP – MS permite caracterizar las distintas especies de plata liberadas mientras que mediante ICP – MS solo puede determinar la concentración total de plata. El tamaño de las AgNPs liberadas es importante puesto que la toxicidad de ellas depende de ello entre muchos otros factores³⁴. Mediante esta determinación también se puede comprobar si las AgNPs sufren algún tipo de transformación en el proceso de digestión “in vitro”, pues la HDC – ICP – MS es un método que se ha demostrado por miembros del grupo de investigación GEAS válido para distinguir entre Ag iónica y AgNPs¹⁰.

Para realizar el estudio mediante HDC – ICP – MS de las diferentes especies liberadas en la digestión se siguió el procedimiento descrito en el apartado 3.3.5.

Para cuantificar las diferentes especies de Ag liberadas en los extractos de digestión de las distintas muestras estudiadas se interpoló el área de los picos obtenidos en la recta de calibrado de Ag(I) obtenida a partir de datos de área de patrones de concentración creciente de Ag (I) (ver apartado 3.3.5), cuya ecuación corresponde a $y = 258,28x + 6393,4$ con un $R = 0,9959$. Su representación, parámetros de la recta y parámetros analíticos, así como las áreas obtenidas para cada patrón se encuentran detalladas en el **apartado 5D** Anexos. El valor de recuperación obtenido para Ag(I) midiendo con y sin columna para estudiar posibles pérdidas en la misma ha sido 80,45% (sólo se realizó una réplica). Los parámetros de tiempo de retención y área obtenidos se encuentran en la **tabla 84 del apartado 5G** en Anexos.

Para la determinación de tamaños de las AgNPs se utilizó la recta de calibrado obtenida a partir de la medida de tiempos de retención frente a tamaño de patrones de AgNPs con distintos tamaños (ver apartado 3.3.5) y corresponde a la ecuación $y = -0,138\ln(x) + 8,2757$ con un $R = 0,9961$. Las áreas, los tiempos de retención, y la recuperación obtenida para cada patrón, así como la representación gráfica, se encuentran en el **apartado 5E** de Anexos. Los valores de recuperación están en el rango de 25 – 60% siendo valores bastante inferiores a los obtenidos en la referencia¹⁰ por un problema de mal funcionamiento de la columna en el momento de realizar este estudio.

En la **figura 8** se muestra el cromatograma obtenido por HDC-ICP-MS para los patrones de AgNPs de distintos tamaños y el patrón de Ag (I).

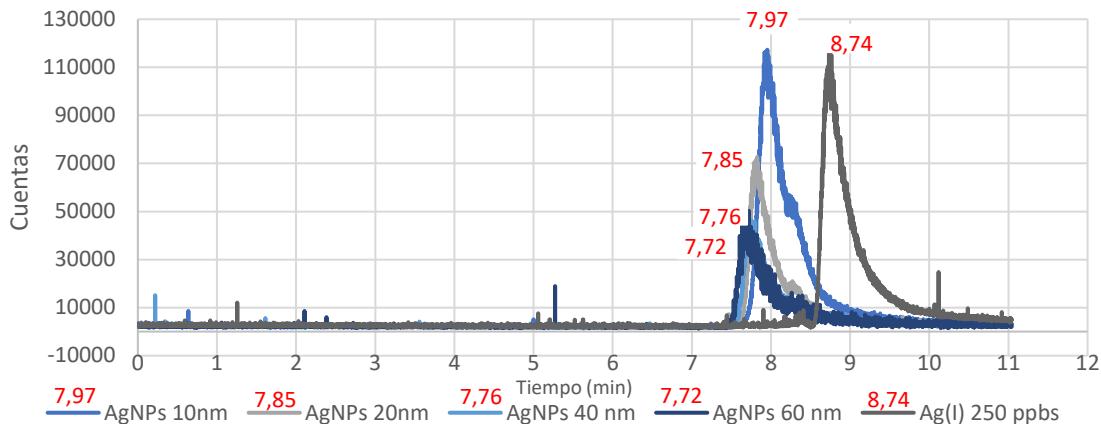


Figura 8: Cromatogramas obtenidos para los patrones de AgNPs y al patrón de Ag(I)

Se procedió a la medida de las diferentes muestras explicadas en el apartado 3.3.5 procedentes de los extractos obtenidos en la etapa intestinal de la digestión “*in vitro*” ya que esta etapa es realmente la etapa interesante en relación con la biodisponibilidad posterior de las especies de Ag encontradas. En la **tabla 9** se muestran los resultados de tiempos de retención (con su RSD, en general bastante buena, característica de HDC), áreas promedio (con su RSD) y valores de concentración obtenidos (con su RSD). Los resultados de cada réplica aparecen en la **tabla 83 del apartado 5G** en Anexos.

	Tr (min)	RSD (%)	Área	RSD (%)	Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)
Ag (I)	8,50	0,08	97922	1,75	354,37	1,87
AgNPs*	-	-	-	-	-	-
Crecimiento Control + Ag(I)	8,44	0,10	80596	1,06	287,29	1,15
Crecimiento Control + AgNPs	8,52	0,25	266	0,33	285,86	0,36
Crecimiento Ag	8,53	0,06	100,12	0,88	19,46	1,99

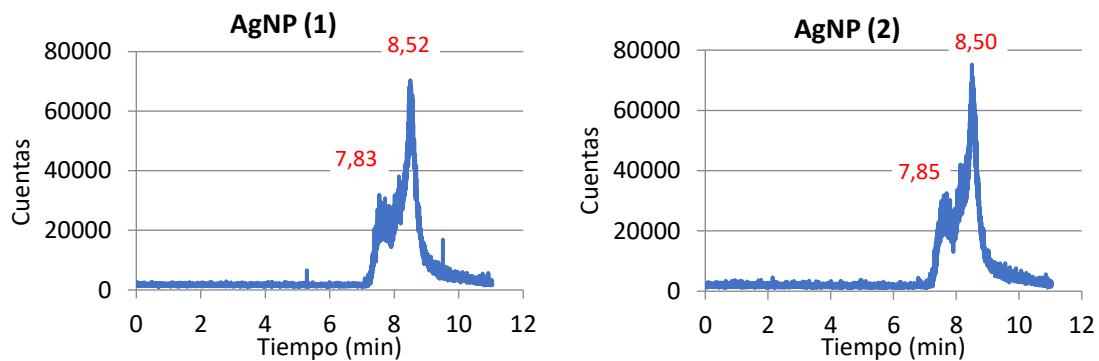
*Como se explica a continuación, las AgNPs no han podido ser cuantificadas

Tabla 9: Tiempos de retención, áreas y concentración obtenidos para las muestras determinadas por HDC – ICP – MS tras el proceso de digestión “*in vitro*”

Con respecto a los resultados obtenidos del extracto del patrón de Ag(I) (8,50 min), el tiempo de retención se desvía un poco con respecto al obtenido para el patrón de Ag(I) no sometido a la digestión (8,74 min) mostrado en la **figura 1**, probablemente debido a la diferente matriz del extracto. No es una variación considerable de manera que será utilizado como parámetro de identificación para el resto de las muestras. Los cromatogramas obtenidos para las dos réplicas realizadas se encuentran en el **apartado 5H** en anexos.

Con respecto a los resultados obtenidos del extracto de la muestra de pienso crecimiento control + Ag(I), concluimos también que el pico obtenido corresponde a la especie Ag(I) (tiempos de retención similar al extracto del patrón de Ag (I)). La Ag(I) que se ha liberado tras el proceso de digestión es parte de la correspondiente a la adición. Los cromatogramas obtenidos para las dos réplicas realizadas se encuentran en el **apartado 5H** en Anexos.

Para el extracto del patrón de AgNPs se obtuvieron dos picos, uno a 7,84 min y otro a 8,51 min. Los cromatogramas de las dos réplicas se muestran en las siguientes **figuras 9-10**.

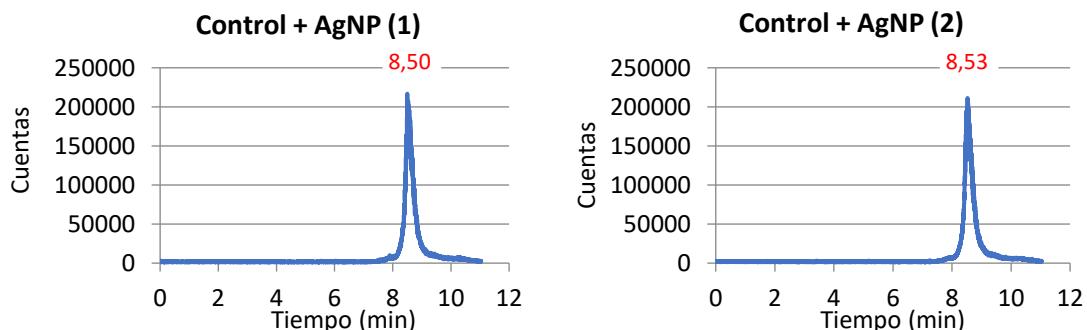


Figuras 9-10: Cromatogramas obtenidos para el patrón de AgNPs (20nm)

Estos dos picos muestran que parte de las AgNPs se han transformado en Ag(I) tras el proceso de digestión. No se pueden cuantificar ya que no presentan buena resolución, pero si podemos realizar un estudio cualitativo, pues el tiempo de retención del segundo pico coincide con el del extracto de la especie Ag(I) (8,51 min) y el primer pico corresponde a las AgNPs (7,84min) que no se han transformado. Además, comparando el área de ambos picos, podemos concluir que la plata liberada tras la digestión de las AgNPs se encuentra mayoritariamente en forma de Ag (I).

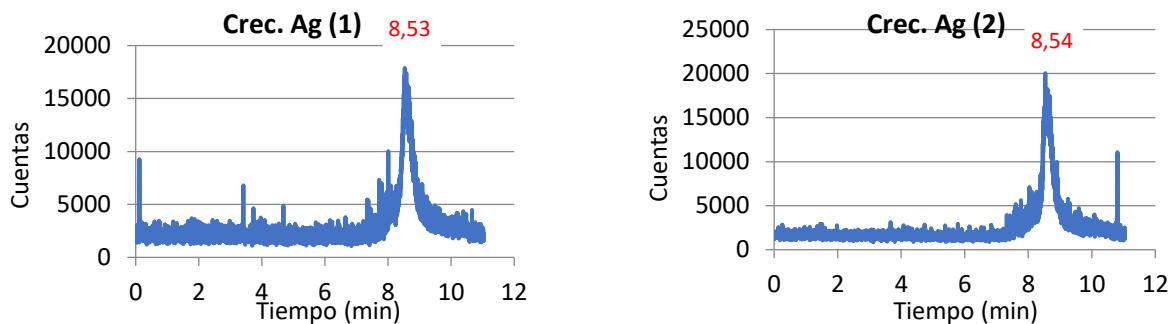
Si interpolamos el tiempo de retención obtenido para las AgNPs en la recta de calibrado de tamaños, se obtiene que las AgNPs liberadas corresponden a un tamaño de 27,24 nm con una desviación estándar relativa de 10,23%. El tamaño de las AgNPs utilizado ha sido de 20nm. La diferencia de tamaños encontrada puede ser debida a que el máximo del pico no está perfectamente definido debido a su transformación en Ag (I).

Con respecto al extracto de la muestra correspondiente al pienso crecimiento control + AgNPs, se muestran a continuación en las **figuras 11-12** los cromatogramas obtenidos. En este caso ya no se aprecian los 2 picos como en el patrón de AgNPs sin matriz, de manera que podemos concluir que todas las AgNPs han sido disueltas y después del proceso de digestión solo se ha liberado Ag(I). Observamos nuevamente como la matriz de pienso influye en la transformación de AgNPs en Ag(I).



Figuras 11-12: Cromatogramas obtenidos para las muestras de adición control + AgNPs

Para la muestra de pienso crecimiento Ag se muestra en las **figuras 12-13** el cromatograma obtenido. Podemos concluir que el pico obtenido corresponde a la especie Ag(I) ya que los tiempos de retención coinciden. De manera que, tras las 2 fases de digestión del pienso Crecimiento Ag, la especie que se libera es Ag(I). Como ya se ha indicado las posibles AgNPs presentes en el pienso se transforman en Ag (I).



Figuras 12-13: Cromatogramas obtenidos para las muestras de pienso Crecimiento Ag

Como se ha visto por HDC-ICP-MS que sólo se libera Ag(I), se han comparado los % de liberación obtenidos por HDC-ICP-MS con los totales obtenidos por ICP-MS en el apartado anterior. Los resultados se muestran en la **Figura 14**.

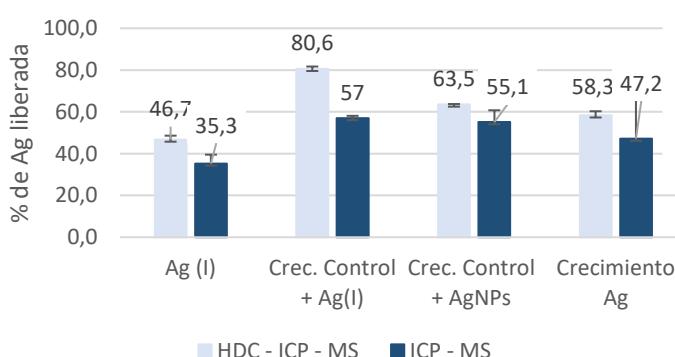


Figura 14: Porcentajes de liberación de Ag obtenidos tras el proceso de digestión “in vitro” mediante HDC – ICP – MS e ICP – MS

Como se puede observar los resultados son muy similares, exceptuando para la muestra de adición de Ag (I) al pienso crecimiento control. Por otro lado, también se observa como para el pienso Crecimiento Ag los resultados son más reproducibles mediante HDC – ICP – MS. El patrón del porcentaje de liberación en las muestras se repite por ambas determinaciones.

4.6.- DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE Ag TOTAL EN DISTINTOS TIPOS DE TEJIDOS DE POLLO

Los resultados obtenidos para un total de 10 muestras que había sido alimentadas con pienso Crecimiento Ag durante 3 semanas y se sacrificaron después de esas 3 semanas se muestran en la siguiente tabla 10:

Muestra	Concentración de Ag obtenida
Músculo	0,065 ± 0,04
Hígado	0,590 ± 0,23

Tabla 10: Concentraciones obtenidas para las muestras de tejidos

Se observa cómo, a diferencia de en el hígado, en el músculo apenas hay plata retenida.

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se obtienen con este trabajo son:

- Se ha llevado a cabo la determinación de Ag total en 2 muestras de pienso (control y crecimiento Ag) mediante ataque ácido en microondas y determinación por ICP-MS obteniéndose unas concentraciones de 0,0810 y 16,0 mg/Kg respectivamente.
- Se ha estudiado la cantidad de Ag liberada a partir del pienso crecimiento Ag en agua ultrapura y se ha visto que está en el rango del 1%-3% aumentando ligeramente con el tiempo de

agitación. Se ha observado que la matriz del pienso estabiliza las especies de Ag evitando que se liberen al medio acuoso. Si se realiza una etapa de centrifugación para separar el sobrenadante del sólido tras la lixiviación se reduce la liberación de Ag al medio acuoso probablemente porque queda precipitada en la fase sólida

- Se ha realizado un estudio para determinar la cantidad de plata total liberada a partir de las muestras de pienso en un proceso de digestión *in vitro* y se ha obtenido que en la fase gástrica se libera muy poca Ag al medio y en la fase intestinal los porcentajes de liberación son superiores (30,9% y 47,2% respectivamente). Realizando el proceso de digestión “*in vitro*” para las muestras de pienso control con adición de patrones de Ag (I) y AgNPs, los porcentajes de liberación son mayores para la adición de Ag(I) que para la adición de AgNPs. Las AgNPs se quedan retenidas en la matriz de pienso y no se liberan.
- Mediante el acoplamiento HDC – ICP – MS se ha podido determinar el tipo las especies liberadas en la segunda etapa de la digestión “*in vitro*” a partir del pienso crecimiento plata y se ha visto que la especie liberada es Ag (I). Además, se ha demostrado que durante el proceso de digestión *in vitro* las AgNPs se transforman a Ag(I) por el proceso de digestión “*in vitro*” en sí y esto se ve favorecido por la presencia de la matriz del pienso.
- Se ha estudiado la acumulación de Ag en tejidos de músculo e hígado de pollo y se ha visto que en músculo apenas hay acumulación siendo mayor en el hígado.

6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) L. Verde, A. L. P. Europeo, A. L. Comité, E. Y. Social, and E. Y. Al. Segunda revisión de la normativa sobre los nanomateriales. Comunicación de la comisión al parlamento europeo, al consejo y al comité económico y social europeo. **2012**, 1
- (2) Alonso-Núñez, G. Nanoquímica: Ingeniería de Nanomateriales. *Mundo Nano Rev. Interdiscip. En Nanociencias Nanotecnología* **2008**, 1 (1), 45
- (3) Abad-Álvaro, I.; Trujillo, C.; Bolea, E.; Laborda, F.; Fondevila, M.; Latorre, M. A.; Castillo, J. R. Silver Nanoparticles-Clays Nanocomposites as Feed Additives: Characterization of Silver Species Released during *in Vitro* Digestions. Effects on Silver Retention in Pigs. *Microchem. J.* **2019**, 149
- (4) Ahmadi, F. Pakistan Veterinary Journal Impact of Different Levels of Silver Nanoparticles (Ag-NPs) on Performance, Oxidative Enzymes, and Blood Parameters in Broiler Chicks. *Pak. Vet. J.* **2012**, 32.
- (5) Elechiguerra, J.; Burt, J. L.; Morones, J. R.; Camacho-Bragado, A.; Gao, X.; Lara, H. H.; Yacaman, M. Interaction o f Silver nanoparticles with HIV - I . *J. Nanobiotechnology* **2005**, 3 (1), 6.
- (6) Hashim, A. A. *Advances in Nanocomposite Technology*; BoD – Books on Demand, Rijeka, Croatia, **2011**.
- (7) Gangadoo, S.; Stanley, D.; Hughes, R. J.; Moore, R. J.; Chapman, J. Nanoparticles in Feed: Progress and Prospects in Poultry Research. *Trends Food Sci. Technol.* **2016**, 58, 115
- (8) Abdolahpur Monikh, F.; Chupani, L.; Vijver, M. G.; Vancová, M.; Peijnenburg, W. J. G. M. Analytical Approaches for Characterizing and Quantifying Engineered Nanoparticles in Biological Matrices from an (Eco)Toxicological Perspective: Old Challenges, New Methods and Techniques. *Sci. Total Environ.* **2019**, 660, 1283
- (9) de la Calle, I.; Menta, M.; Klein, M.; Séby, F. Study of the Presence of Micro- and Nanoparticles in Drinks and Foods by Multiple Analytical Techniques. *Food Chem.* **2018**, 266, 133
- (10) Laborda, F.; Bolea, E.; Cepriá, G., Gómez, M.T.; Jiménez M.S.; Pérez-Arantegui, J.; Castillo, J.R. Detection, characterization and quantification of inorganic Engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples. *Analytica Chimica Acta*, **2016**, vol. 904, 10
- (11) Sara Lopez-Sanz; Francisco J. Guzman Bernardo _ a; Rosa C. Rodríguez Martín-Doimeadios a; Angel Ríos. Analytical Metrology for Nanomaterials: Present Achievements and Future Challenges. *Anal. Chim. Acta* **2019**, 1059, 1
- (12) Wang, L.; Yan, L.; Liu, J.; Chen, C.; Zhao, Y. Quantification of Nanomaterial/Nanomedicine Trafficking in Vivo. *Anal. Chem.* **2017**, 90.

- (13) Karimi, M. A.; Mohammadi, S. Z.; Mohadesi, A.; Hatefi-Mehrjardi, A.; Mazloum-Ardakani, M.; Sotudehnia Korani, L.; Askarpour Kabir, A. Determination of Silver(I) by Flame Atomic Absorption Spectrometry after Separation/Preconcentration Using Modified Magnetite Nanoparticles. *Sci. Iran.* **2011**, *18* (3), 790
- (14) Wu, H. Z.; Meng, L. F. flame atomic absorption spectrometry determination of silver nanoparticles in environmental waters using dispersive liquidliquid microextraction. *Appl. Ecol. Environ. Res.* **2018**, *16* (5), 5705
- (15) Francisco Laborda; Ana C. Gimenez - Inglaturre; Eduardo Bolea; Juan R. Castillo. Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry as Screening Tool for Detection of Particles. *Spectrochim. Acta Part BAtomic Spectrosc.* **2019**, *159* (UNSP 105654).
- (16) Jenkins, S. V.; Qu, H.; Mudalige, T.; Ingle, T. M.; Wang, R.; Wang, F.; Howard, P. C.; Chen, J.; Zhang, Y. Rapid Determination of Plasmonic Nanoparticle Agglomeration Status in Blood. *Biomaterials* **2015**, *51*, 226
- (17) Verleysen, E.; Van Doren, E.; Waegeneers, N.; De Temmerman, P.-J.; Abi Daoud Francisco, M.; Mast, J. TEM and SP-ICP-MS Analysis of the Release of Silver Nanoparticles from Decoration of Pastry. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63* (13), 3570
- (18) Jiménez, M. S.; Bakir, M.; Isábal, D.; Gómez, M. T.; Pérez-Arantegui, J.; Castillo, J. R.; Laborda, F. Evaluation of Hydrodynamic Chromatography Coupled to Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Speciation of Dissolved and Nanoparticulate Gold and Silver. *Anal. Bioanal. Chem.* **2021**, *413* (6), 1689
- (19) Pergantis, S. A.; Jones-Lepp, T. L.; Heithmar, E. M. Hydrodynamic Chromatography Online with Single Particle-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Ultratrace Detection of Metal-Containing Nanoparticles. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (15), 6454
- (20) Rakcheev, D.; Philippe, A.; Schaumann, G. E. Hydrodynamic Chromatography Coupled with Single Particle-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Investigating Nanoparticles Agglomerates. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (22), 10643
- (21) Gan, J.; Sun, J.; Chang, X.; Li, W.; Li, J.; Niu, S.; Kong, L.; Zhang, T.; Wu, T.; Tang, M.; Xue, Y. Biodistribution and Organ Oxidative Damage Following 28 Days Oral Administration of Nanosilver with/without Coating in Mice. *J. Appl. Toxicol.* **2020**, *40* (6), 815
- (22) Xue, Y.; Zhang, S.; Huang, Y.; Zhang, T.; Liu, X.; Hu, Y.; Zhang, Z.; Tang, M. Acute Toxic Effects and Gender-Related Biokinetics of Silver Nanoparticles Following an Intravenous Injection in Mice. *J. Appl. Toxicol.* **2012**, *32* (11), 890
- (23) Cueva, C.; Gil-Sánchez, I.; Tamargo, A.; Miralles, B.; Crespo, J.; Bartolomé, B.; Moreno-Arribas, M. V. Gastrointestinal Digestion of Food-Use Silver Nanoparticles in the Dynamic SIMulator of the GastroIntestinal Tract (Simgi®). Impact on Human Gut Microbiota. *Food Chem. Toxicol.* **2019**, *132*
- (24) Gerondi F.; Zezzi Arruda M. Thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry for determination of silver in biological materials, *Talanta*, **2012**, *97*, 395
- (25) Lai, Y.; Dong, L.; Zhou, H.; Yan, B.; Chen, Y.; Cai, Y.; Liu, J. Coexposed Nanoparticulate Ag Alleviates the Acute Toxicity Induced by Ionic Ag+ in Vivo. *Sci. Total Environ.* **2020**, *723*, 138050.
- (26) de la Calle, I.; Menta, M.; Klein, M.; Séby, F. Study of the Presence of Micro- and Nanoparticles in Drinks and Foods by Multiple Analytical Techniques. *Food Chem.* **2018**, *266*, 133
- (27) Veveková, L.; Hradilová, Š.; Milde, D.; Panáček, A.; Skopalová, J.; Kvítek, L.; Petrželová, K.; Zbořil, R. Accurate Determination of Silver Nanoparticles in Animal Tissues by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **2014**, *102*, 7
- (28) Daskalakis, K. D.; O'Connor, T. P.; Crecelius, E. A. Evaluation of Digestion Procedures for Determining Silver in Mussels and Oysters. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31* (8), 2303
- (29) Gonzalez R, Food digestion: trends in vitrodigestion models, *Revista doctorado UMH*, **2016**, *2* (2), 5
- (30) Ramos, K.; Ramos, L.; Gómez-Gómez, M. M. Simultaneous Characterisation of Silver Nanoparticles and Determination of Dissolved Silver in Chicken Meat Subjected to in Vitro Human Gastrointestinal Digestion Using Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Food Chem.* **2017**, *221*, 822
- (31) Boisen, S.; Fernández, J. A. Prediction of the Total Tract Digestibility of Energy in Feedstuffs and Pig Diets by in Vitro Analyses. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1997**, *68* (3), 277
- (32) Yegani, M.; Swift, M. L.; Zijlstra, R. T.; Korver, D. R. Prediction of Energetic Value of Wheat and Triticale in Broiler Chicks: A Chick Bioassay and an in Vitro Digestibility Technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2013**, *183* (1–2), 40
- (33) Maturral, J. D.; Forte, C. R. Valoración de la calidad nutritiva y microbiológica de tres específicos de alimentos balanceados para aves utilizadas en la experimentación. *Agrociencia - Sitio En Repar.* **2007**, *0* (0), 123

- (34) Park, E.-J.; Bae, E.; Yi, J.; Kim, Y.; Choi, K.; Lee, S. H.; Yoon, J.; Lee, B. C.; Park, K. Repeated-Dose Toxicity and Inflammatory Responses in Mice by Oral Administration of Silver Nanoparticles. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2010**, *30* (2), 162