TESIS DE LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

2024 456

Ana Cristina Giménez Ingalaturre

Detección de (bio)partículas individuales mediante ICP-MS: actividad bactericida de las especies de plata

Director/es
Laborda García, Francisco Carlos
Abad Álvaro, Isabel

http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis

ISSN 2254-7606

Prensas de la Universidad Universidad Zaragoza

Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Universidad Zaragoza
1542

Tesis Doctoral

DETECCIÓN DE (BIO)PARTÍCULAS INDIVIDUALES MEDIANTE ICP-MS: ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LAS ESPECIES DE PLATA

Autor

Ana Cristina Giménez Ingalaturre

Director/es

Laborda García, Francisco Carlos
Abad Álvaro, Isabel

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Ciencia Analítica en Química

2023

Repositorio de la Universidad de Zaragoza – Zaguan http://zaguan.unizar.es

GRUPO DE ESPECTROSCOPÍA ANALÍTICA Y SENSORES
INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AMBIENTALES DE ARAGÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

DETECCIÓN DE (BIO)PARTÍCULAS INDIVIDUALES MEDIANTE ICP-MS: ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LAS ESPECIES DE PLATA

ANA CRISTINA GIMÉNEZ INGALATURRE

TESIS DOCTORAL 2023

Este trabajo ha sido realizado con cargo a los proyectos:

- Contrato predoctoral por la subvención destinada a la contratación de personal investigador predoctoral en formación para el período 2017 - 2021 cofinanciadas con el Programa Operativo FSE Aragón 2014 – 2020, por la Diputación General de Aragón.

- "OUTBIOTICS. Tecnologías innovadoras para diagnóstico, prevención y eliminación de contaminantes emergentes (antibióticos) de las aguas del territorio POCTEFA" (EFA 183/16). Programa Interreg V-A España/Francia/Andorra-POCTEFA 2014-2020 Fondos FEDER.

- "Nano/micro-metrología analítica: innovaciones en metodología analítica para sistemas (bio)particulados" (RTI2018-096111-B-I00) por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional.

- Grupo de referencia "Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores" (E29_20R) por el Departamento de Ciencia, Universidad y Sociedad del Conocimiento del Gobierno de Aragón.

- "Etiquetado de partículas individuales: nuevas estrategias de análisis para la detección de (bio)partículas" (PID2021-123203OB-100) por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional.

Distintas partes de esta Tesis Doctoral se han realizado en colaboración con:

Servicios de Análisis Químico, de Microscopía Electrónica de Materiales, de Microscopía electrónica de sistemas biológicos y de Microscopía Óptica e Imagen del Servicio General de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Zaragoza

Grupo de investigación Agua y Salud Ambiental de la Universidad de Zaragoza

Departamento de Análisis Inorgánico del UK National Measurement Laboratory (NML) perteneciente a LGC en Reino Unido

Grupo de investigación Platón de la Universidad de Zaragoza

Laboratorios Enosan S.L.

Llegó el final de esta maravillosa etapa de mi vida y quiero agradecer a cada una de las personas que me han apoyado y acompañado a lo largo de este tiempo.

A mis directores de tesis, Francisco Laborda e Isabel Abad por todo el trabajo y tiempo dedicado. Paco, gracias por dirigirme y apoyarme durante estos años, por sacar siempre tiempo para resolver cualquier duda o problema a pesar de tu apretada agenda. Gracias por transmitirme tanto conocimiento, sin tu dedicación este trabajo no hubiera sido tan fácil. Isabel, llegaste en el momento perfecto para ayudarme y aconsejarme, en aquellos meses en los que la vida parecía volverse un caos y los que, finalmente, han sido los meses más difíciles de la tesis. Gracias por tu empatía y por tu apoyo constante, no sabes la tranquilidad que me has transmitido, sobre todo en los peores momentos.

A mi primer director de tesis, el Profesor Juan Ramón Castillo, quien me dio la oportunidad de formar parte del GEAS. Me hubiera gustado poder agradecerle todo el apoyo y consejos dados a lo largo de estos años, por sus experiencias compartidas en los largos cafés en la hemeroteca y por el gran conocimiento que transmitía. Siempre te recordaré y te estaré agradecida por todo ello.

A la Profesora Pilar Goñi, por darme la oportunidad y todas las facilidades necesarias para trabajar en su laboratorio. Gracias por introducirme en el mundo de la microbiología y por transmitirme tu conocimiento y tu pasión por el mundo micro. He aprendido mucho contigo durante este tiempo. Gracias por tu cariño y por nuestras charlas en tu despacho.

A mis compañeros de laboratorio, con los que hemos pasado tantos buenos ratos de "cortos" cafés, chismorreos, viajes, historias y hasta telenovelas personalizadas. A Celia, mi tándem de trabajo policial, por todas las tardes de cháchara que nos hemos pegado en el laboratorio y por aquellos primeros viajes de "Chorbos y estrés fetal". Cómo olvidar nuestro gran hotel de Frankfurt con sus lucecitas de colores. A Mariam, por tu generosidad y por tu paciencia cuando nos metíamos contigo (siempre con cariño). Espero que haya cambiado esa imagen que tenías de mí en la carrera, donde me mirabas mal porque siempre estaba "calladita y sin molestar". A Khaoula, por darle ese toque de locura a nuestros días y traernos "salseo" a los cafés. Por esos abrazos llenos de serotonina que, aunque me cueste reconocer, eran gratificantes. A Dea, nuestra mami del laboratorio, por traernos esa alegría cubana. Tendremos que ir a visitarte a Barcelona, sin esas prisas con las que venías a Zaragoza para las revisiones del ojo. A David, mi fiel compañero de aventuras en Reino Unido, ¡la de cosas que compartimos esos meses! Desde aquel inolvidable paseo por la bahía de Cardiff (¡Masacra!) viendo a nuestra amiga recurrente, la Inmensidad, hasta aquel rinconcito de paz con vistas al mar en Portsmouth. Espero que ya no te despiertes en

medio de la noche, entre sudores fríos, pensando en la frase que nos acompañó durante aquellos meses: "Y entonces, ¿dónde vamos este finde?" Aquellos meses por Teddington no hubieran sido lo mismo sin ti.

A aquellos compañeros temporales que nos visitaron durante unos meses y con los que compartimos buenos momentos, tanto dentro como fuera del laboratorio: Bianca, Sebastiano, Laura, Vanesa.

A todos los profesores del GEAS, por su ayuda y consejos prestados a lo largo de estos años. A Eduardo, por amenizarnos los cafés con tus bromas y tus aromas a canela. A Sierra y Teresa, la pareja perfecta para compartir momentos de diversión. La de momentos difíciles de olvidar que hemos pasado en congresos. A Josefina, siempre dispuesta a ayudar. Las sesiones de microscopía que nos hemos pegado buscando plata en bacterias que no se dejaban ver. A Gemma, por el buen humor que contagiaba en cuanto la veías aparecer por el laboratorio.

A las chicas del Servicio de Análisis, Ana, Teresa y especialmente, a Maite. Siempre dispuestas a encender el ICP viejo cuando comenzaba mi andadura en esta tesis y a ayudarme con cualquier problema surgido. Gracias por los ánimos en aquellas largas sesiones de medida con el ICP en las que parecía que las medidas no acababan.

A la Profesora Encarna Rubio, por tu dedicación, por tu esfuerzo y por tus ánimos en los momentos que necesitaba tu ayuda. A Patricia Chueca, por tu ayuda y tu trabajo constante a lo largo de mis estancias en microbiología.

A la Dr. Heidi Goenaga-Infante, por darme la oportunidad de realizar mi estancia de investigación en Teddington y las facilidades necesarias para trabajar en los laboratorios del LGC. Y a todos los integrantes del grupo de Análisis Inorgánico, especialmente a Kharmen Billimoria, por su ayuda constante y por su disponibilidad para que la estancia fuera lo más productiva posible.

Y en último lugar, a mi mayor apoyo, sin los que nada de esto hubiera sido posible. A mis padres, por haberme dado la oportunidad de llegar hasta donde he llegado, siempre con vuestro respaldo, vuestros ánimos y consejos. Gracias por estar siempre ahí y por impulsarme hacia delante. A mis abuelos, por su apoyo y por todo lo que han hecho por mí a lo largo de la vida. Y a Iván, por saber aguantarme, por su paciencia y su cariño, sobre todo en estos últimos momentos de la tesis en los que la desesperación se apoderaba de mí.

A mis padres

RESUMEN

El incremento del número y tipos de resistencias a antimicrobianos es uno de los mayores retos de salud pública a nivel mundial y una amenaza para mantener la eficacia de muchos de los antibióticos usados hoy en día. Las nanopartículas metálicas pueden ser una alternativa a estos antibióticos, ya que, al no unirse a receptores específicos de las bacterias, se dificulta que éstas desarrollen resistencias a las nanopartículas. En este sentido, la combinación de nanopartículas metálicas con antibióticos convencionales es una estrategia que aprovecha estas ventajas, así como la aparición de efectos sinérgicos antibiótico-nanomaterial.

La selección adecuada de los nanomateriales utilizados como antimicrobianos implica conocer las transformaciones físicas y químicas que experimentan en su interacción con los microorganismos, con especial atención a las formas químicas en las que se encuentran y actúan sobre los mismos. En este contexto surge la necesidad del desarrollo de estrategias innovadoras basadas en métodos analíticos que permitan la detección, caracterización y cuantificación de nanopartículas en los ensayos microbiológicos y en los propios microrganismos. Debido a la complejidad de las muestras, estas estrategias implican el uso de varios métodos analíticos complementarios. En esta Tesis Doctoral se ha desarrollado y aplicado una plataforma analítica basada en espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) para obtener información sobre la identificación y cuantificación de nanopartículas de plata y especies derivadas de las mismas en cultivos microbiológicos. Para ello, previamente se ha desarrollado un enfoque armonizado en relación con la detección de partículas individuales en ICP-MS (SP-ICP-MS). Asimismo, se ha evaluado y validado la técnica de SP-ICP-MS como método de *screening* para la detección de nanopartículas y se ha aplicado a la detección de partículas metálicas en muestras alimentarias. Además, se ha desarrollado una estrategia que permite evaluar la validez de la información cuantitativa obtenida mediante SP-ICP-MS, validándose a través de su aplicación en el análisis de muestras complejas.

El modo de análisis de partículas individuales mediante ICP-MS puede aplicarse tanto a partículas de naturaleza inorgánica u orgánica como a distintos tipos de biopartículas (células, bacterias, microalgas, levaduras), denominándose en este último caso detección de células individuales (SC-ICP-MS). La metodología y estrategias desarrolladas en SP-ICP-MS se han aplicado en SC-ICP-MS haciendo uso de sistemas de introducción de muestra específicos para el análisis de biopartículas. La validez de la información obtenida mediante SC-ICP-MS se ha evaluado mediante una estrategia análoga a la aplicada en SP-ICP-MS.

Estas técnicas analíticas basadas en el uso de ICP-MS en combinación con técnicas complementarias como cromatografía hidrodinámica (HDC) y microscopía electrónica, se han aplicado a la detección y cuantificación de plata en cultivos de bacterias *E. coli* incubadas con plata iónica, nanopartículas de plata, antibióticos convencionales y distintas combinaciones de antibiótico-plata. Se han determinado especies de plata en los medios de cultivo y en los microrganismos, así como la biodistribución de la plata en estos últimos. A partir de la información obtenida mediante SP-ICP-MS, SC-ICP-MS, HDC-ICP-MS, microscopía electrónica y la determinación de los efectos bactericidas de la plata (I) y de las nanopartículas de plata, así como de los efectos sinérgicos tras su combinación con un antibiótico convencional, se han justificado los posibles mecanismos de la actividad bactericida individual y sinérgica de estos antimicrobianos.

SUMMARY

The increase in number and types of antimicrobial resistance is one of the greatest public health challenges worldwide and a threat to the preservation of the effectiveness of many of the antibiotics used today. Metallic nanoparticles could be an alternative to these antibiotics, since they do not bind to any specific receptor of the bacteria, making it difficult for them to develop resistance to nanoparticles. In this sense, the combination of metallic nanoparticles with conventional antibiotics is a strategy that benefits not only from this advantage, but also from the likely appearance of antibiotic-nanomaterial synergistic effects.

The appropriate selection of nanomaterials used as antimicrobials implies knowing the physical and chemical transformations they undergo in their interaction with microorganisms, with special attention to the chemical forms in which they are found and act on them. In this context, there is a need for the development of innovative strategies based on the use of analytical methods that allow the detection, characterization and quantification of nanoparticles in microbiological assays and in the microorganisms themselves. Due to the complexity of the samples, these strategies involve the use of several complementary analytical methods. In this PhD Thesis, an analytical platform based on the use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) has been developed and applied in order to obtain information about the detection and quantification of silver nanoparticles and derived species in microbiological cultures. For this purpose, a harmonized approach related to single particle detection by ICP-MS (SP-ICP-MS) has been firstly developed. Likewise, SP-ICP-MS has been evaluated and validated as a screening method for the detection of nanoparticles and it has been further applied to the detection of metallic nanoparticles in food samples. In addition, a strategy to assess the validity of the quantitative information obtained by SP-ICP-MS has been developed and validated through its application in the analysis of complex samples.

Single particle mode detection by ICP-MS can be applied both to inorganic and organic particles and to different types of bioparticles (cells, bacteria, microalgae, yeasts), the latter being referred to as single cell detection (SC-ICP-MS). The methodology and strategies developed in SP-ICP-MS have been applied in SC-ICP-MS using specific sample introduction systems for the analysis of bioparticles. The validity of the information obtained by SC-ICP-MS has been assessed using an analogous strategy to the one applied in SP-ICP-MS.

These analytical techniques based on the use of ICP-MS, in combination with complementary techniques such as hydrodynamic chromatography (HDC) and electron microscopy have been applied to the detection and quantification of silver in *E. coli* bacteria cultures incubated with ionic silver, silver nanoparticles, conventional antibiotics and different antibiotic-silver combinations. Silver species in culture media and microorganisms, as well as silver biodistribution in the latter ones, have been determined. Based on the information obtained by SP-ICP-MS, SC-ICP-MS, HDC-ICP-MS, electron microscopy and the determination of the bactericidal effects of silver (I) and silver nanoparticles, as well as the synergistic effects after combination with a conventional antibiotic, the possible mechanisms of the individual and synergistic bactericidal activity of these antimicrobials have been justified.

GLOSARIO DE ACRÓNIMOS

GLOSARIO DE ACRÓNIMOS

AFM	Microscopía de fuerza atómica
ATP	Adenosín trifosfato
AOB	Medio de bacterias oxidantes de amonio
Bacillus subtilis	*Bacillus sp.*
BEC	Concentración equivalente de fondo
BHI	Caldo de infusión de cerebro y corazón
BPEI	Polietilenimina ramificada
CBF	Concentración bactericida fraccional
CBM	Concentración bactericida mínima
CDC	Centros para el Control y Prevención de Enfermedades
CFU	Unidades formadoras de colonias
CIF	Concentración inhibitoria fraccional
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
CV	Coeficiente de variación
DMF	D*ynamic mass Flow* - flujos de masa dinámicos
E. coli	*Escherichia coli*
EAA	Espectrometría de absorción atómica
EDS	Espectroscopía de energía dispersiva de rayos-X
FESEM	Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo
FN	Falso negativo
FP	Falso positivo
GA	Goma arábiga
GF-AAS	Espectrometría de absorción atómica con vaporización electrotérmica

HAADF/STEM	Microscopía electrónica de transmisión de barrido en modo campo oscuro anular de gran ángulo
HDC-ICP-MS	Cromatografía hidrodinámica acoplada a ICP-MS
ICP	Plasma de acoplamiento inductivo
ICP-MS	Espectrometría de masas con fuente de ionización de plasma de acoplamiento inductivo
ICP-OES	Espectrometría de emisión óptica con fuente de ionización de plasma de acoplamiento inductivo
KED	Discriminación de energía cinética
LB	Medio Luria-Bertani
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LPS	Lipopolisacáridos
MH	Medio Mueller-Hinton
MHA	Ácido mercaptohexanoico
MPA	Ácido mercaptopropiónico
MPS	Ácido sulfónico mercaptopropiónico
OMS	Organización Mundial de la Salud
P. aeruginosa	*Pseudomonas aeruginosa*
PA	Penicilamina
PB	Tampón fosfato
PBP	Proteínas de unión a la penicilina
PBS	Tampón fosfato salino
PEG	Polietilenglicol
PEGSH	Tiol de polietilenglicol metil-éter
PG	Penicilina G
PVP	Polivinilpirrolidona
RMN	Resonancia magnética nuclear

ROS	Especies reactivas de oxígeno
SC-ICP-MS	Detección de células individuales mediante ICP-MS
SC-TOF-ICP-MS	Detección de células individuales con tiempo de vuelo-ICP-MS
SDBS	Dodecilbencensulfonato sódico
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SFE	Suero fisiológico estéril
SP-ICP-MS	Detección individual de partículas mediante ICP-MS
Staphylococcus aureus	*S. aureus*
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TMAH	Hidróxido de tetrametilamonio
TOF	Tiempo de vuelo
TOF-ICP-MS	Tiempo de vuelo-ICP-MS
U	Unidades de carga
UV-visible	Espectrometría de absorción molecular ultravioleta-visible
VN	Verdadero negativo
VP	Verdadero positivo

GLOSARIO DE SÍMBOLOS

GLOSARIO DE SÍMBOLOS

A	Abundancia isotópica
b	Sensibilidad analítica
ΣCBF	Índice CBF
ΣCIF	Índice CIF
d	Diámetro de partícula
$D1$	Factor de dilución 1
$D2$	Factor de dilución 2
F_P	Fracción en masa del elemento en la partícula
k	Coeficiente umbral
K_d	Sensibilidad analítica obtenida de una calibración de tamaño
K_{ICPMS}	Factor de eficiencia de detección
K_{intro}	Factor de introducción de muestra
K_m	Sensibilidad analítica obtenida de una calibración en masa por partícula
K_M	Factor del elemento medido
K_N	Sensibilidad analítica obtenida de una calibración en concentración en número
K_R	Sensibilidad analítica de ICP-MS (pendiente de una calibración de intensidades en cps en función de la concentración en masa del elemento
LOD_{dis}	Límite de detección de concentración en masa del elemento disuelto
LOD_{masa}	Límite de detección de concentración en masa por partícula
$LOD_{número}$	Límite de detección de concentración en número
$LOD_{tamaño}$	Límite de detección de tamaño
m	Número de lecturas de la línea base
M_M	Masa atómica del elemento M
m_P	Masa del elemento por partícula
N_{Av}	Número de Avogadro

p	Valor p o valor de probabilidad
PSD_{min}	Tamaño mínimo de la distribución de tamaño de partícula
$Q_{muestra}$	Caudal de introducción de muestra
$RSD_{\bar{B}}$	Desviación estándar relativa
S	Señal neta ($Y - Y_B$)
S_C	Valor crítico neto de señal
$S_{C,N}$	Valor crítico para la detección de partículas
S_D	Valor mínimo detectable neto
$S_{\bar{D}}$	Intensidad neta promedio de una línea base
S_P	Intensidad neta de una partícula detectada
S_{Pi}	Intensidad neta individual registrada a lo largo de un evento de partícula transitorio
S_{Pmax}	Intensidad neta máxima de un evento de partícula transitorio
t_{dwell}	Tiempo de lectura
t_i	Tiempo de adquisición de datos
w	Anchura de la base de un evento de partícula transitorio en términos de tiempo
X	Concentración
X_C	Límite de decisión o valor critico de concentración
X_C^{dis}	Valor crítico de concentración en masa del elemento disuelto
X_C^{masa}	Valor crítico de concentración en masa
$X_C^{número}$	Valor crítico de concentración en número
$X_C^{tamaño}$	Valor crítico de tamaño
X^D	Concentración en masa de un elemento disuelto
X_D	Límite de detección
X_D^{dis}	Límite de detección de concentración en masa del elemento disuelto
X_D^{masa}	Límite de detección de concentración en masa
$X_D^{número}$	Límite de detección de concentración en número
$X_D^{tamaño}$	Límite de detección de tamaño

X^M	Masa correspondiente a un elemento M
X^N	Concentración en número de partículas
Y	Intensidad bruta
Y_B	Intensidad promedio de la línea base de un blanco
ΣY_B	Número total de cuentas de la línea base de un blanco registradas durante un tiempo de adquisición t_i
$Y_{Bblanco}$	Intensidad promedio de la línea base del blanco
Y_{Bsusp}	Intensidad promedio de la línea base de la suspensión
Y_C	Valor crítico
$Y_{C,N}$	Valor crítico para la detección de partículas
Y_D	Valor mínimo detectable
$Y_{\bar{D}}$	Intensidad bruta promedio de la línea base
Y_N	Número de partículas detectadas
$Y_{N,B}$	Número promedio de eventos detectados en el blanco
$Y_{Nsusp(1)}$	Número de eventos de partícula de la suspensión 1
$Y_{Nsusp(2)}$	Número de eventos de partícula de la suspensión 2
Y_R	Señal bruta de ICP-MS expresada en unidades de cuentas por minuto
$Y_{R,B}$	Intensidad promedio de la línea base de un blanco expresada en tasa de conteo
$z_{(1-\alpha)}$	Cuantil (1-α) de una distribución normal estándar
$z_{(1-\beta)}$	Cuantil (1-β) de una distribución normal estándar
α	Probabilidad de falsos positivos
β	Probabilidad de falsos negativos
ε	Término de seguridad del valor crítico
η_{neb}	Rendimiento de nebulización
ξ	Coeficiente del ruido de parpadeo
η	Viscosidad dinámica
ν	Viscosidad cinemática
ρ	Densidad de la partícula
σ	Desviación estándar

σ_B	Desviación estándar de la señal del blanco Y_B
$\sigma_{\bar{B}}$	Desviación estándar de la intensidad promedio de las líneas base de blancos
σ_D	Desviación estándar del valor mínimo detectable Y_D
$\sigma_{N,B}$	Desviación estándar del número de eventos de partículas en el blanco $Y_{N,B}$
σ_t	Ruido total

ÍNDICE

I. Introducción 1

1. Nanomateriales y nanociencia 3

1.1. Nanomateriales 3

1.2. Nanomedicina 4

2. Métodos microbiológicos para el estudio de la actividad bactericida de antimicrobianos 7

3. Técnicas analíticas para el análisis de nanomateriales 13

3.1. Métodos de preparación de muestras 16

3.2. Métodos basados en ICP-MS 17

II. Objetivos 21

III. Experimental 27

1. DETECCIÓN DE PARTÍCULAS INDIVIDUALES MEDIANTE ICP-MS 29

1.1. Detectabilidad y límites de detección 31

1.1.1. Introducción 31

1.1.1.1. Fundamentos teóricos de SP-ICP-MS 31

1.1.1.2. Tratamiento de señales en SP-ICP-MS 32

1.1.1.3. Revisión del concepto de valor crítico y límite de detección 36

1.1.2. Experimental 41

1.1.2.1. Instrumentación 41

1.1.2.2. Estándares y reactivos 42

1.1.2.3. Procesamiento de datos de SP-ICP-MS 43

1.1.3. Resultados y discusión 44

1.1.3.1. Discriminación de eventos de partículas/línea base 44

1.1.3.1.1. Tiempos de lectura de milisegundos 46

1.1.3.1.2. Tiempos de lectura de microsegundos 51

1.1.3.2. Valores críticos y límites de detección 54

1.1.3.2.1. Valores críticos y límites de detección en masa por partícula y tamaño 54
1.1.3.2.2. Valores críticos y límites de detección de concentración en número de partículas 58
1.1.3.2.3. Valores críticos y límites de detección de concentración en masa de elemento disuelto 60
1.1.3.2.4. Sumario de expresiones de cálculo 61
1.1.3.2.5. Límites de detección estimados para SP-ICP-MS 63
1.1.4. Conclusiones 67

1.2. SP-ICP-MS como método de *screening* **69**
1.2.1. Introducción 69
1.2.2. Experimental 70
1.2.2.1. Instrumentación 70
1.2.2.2. Estándares y reactivos 70
1.2.2.3. Muestras 70
1.2.2.4. Procedimientos 71
1.2.2.4.1. Liberación de partículas a partir de perlas de decoración 71
1.2.2.4.2. Análisis de materiales pulverulentos para decoración 71
1.2.2.4.3. Procesamiento de datos de SP-ICP-MS 72
1.2.3. Resultados y discusión 72
1.2.3.1. Discriminación de eventos de partículas/línea base y detección de partículas 72
1.2.3.2. Valores críticos de tamaño y concentración en número 74
1.2.3.3. Validación del método 75
1.2.3.4. Aplicación de SP-ICP-MS como método de *screening* 78
1.2.4. Conclusiones 80

1.3. Validez de la información obtenida por SP-ICP-MS **83**
1.3.1. Introducción 83
1.3.2. Experimental 84
1.3.2.1. Instrumentación 84
1.3.2.2. Estándares y reactivos 84
1.3.2.3. Muestras 84

1.3.2.4. Procesamiento de datos de SP-ICP-MS 85
1.3.3. Resultados y discusión 85
1.3.3.1. Efecto del valor crítico de tamaño en las distribuciones de tamaño 85
1.3.3.2. Procedimiento para determinar la validez de la información de SP-ICP-MS 88
1.3.3.3. Pruebas de concepto del procedimiento 92
1.3.3.4. Aplicación del procedimiento en nanomateriales bactericidas 95
1.3.4. Conclusiones 97

2. DETECCIÓN DE CÉLULAS INDIVIDUALES MEDIANTE ICP-MS 99
2.1. Introducción 101
2.2. Experimental 108
2.2.1. Instrumentación 108
2.2.2. Estándares y reactivos 110
2.2.3. Cepas bacterianas 111
2.2.4. Muestras de cultivos bacterianos con plata 112
2.2.5. Procedimientos 112
2.2.5.1. Preparación de muestras 112
2.2.5.2. Determinación de los contenidos totales de plata mediante digestión ácida 113
2.2.5.3. Análisis semicuantitativo de los elementos endógenos en bacterias mediante digestión con microondas 114
2.2.5.4. Detección, caracterización y cuantificación de plata y zinc en bacterias mediante SC-ICP-MS 114
2.3. Resultados y discusión 115
2.3.1. Evaluación de los sistemas de introducción de muestra en SC-ICP-MS 115
2.3.2. Aplicación de los sistemas de introducción en el análisis de biopartículas 119
2.3.2.1. Detección de plata en bacterias por SC-ICP-MS 120
2.3.2.2. Validez de la información obtenida mediante SC-ICP-MS 125
2.3.3. Selección de elementos endógenos en bacterias como marcadores en SC-ICP-MS 129

2.3.3.1. Identificación de elementos endógenos de bacterias 130
2.3.3.2. Detección de zinc en bacterias por SC-ICP-MS 132
2.4. Conclusiones 135

3. ESTUDIO DEL EFECTO BACTERICIDA DE LAS ESPECIES DE PLATA Y ANTIBIÓTICOS 137
3.1. Efecto bactericida de las especies de plata 139
3.1.1. Introducción 139
3.1.2. Experimental 148
3.1.2.1. Instrumentación 148
3.1.2.2. Estándares y reactivos 150
3.1.2.3. Cepas bacterianas 151
3.1.2.4. Muestras de cultivos bacterianos con plata 151
3.1.2.5. Procedimientos 152
3.1.2.5.1. Preparación de las muestras 152
3.1.2.5.2. Preparación de los medios de cultivo 153
3.1.2.5.3. Ensayos cualitativos de viabilidad 154
3.1.2.5.4. Análisis estadístico 154
3.1.2.5.5. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM) 155
3.1.2.5.6. Caracterización de las nanopartículas en los medios de cultivo mediante dispersión de luz dinámica (DLS) 156
3.1.2.5.7. Digestión ácida 156
3.1.2.5.8. Digestión alcalina con TMAH 156
3.1.2.5.9. Detección de partículas individuales mediante ICP-MS 157
3.1.2.5.10. Separación y detección de nanopartículas de plata y plata disuelta mediante HDC-ICP-MS 158
3.1.2.5.11. Detección, caracterización y cuantificación de plata en bacterias mediante SC-ICP-MS 158
3.1.3. Resultados y discusión 159
3.1.3.1. Optimización de la composición de los medios de cultivo 159
3.1.3.1.1. Influencia de la composición del medio de cultivo en el tamaño de las nanopartículas: uso de surfactantes 160

3.1.3.1.2. Efecto de la composición del medio de cultivo en la viabilidad bacteriana 165
3.1.3.2. Estudio de las especies de plata durante el proceso de incubación 166
3.1.3.3. Evaluación de la actividad bactericida de la plata (I) y de las nanopartículas de plata 169
3.1.3.4. Determinación de la concentración de plata total en las bacterias mediante digestión alcalina y digestión ácida 171
3.1.3.5. Estudio del efecto bactericida de la plata (I) y de las nanopartículas de plata 174
3.1.3.5.1. Detección de plata mediante SC-ICP-MS 174
3.1.3.5.2. Detección de nanopartículas de plata en bacterias tras digestión alcalina mediante SP-ICP-MS 178
3.1.3.5.3. Detección de nanopartículas de plata en bacterias tras digestión alcalina mediante HDC-ICP-MS 180
3.1.3.5.4. Mecanismos de acción asociados a la actividad bactericida de los nanomateriales de plata 182
3.1.4. Conclusiones 194

3.2. Efecto bactericida de las especies de plata en combinación con antibióticos convencionales 197
3.2.1. Introducción 197
3.2.2. Experimental 205
3.2.2.1. Instrumentación 205
3.2.2.2. Estándares y reactivos 205
3.2.2.3. Cepas bacterianas 206
3.2.2.4. Muestras de cultivos bacterianos con plata y/o antibióticos 206
3.2.2.5. Procedimientos 207
3.2.2.5.1. Preparación de las muestras 207
3.2.2.5.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y de la concentración bactericida mínima (CBM) 207
3.2.2.5.3. Determinación de la actividad bactericida de las combinaciones de antimicrobianos 208

3.2.2.5.4. Determinación de los contenidos totales de Ag mediante digestión ácida 211
3.2.2.5.5. Determinación de los contenidos de plata intracelular mediante digestión enzimática 212
3.2.2.5.6. Detección y cuantificación de plata en bacterias mediante SC-ICP-MS 213
3.2.2.5.7. Observación de los esferoplastos mediante microscopio óptico 213
3.2.2.5.8. Detección de posibles alteraciones estructurales de las bacterias mediante SEM y TEM 213
3.2.3. Resultados y discusión 214
3.2.3.1. Evaluación de la actividad bactericida individual de materiales de plata y antibióticos convencionales: apramicina y penicilina G 214
3.2.3.2. Evaluación de la actividad bactericida de las combinaciones antibiótico convencional - plata e identificación de efectos sinérgicos 220
3.2.3.2.1. Método de difusión 220
3.2.3.2.2. Método del tablero 224
3.2.3.3. Identificación y cuantificación de la plata involucrada en la actividad bactericida de las combinaciones antibiótico convencional - material de plata 229
3.2.3.3.1. Detección y cuantificación de plata en bacterias mediante SC-ICP-MS 230
3.2.3.3.2. Detección y cuantificación de la plata intracelular en bacterias 236
3.2.3.3.3. Detección de posibles alteraciones estructurales de las bacterias mediante SEM y TEM 244
3.2.3.4. Estudio de los mecanismos de acción de las combinaciones antibiótico convencional – plata 247
3.2.4. Conclusiones 251

IV. Conclusiones 253

V. Bibliografía **263**

VI. Anexos **309**

A1. Detección de partículas individuales mediante ICP-MS **311**

A1.1. Validación del método de SP-ICP-MS como método de *screening* 311

A1.2. Efecto del valor crítico de tamaño en las distribuciones de tamaño 314

A1.3. Aplicación del procedimiento en nanomateriales bactericidas 315

A2. Detección de células individuales mediante ICP-MS **317**

A2.1. Optimización de los parámetros instrumentales para la detección de zinc en SC-ICP-MS 317

A3. Estudio del efecto bactericida de las especies de plata y antibióticos **325**

A3.1. Optimización de la composición de los medios de cultivo 325

A3.2. Determinación de la concentración de plata total en las bacterias mediante digestión alcalina 327

A3.3. Evaluación de la actividad bactericida de las combinaciones antibiótico convencional - plata e identificación de efectos sinérgicos. Método de difusión 330

A3.4. Evaluación de la actividad bactericida de las combinaciones antibiótico convencional - plata e identificación de efectos sinérgicos. Método del tablero 332

A.4. Publicaciones **361**

I. INTRODUCCIÓN

1. NANOMATERIALES Y NANOCIENCIA

1.1. NANOMATERIALES

Los nanomateriales se han convertido en el foco de una amplia investigación y posterior desarrollo y producción industrial como consecuencia de las propiedades novedosas y únicas, en términos de conductividad, propiedades mecánicas, magnéticas, ópticas y catalíticas, que surgen al nivel de la nanoescala debido a su mayor área superficial. De acuerdo con la Recomendación de la Comisión Europea, adoptada en 2011 y revisada recientemente en 2022, se definió "nanomaterial" como "un material natural, accidental o fabricado, constituido por partículas sólidas que están presentes individualmente o como partículas constituyentes identificables en agregados o aglomerados, y en el que el 50% o más de estas partículas en la granulometría numérica cumple al menos una de las condiciones siguientes: a) una o más dimensiones externas de la partícula se hallan en el intervalo de tamaños comprendido de 1 a 100 nm; b) la partícula tiene forma alargada, como la de una varilla, una fibra o un tubo, y dos de sus dimensiones externas son inferiores a 1 nm, mientras que la otra dimensión es superior a 100 nm; y c) la partícula tiene forma de placa, y una de sus dimensiones externas es inferior a 1 nm, mientras que las otras dimensiones son superiores a 100 nm. Para determinar la granulometría numérica, no será necesario tener en cuenta las partículas con al menos dos dimensiones externas ortogonales superiores a 100 μm. No obstante, los materiales con una superficie específica por unidad de volumen < 6 m^2/cm^3 no serán considerados nanomateriales" [1].

Hoy en día, los nanomateriales son valiosos materiales para aplicaciones en medicina (diagnóstico, administración de fármacos, ingeniería de tejidos), el medio ambiente (descontaminación, tratamiento de aguas), alimentación (aditivos, envases), productos de consumo (cosméticos, textiles), energía (aditivos para combustibles, pilas de combustible, células solares), información y comunicación (sensores, almacenamiento de datos) o construcción (revestimientos superficiales, hormigón, aleaciones) [2]. El uso masivo de estos nanomateriales está provocando un aumento de la exposición de la población humana y su liberación en el medio ambiente [3]. Aunque la nanociencia y la nanotecnología están en continuo crecimiento desde hace más de dos décadas, en la actualidad la mayoría de los riesgos y efectos potenciales de los nanomateriales no se conocen totalmente todavía, a pesar de la extensa investigación que se está llevando a cabo.

En este contexto surge la necesidad del desarrollo de estrategias basadas en métodos analíticos que permitan la detección, caracterización y cuantificación de

nanopartículas en sistemas biológicos y medioambientales, con el objetivo de determinar la posible liberación o transformación que puedan sufrir los nanomateriales en esos medios, así como para evaluar sus riesgos toxicológicos y ecotoxicológicos de una manera fiable, con el fin de desarrollar normativas y regulaciones sobre el uso de nanomateriales y garantizar su uso sostenible [4–6].

1.2. NANOMEDICINA

Los avances en nanotecnología aplicada al área médica han creado una rama denominada nanomedicina, la cual se ha orientado principalmente al desarrollo de nanopartículas, nanoestructuras y nanodispositivos para la detección temprana y el tratamiento de enfermedades neoplásicas, cardiovasculares, autoinmunes e infecciosas. Como resultado, la nanomedicina se está aplicando en cuatro grandes áreas: el nanodiagnóstico, la nanoterapia, la prevención y la nanomedicina regenerativa [7,8]. La nanomedicina se ha empleado en aplicaciones de diagnóstico, biomarcadores, etiquetado celular, agentes de contraste para imágenes biológicas, sistemas de administración de fármacos y nano-fármacos para el tratamiento de diversas enfermedades como el cáncer [9,10].

A pesar de la actual era de tecnologías avanzadas, las enfermedades infecciosas se encuentran entre las primeras causas de muerte. El principal inconveniente de los agentes antimicrobianos convencionales es el desarrollo de resistencias múltiples a los fármacos [11]. La resistencia a antimicrobianos es uno de los mayores retos de salud pública a nivel mundial y es considerada una de las diez principales amenazas sanitarias por la Organización Mundial de la Salud (OMS) [12,13]. Esta resistencia surge cuando las bacterias, los virus, los hongos y los parásitos evolucionan a lo largo del tiempo y dejan de responder a los medicamentos, lo que hace más difícil el tratamiento de las infecciones e incrementa el riesgo de propagación de enfermedades, de aparición de formas graves de enfermedades e incluso de muerte. El principal factor que determina la aparición de patógenos farmacorresistentes es el uso indebido y excesivo de los antimicrobianos. Además, la falta de agua limpia y saneamiento, así como la prevención y control inadecuados de las infecciones fomentan la propagación de microbios, algunos de los cuales pueden hacerse resistentes a los tratamientos existentes [14].

El primer caso de resistencia bacteriana se remonta a 1967 cuando se notificó en Australia la presencia de *Streptococcus pneumoniae* resistente a la penicilina. En 1995, se confirmó en Estados Unidos que el 23,6% de las bacterias *Streptococcus pneumoniae* aisladas eran resistentes a la penicilina; y en el año 2000, esta cifra

alcanzó el 85% [15]. Hasta la fecha, la resistencia no se limita a una determinada cepa bacteriana ni se opone a un antibiótico específico. Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades registraron que más de un 70% de todas las bacterias que causan enfermedades podrían resistir al menos a uno de los principales agentes antimicrobianos utilizados actualmente en medicina [16,17], mientras que la OMS determinó que aproximadamente el 79% de las bacterias han desarrollado resistencia a uno o más antibióticos [18]. Cada año, en Estados Unidos, se atribuyen más de 2 millones de casos de enfermedades y 23.000 muertes a esta resistencia a antibióticos y se espera que estas cifras aumenten con los años [19]. De forma similar, se calcula que cada año mueren cerca de 25.000 personas en Europa y 700.000 en todo el mundo debido a las infecciones de bacterias resistentes [20,21]. Además del incremento de la mortalidad, otro impacto negativo de la resistencia a los antibióticos para la economía de los países es el incremento en los costes médicos y la prolongación de las estancias hospitalarias [22].

La solución ideal al problema de la resistencia a antimicrobianos sería el desarrollo de nuevas clases de antibióticos. Sin embargo, el desarrollo de nuevos antibióticos suele llevar décadas, lo que hace imposible detener a corto plazo el problema de las resistencias. Por otro lado, la línea de desarrollo clínico de nuevos antibióticos se considera prácticamente agotada. En 2019, la OMS identificó 32 antibióticos en fase de desarrollo clínico contra la lista OMS de patógenos prioritarios, de los que solo seis se clasificaron como innovadores [14]. Por tanto, es necesario desarrollar antimicrobianos alternativos que sean económicos y eficaces.

Algunos metales como plata, cobre, zinc y magnesio han sido tradicionalmente utilizados para tratar enfermedades, mucho antes de la revolución farmacéutica de los antibióticos. Además, no existe una única estrategia de adaptación bacteriana que pueda proporcionarles una resistencia universal a estos metales, lo que sugiere que, si un metal antimicrobiano fallara, otros antibióticos basados en metales podrían sustituirlo [23,24]. La nanotecnología proporciona una buena plataforma para modificar y controlar las propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales metálicos para producir agentes antimicrobianos eficaces sin que resulten tóxicos para el ser humano [25,26]. En los últimos años se están investigado nuevas clases de antimicrobianos basados en nanopartículas por sus propiedades antimicrobianas [11,27–29], entre las que destacan nanopartículas de óxido de hierro, óxido de zinc, óxido de cobre, dióxido de titanio, plata, oro, óxido de grafeno o grafeno reducido [11,30–32], demostrándose su eficacia en estudios *in vitro* e *in vivo* [11]. Se denomina nanoantibiótico a aquel nanomaterial que muestra actividad antimicrobiana por sí mismo o aumenta la eficacia y seguridad de la administración de antibióticos [11].

Teniendo en cuenta esto, las nanopartículas metálicas antimicrobianas podrían ser la solución a la problemática resistencia antimicrobiana a la que se enfrenta la sociedad actualmente. Una de las ventajas de las nanopartículas es que, al igual que los metales, no se unen a receptores específicos de las bacterias y esto complica el desarrollo de resistencia por parte de las bacterias, ampliando a su vez el espectro de acción de las nanopartículas [30]. La desventaja de trasladar los nanoantibióticos al uso clínico es la dificultad de una evaluación exhaustiva de las interacciones de los nanoantibióticos con las células, tejidos y órganos, que permita recalibrar las dosis e identificar las vías de administración adecuadas para obtener los efectos terapéuticos deseados. Asimismo, también es necesario un conocimiento profundo de su toxicidad potencial [11].

2. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE ANTIMICROBIANOS

La actividad bactericida de los antimicrobianos se evalúa mediante métodos que estudian la sensibilidad a los mismos. Para ello, existen métodos de difusión en disco (Kirby-Bauer) como los antibiogramas, métodos de difusión de tiras con gradiente de concentración (método del Épsilon-test), métodos de dilución como la determinación de la concentración inhibitoria mínima y la concentración bactericida mínima y curvas de muerte o de letalidad [33–36]. Los ensayos de sensibilidad deben estar convenientemente normalizados y sujetos a procesos de control que aseguren su reproducibilidad; sin embargo, en la actualidad no existe un método universal que reproduzca las condiciones en las que se encuentra un microorganismo produciendo una infección y, por tanto, la situación ideal en las que deben desarrollarse las pruebas de sensibilidad.

El método de los antibiogramas (Figura 1) es un método cualitativo que permite clasificar a un microorganismo como sensible o resistente. Se basa en la medición de un halo que aparece alrededor de la muestra como consecuencia de la inhibición del crecimiento del microorganismo debido a la presencia del antimicrobiano. Un mayor halo de inhibición indica una mayor susceptibilidad de las bacterias ante el antibiótico estudiado. La ventaja de este método es la posibilidad de evaluar múltiples antibióticos y concentraciones a la vez frente a uno o varios microorganismos. Sin embargo, la utilización de la técnica dependerá siempre de la difusión del agente en el medio [33,35].

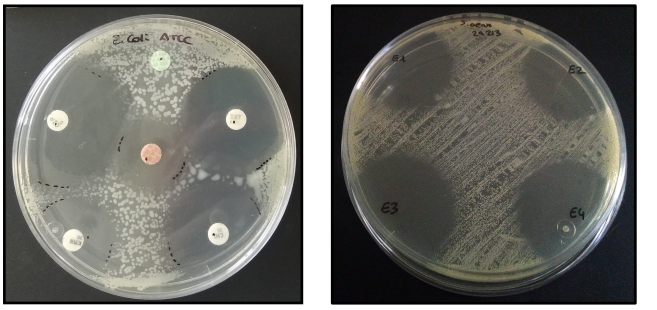


Figura 1. *Método de difusión (antibiograma) para evaluar la sensibilidad a los antimicrobianos.*

El método del Épsilon-test es una expansión del método de los antibiogramas y permite determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM). Este método está basado en la utilización de unas tiras de ensayo con un gradiente continuo de concentraciones de antimicrobianos sobre la superficie del agar. En este caso aparece una zona de inhibición elipsoidal y simétrica. La CIM corresponde con aquella concentración en la que el extremo de la zona de inhibición intersecciona con la tira [33,35].

Los métodos de dilución son métodos cuantitativos que permiten determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM) [33–36]. Se basa en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones decrecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar) dentro de los distintos pocillos de una placa microtituladora o una placa Petri, respectivamente. El inconveniente de estos métodos es la gran cantidad de variables dependientes del microorganismo, del medio de cultivo o del inóculo, las cuales producen oscilaciones en el resultado finalmente obtenido, por lo que es necesario su estandarización. La CIM se define como la menor concentración de antimicrobiano que, a simple vista, inhibe completamente el crecimiento del microorganismo y corresponde con la ausencia de turbidez en los pocillos de una placa microtituladora (Figura 2.a). Por tanto, la CIM está relacionada con los efectos inhibitorios o bacteriostáticos de los antimicrobianos, es decir, con aquellos efectos que inhiben transitoriamente el crecimiento de las bacterias, sin producir su muerte. La CBM se define como la concentración del agente bactericida necesaria para matar el 99,9% de la población microbiana y corresponde con la ausencia de crecimiento bacteriano en la placa Petri. En la Figura 2.b se observa como en la primera placa Petri no hay crecimiento bacteriano debido a la alta concentración de antimicrobiano, mientras que en las dos siguientes placas aumenta el crecimiento bacteriano conforme disminuye la concentración de antimicrobiano. Por tanto, la CBM está relacionada con la acción bactericida de los antimicrobianos, es decir, con aquellos efectos que producen la muerte de las bacterias [37]. Existen numerosos estudios en los que se estudia la actividad bactericida de la plata frente a distintos microorganismos mediante estos métodos microbiológicos [38–40].

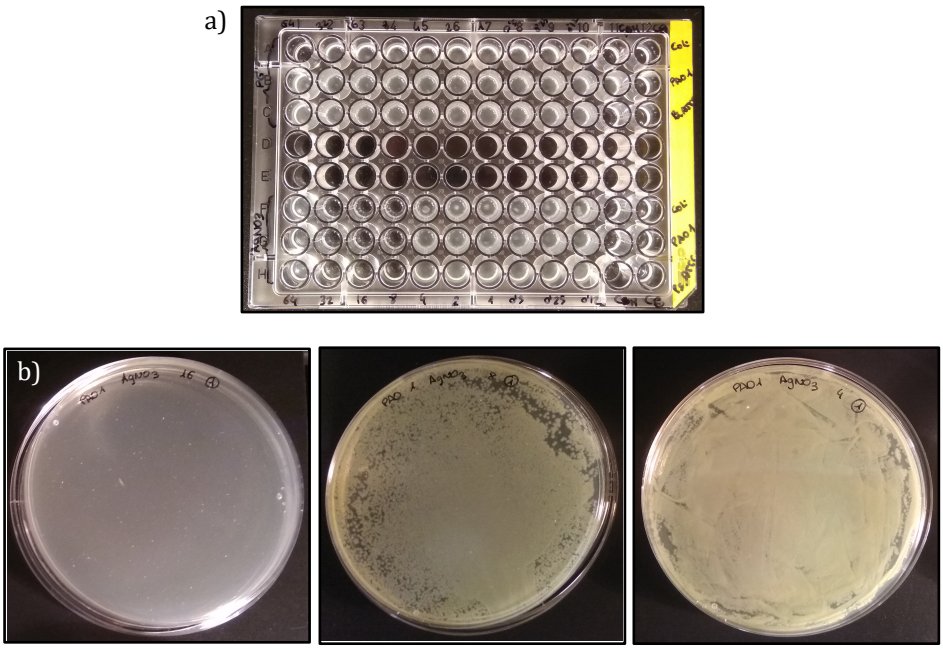


Figura 2. *Método de dilución para evaluar la capacidad bactericida de los antimicrobianos: determinación de la a) CIM y b) CBM.*

El método de las curvas de muerte o letalidad es un método cinético de determinación de la actividad bactericida y se utiliza para determinar el tiempo que tarda un antimicrobiano a una concentración determinada a producir la muerte de un microorganismo. Este método se utiliza principalmente en investigación de nuevos antimicrobianos y para confirmar los efectos paradójico, de persistencia o de tolerancia. La limitación de esta técnica es que no está normalizada, es muy laboriosa y suele ser poco reproducible [35,36].

Existen situaciones en las que los microorganismos son resistentes a ciertos antimicrobianos y la combinación de dos antimicrobianos permite ampliar el espectro de estos compuestos o mejorar la actividad bactericida de los mismos. En estos casos se debe determinar la actividad bactericida combinada de los dos antimicrobianos y esta actividad combinada se puede determinar mediante varios métodos clásicos: difusión en disco, método del tablero, método de tiras con gradiente de concentración (método del Épsilon-test) y curvas de muerte o de letalidad. La mayoría de estos métodos están adaptados de los utilizados en la determinación de la actividad individual de los antimicrobianos. Además, existen otros métodos como los farmacocinéticos o métodos nuevos basados en microfluídica, calorimetría o citometría de flujo, los cuales se usan con el fin de

aumentar la automatización y el rendimiento [41]. Los efectos de la actividad combinada de dos antimicrobianos pueden ser [33,35,36]:

- Sinergia: la actividad de los dos antimicrobianos es significativamente mayor que la adición de las actividades de los dos antimicrobianos separados.

- Indiferencia: la actividad de los dos antimicrobianos no difiere de la actividad del más efectivo en solitario.

- Antagonismo: la actividad de los dos antimicrobianos juntos es significativamente menor que la suma de las actividades de los dos antimicrobianos separados.

El método de difusión en disco es un método cualitativo que está basado en la misma técnica que los antibiogramas y consiste en la medición del área de la zona de inhibición de crecimiento bacteriano alrededor del antimicrobiano. La sinergia aparece cuando se observa un aumento o un puente entre las dos zonas de inhibición. Los efectos antagónicos aparecen cuando se observa un truncamiento de las zonas cercanas a la unión de las dos zonas de inhibición individuales. La indiferencia ocurre cuando no se observa ningún cambio en las zonas de inhibición individuales [36,42,43]. En la Figura 3 se muestran los posibles efectos combinados. Este método se ha utilizado en varios estudios con nanopartículas de plata de distintos tamaños y diferentes antibióticos [44–49].

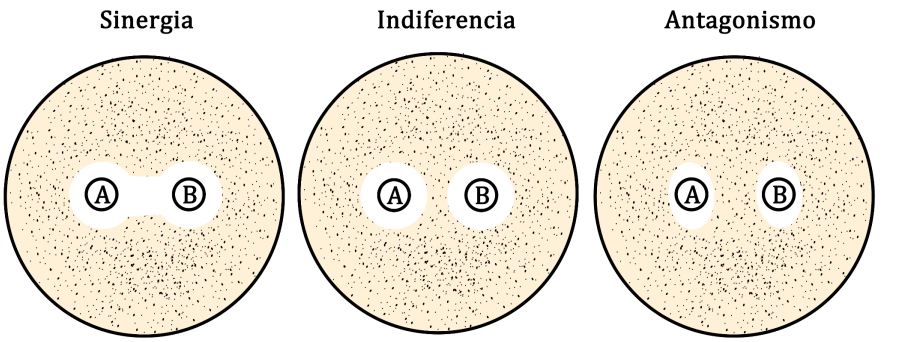


Figura 3. *Evaluación de actividad bactericida combinada de dos antimicrobianos (A y B) mediante el método de difusión en disco. Áreas punteadas: crecimiento bacteriano. Áreas blancas: inhibición de crecimiento bacteriano.*

El método del tablero debe su nombre a la placa microtituladora de 96 pocillos que se utiliza y donde se realizan múltiples diluciones de los antimicrobianos, en concentraciones superiores o inferiores a la CIM de cada uno de ellos, frente al microorganismo a estudiar. En la placa, uno de los antimicrobianos se coloca en el eje X, mientras que el otro antimicrobiano se coloca en el eje Y, ambos en concentraciones decrecientes. Así, cada pocillo tiene una combinación única de los dos agentes antimicrobianos que se están estudiando. Este método proporciona más información sobre las interacciones entre los antimicrobianos y permite estudiar diferentes concentraciones de antimicrobianos simultáneamente. Al igual que ocurre con la determinación de la CIM y CBM, con este método se puede determinar el índice de la concentración inhibitoria fraccional (ΣCIF) y el índice de la concentración bactericida fraccional (ΣCBF) de cada combinación. El índice CIF permite determinar los efectos bacteriostáticos combinados, es decir, aquellos que inhiben transitoriamente el crecimiento de las bacterias, sin producir la muerte; mientras que el índice CBF determina los efectos bactericidas combinados, es decir, aquellos que producen la muerte de las bacterias [36,42,43,50]. Este método se ha utilizado en numerosos estudios con plata o nanopartículas de plata y antibióticos [51–60].

El método con tiras de gradiente de concentración (método del Épsilon-test) está basado en los fundamentos comentados previamente para la determinación de la actividad individual de los antimicrobianos. En este caso, se utilizan dos tiras de ensayo que pueden colocarse cruzadas en ángulo recto o colocar durante un tiempo determinado la tira de uno de los antimicrobianos y transcurrido ese tiempo, retirar esa tira, colocar la del segundo antimicrobiano en la misma posición, y determinar las interacciones producidas por ambos antimicrobianos [41].

Las curvas de muerte o letalidad es un método muy laborioso en el que se estudian los efectos bactericidas en el tiempo de varias concentraciones combinadas de los dos antimicrobianos. Es necesario realizar las curvas de letalidad para cada uno de los antimicrobianos y otra curva en la que se añaden los dos antimicrobianos combinados [36]. Debido a esta limitación, este método es el menos utilizado de los métodos tradicionales [44,56,57,61].

3. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL ANÁLISIS DE NANOMATERIALES

La capacidad para detectar, caracterizar y/o cuantificar nanomateriales depende de distintos factores entre los que se pueden incluir la naturaleza del nanomaterial, el objetivo del análisis, la complejidad de la matriz en la que está presente y su concentración o las técnicas analíticas disponibles. En función de la complejidad de la matriz y de los niveles de concentración de las nanopartículas, se pueden distinguir diferentes escenarios [2,62], los cuales se recogen en la Figura 4.

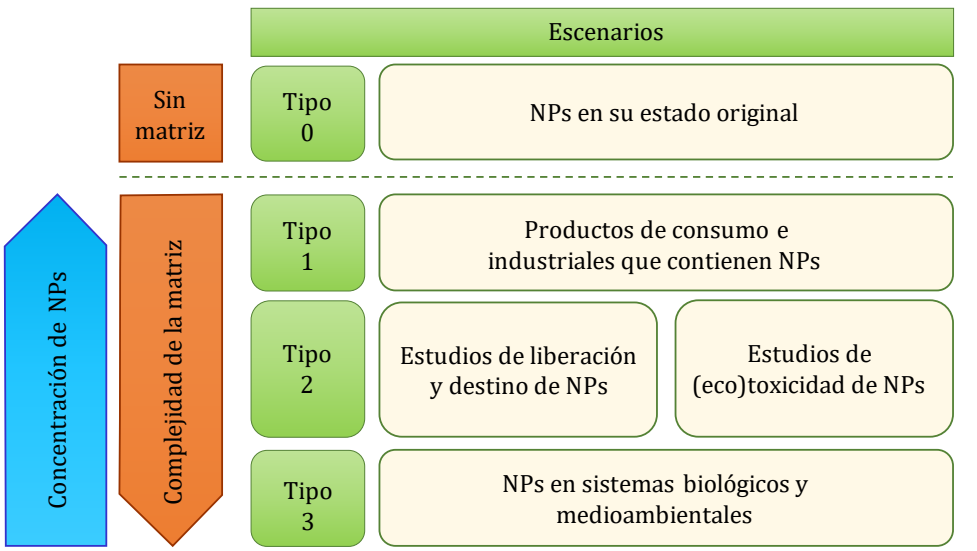


Figura 4. *Diferentes escenarios de análisis de nanomateriales en función de la complejidad de la matriz y sus niveles de concentración* [2].

El escenario 0 se corresponde con el escenario de menor complejidad e implica el análisis de nanopartículas sintetizadas en laboratorio o producidas a escala industrial, por lo que se encuentran en un estado puro y sin matrices que las contengan. El escenario 1 incluye el análisis de productos comerciales e industriales en los que se incorporan los nanomateriales, como cosméticos, textiles o aditivos alimentarios. En este caso, la matriz puede ser más o menos compleja, lo que puede dificultar su caracterización.

El escenario 2 incluye los ensayos de laboratorio que se realizan con las nanopartículas sintetizadas o los productos que contienen nanomateriales para

evaluar su liberación, destino y comportamiento (escenario 2.1), así como su (eco)toxicidad (escenario 2.2). Estos ensayos se realizan en diversas condiciones de exposición como procesos de digestión, migración en simuladores alimentarios, ensayos *in vivo* e *in vitro*, medios de cultivo biológicos… En estas condiciones, la caracterización de los nanomateriales se dificulta, ya que aumenta la complejidad de las matrices y disminuyen sus niveles de concentración. Además, los nanomateriales pueden sufrir transformaciones durante el estudio como disolución, modificaciones superficiales o procesos de agregación.

El escenario 3 es el de mayor complejidad e incluye situaciones reales relacionadas con la caracterización de los nanomateriales a lo largo de su ciclo de vida en el medio ambiente y en los organismos, incluidos los seres humanos. En estas situaciones, se espera que la concentración sea menor y que las transformaciones que puedan sufrir los nanomateriales sean mayores que en los escenarios anteriores.

El nivel de caracterización de los nanomateriales depende de la concentración, de las transformaciones que pueden sufrir en el entorno o de la complejidad de las matrices, así como de los propios métodos analíticos aplicados. Centrándonos en el campo de la nanomedicina o la nanotoxicología, la evaluación del riesgo nanotoxicológico se basa en métodos analíticos centrados en la detección, caracterización y cuantificación de los nanomateriales, así como de ensayos *in vivo* e *in vitro*. Idealmente, la caracterización de un nanomaterial debería llevarse a cabo en diferentes etapas a lo largo de su ciclo de vida, desde su diseño hasta la evaluación de su rendimiento *in vitro* e *in vivo*. La interacción con el sistema biológico y el entorno, o incluso los procedimientos de preparación o extracción de muestras y los principios fundamentales de las técnicas analíticas, podrían modificar algunas de sus propiedades e interferir en sus mecanismos de acción, así como producir transformaciones de las que será necesario identificar y cuantificar las nuevas especies formadas [7].

En cualquier caso, la caracterización de los nanomateriales implica una serie de características relevantes como el tamaño de la partícula, la distribución de tamaños, la forma, el área superficial, el estado de agregación o aglomeración, la estructura cristalina, la porosidad, la composición química, la química de la superficie, la actividad fotocatalítica, el potencial zeta, la solubilidad o la velocidad de disolución (Figura 5) [2,7]. Para obtener estas informaciones es necesario disponer de métodos analíticos con la suficiente sensibilidad y selectividad en matrices complejas. Las técnicas analíticas más comunes en el análisis de nanomateriales están basadas en microscopía electrónica, técnicas de dispersión de luz, espectrometría atómica, técnicas de separación y técnicas electroanalíticas.

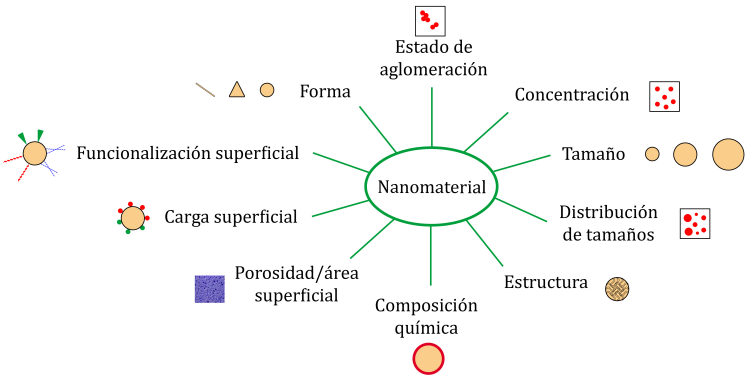


Figura 5. *Parámetros clave para la caracterización de nanomateriales.*

- *Microscopía electrónica:*

La microscopía electrónica es una de las técnicas más poderosas para el análisis de nanomateriales debido a su capacidad para visualizar nanopartículas, y por tanto, de obtener información sobre el tamaño, agregación o forma, y suele servir como técnica de apoyo para la interpretación de resultados de otras técnicas [63–66]. Esta técnica proporciona información de las partículas individuales y está basada en la aplicación de un haz de electrones. Las técnicas más comunes son la microscopía electrónica de transmisión (TEM) y de barrido (SEM); y su combinación con sistemas de detección de espectroscopía de energía dispersiva de rayos-X (EDS) permite obtener información elemental y estructural, lo que confirma la presencia de nanopartículas de un elemento determinado en su composición [2,7,62].

- *Técnicas de dispersión de luz:*

Las técnicas de dispersión de luz permiten la caracterización de tamaños de partículas en suspensión. La dispersión de luz dinámica (DLS) es la técnica más empleada y utiliza la luz dispersada de una suspensión de nanopartículas para determinar la velocidad de difusión de las mismas. El movimiento Browniano de las partículas permite que la luz se disperse en diferentes intensidades. Las fluctuaciones son dependientes del tiempo, por lo que el diámetro medido es un valor referido a cómo difunde una partícula, es decir, al diámetro hidrodinámico. DLS presenta limitaciones para la detección de las fracciones de partículas de menor tamaño en presencia de otras de diámetros superiores y para las muestras con alta polidispersidad, por lo que debe combinarse con técnicas de separación para que los resultados no resulten sesgados. Otras técnicas destacadas son la dispersión de luz multiángulo (MALS), basada en la dispersión de luz estática; y la técnica de análisis

de rastreo de nanopartículas (NTA), que es una técnica basada en el movimiento Browniano de las partículas y su seguimiento individualizado [2,7,62].

- *Espectrometría atómica:*

Las técnicas de espectrometría atómica permiten detectar y cuantificar contenidos totales de un elemento y las más utilizadas son la espectrometría de absorción atómica electrotérmica (ET-AAS), la espectroscopía atómica de emisión con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) y la espectroscopía de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS). Estas técnicas por sí mismas no son específicas para el análisis de nanomateriales, sino que deben usarse en combinación con métodos de preparación de muestra o acoplarse a otras técnicas de separación en continuo [2,62].

- *Técnicas de separación:*

Las técnicas de separación utilizadas en el análisis de nanomateriales permiten separar las partículas en función de su tamaño, recubrimiento, densidad o de su carga superficial. Estas técnicas acopladas a diferentes sistemas de detección pueden proporcionar una base sólida en la resolución de sistemas complejos que contengan nanomateriales. Las técnicas más empleadas son el fraccionamiento en flujo mediante campos (FFF), técnicas cromatográficas como cromatografía hidrodinámica (HDC) o cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) y técnicas electroforéticas como la electroforesis capilar (CE) o en gel (GE) [2,7,62].

- *Técnicas electroanalíticas:*

Las técnicas electroanalíticas son técnicas complementarias y las más utilizadas son la voltametría de partículas inmovilizadas (VIP) y la coulombimetría de colisión de partículas (PCC) [62,67].

3.1. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Además de la selección adecuada de las técnicas analíticas, una parte fundamental en el análisis de muestras es el tratamiento previo, el cual suele consistir en eliminar la matriz o separar los nanomateriales de la matriz. En el caso de muestras biológicas, uno de los métodos más utilizados es la digestión, la cual permite degradar la matriz orgánica. Existen varios tipos de procesos de digestión:

- *Digestión ácida:*

La digestión ácida implica la utilización de ácidos fuertes como ácido nítrico, solo o en combinación con peróxido de hidrógeno o HCl y de sistemas de calentamiento convencionales a presión atmosférica o bajo presión con técnicas asistidas por microondas, para conseguir la degradación de la materia orgánica. En esas condiciones ácidas, algunos nanomateriales se disuelven (plata, cobre, zinc) mientras que otros requieren de reactivos adicionales (agua regia para oro, peróxido de hidrógeno para CeO_2 o ácido fluorhídrico para TiO_2). La digestión ácida permite determinar el contenido total del elemento de interés [62].

- *Digestión alcalina:*

La digestión alcalina se suele realizar utilizando hidróxido de tetrametilamonio (TMAH), el cual causa la hidrólisis y metilación de ésteres, amidas y algunos enlaces éter, de forma que se descompone la materia orgánica [62,68]. Es una estrategia alternativa a la digestión ácida ya que mantiene la integridad de las nanopartículas, por lo que permite obtener la concentración del elemento disuelto y de las nanopartículas. En algunos casos, se puede utilizar un agente complejante que permita mantener el elemento de interés en disolución, como la cisteína [69] o el $CaCl_2$ [70] en el caso de la plata.

- *Digestión enzimática:*

La digestión enzimática es una de las estrategias más utilizadas para matrices biológicas ya que permite trabajar en condiciones menos extremas de pH y temperaturas [71,72], además de permitir la determinación de la concentración del elemento disuelto y de las nanopartículas, ya que mantiene la integridad de éstas. En función de la matriz de la muestra, se emplean diversas enzimas como pancreatinas, lipasas, proteasas o macerozima (mezcla de pectinasa, celulasa y hemilasa). Las enzimas proteasas producen la degradación de proteínas, mientras que las pectinasas producen la digestión de las paredes celulares vegetales [62].

3.2. MÉTODOS BASADOS EN ICP-MS

Debido a la complejidad de los nanomateriales como analitos, así como de las propias muestras, no existe un único método analítico capaz de caracterizar y cuantificar nanomateriales, por lo que es necesario combinar distintos métodos y técnicas para obtener la información requerida [62]. Dependiendo de la complejidad y del tipo de información demandada, pueden adoptarse distintos enfoques en

función de los objetivos. En el caso de trabajar con nanopartículas inorgánicas en muestras biológicas, el enfoque más sencillo se basa en el uso de una técnica de espectrometría atómica para detectar y cuantificar el elemento. La espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo es una de las técnicas más utilizadas debido a sus bajos límites de detección (del orden de ng L^{-1}) [73]. Sin embargo, en su forma de trabajo convencional, no es capaz de discriminar la presencia del analito entre las formas disuelta y particulada, ni proporcionar información acerca del tamaño, la forma o el estado de agregación de las partículas. La aplicación de ICP-MS en combinación con otras técnicas analíticas resulta de interés para el análisis de nanomateriales.

La combinación de ICP-MS con un procedimiento de separación previa como la ultrafiltración, ultracentrifugación o extracción en punto de nube, permite diferenciar entre las especies disueltas y las nanopartículas [62,74–77]. Por otro lado, el uso de ICP-MS como detector elemental específico, acoplado en línea a técnicas de separación como la cromatografía hidrodinámica [78] o el fraccionamiento en flujo mediante campo [79], permite obtener información sobre el tamaño de las nanopartículas separadas y la cuantificación de las fracciones separadas. Si se utiliza ICP-MS en modo de detección de partículas individuales es posible la detección, la caracterización y la cuantificación de las distintas especies (disuelta y particulada) del elemento en la muestras, mientras que el modo de detección de células individuales permite la detección de biopartículas que contienen dicho elemento y la cuantificación del elemento por biopartícula.

Con el fin de estudiar el impacto de los nanomateriales en bacterias y sus posibles transformaciones al interaccionar con los sistemas biológicos, y debido al potencial de las técnicas de SP-ICP-MS, SC-ICP-MS y HDC-ICP-MS para el análisis de nanomateriales, la Tesis Doctoral se ha centrado en la detección, caracterización y cuantificación de plata en muestras de cultivos microbiológicos mediante estas técnicas.

- *Detección de partículas individuales mediante ICP-MS*

SP-ICP-MS es una técnica basada en las diferencias en el comportamiento del analito entre sus formas disueltas y las partículas en el plasma [2,62]. Permite detectar, caracterizar y cuantificar nanopartículas, así como detectar y cuantificar formas disueltas, sin necesidad de separación previas, a niveles de concentración de ng L^{-1}. Por tanto, la información que proporciona esta técnica es concentración en número de nanopartículas en la suspensión, contenido en masa del elemento por partícula y distribución de tamaños, si se conocen la forma, composición y densidad

de las nanopartículas, además de la concentración del elemento disuelto. Los fundamentos de esta técnica se desarrollarán en el Capítulo 1 de la Tesis Doctoral.

- *Detección de células individuales mediante ICP-MS*

SP-ICP-MS puede aplicarse no sólo a partículas de naturaleza inorgánica u orgánica, sino también a distintos tipos de biopartículas (células, bacterias, microalgas, levaduras) dando lugar a la técnica de SC-ICP-MS. Esta técnica permite la detección y cuantificación del contenido de distintos elementos en células individuales y, por tanto, proporciona información sobre la concentración en número de células que contienen el analito de interés, el contenido en masa del elemento por célula y la distribución de masas del elemento por célula [80,81]. Los fundamentos de esta técnica se desarrollarán en el Capítulo 2 de la Tesis Doctoral.

- *Cromatografía hidrodinámica acoplada a ICP-MS*

HDC es una técnica de separación de cromatografía líquida en la cual, la muestra se inyecta en una columna empaquetada con esferas no porosas, formando canales de flujo. La separación se produce por el gradiente de velocidad dentro de los capilares entre las esferas. Así, las partículas más grandes son transportadas más rápidamente que las más pequeñas, ya que pasan menos tiempo cerca de los bordes de los capilares. Permite la separación simultánea del elemento disuelto y de las nanopartículas. En las columnas, las esferas deben ser inertes para minimizar las interacciones con los analitos. Estas interacciones pueden minimizarse añadiendo sales o surfactantes a la fase móvil [82].

II. OBJETIVOS

OBJETIVOS

El desarrollo e implantación de la técnica de detección de partículas individuales (*Single particle*, SP) en combinación con la espectrometría de masas con plasmas de acoplamiento inductivo como fuentes de ionización (ICP-MS) ha abierto nuevas posibilidades tanto a la técnica ICP-MS como al propio análisis de partículas. Esta técnica (SP-ICP-MS), centrada inicialmente en el análisis de partículas inorgánicas, se ha extendido al análisis individualizado de biopartículas (células, microorganismos, levaduras...), dando lugar a la técnica de detección de células individuales SC-ICP-MS. Ambas técnicas analíticas están inmersas en un proceso de consolidación que requiere disponer de una sólida base metrológica que permita su uso armonizado por parte de la comunidad científica. Por otro lado, los nanomateriales a base de plata son una alternativa al uso de antibióticos convencionales y al incremento de la resistencia a los mismos. Sin embargo, la disponibilidad de resultados sobre el efecto y los mecanismos de acción de estos nanomateriales frente a distintos patógenos es todavía escasa.

A la vista de estos antecedentes, el principal objetivo de esta Tesis Doctoral es el desarrollo y aplicación de una plataforma analítica basada en ICP-MS que permita obtener información complementaria, sobre la detección y cuantificación de nanopartículas de plata y especies derivadas de las mismas en muestras de cultivos microbiológicos. Este objetivo principal conlleva una serie de objetivos específicos, que se enumeran a continuación:

- La armonización de los aspectos metrológicos relacionados con la detectabilidad de la técnica SP-ICP-MS, su validación como técnica cualitativa de *screening* y la evaluación de sus limitaciones para proporcionar información cuantitativa.
- El desarrollo y aplicación de una metodología analítica basada en la técnica de SC-ICP-MS aplicada al análisis de cultivos microbiológicos.
- La evaluación de los efectos bactericidas de la plata iónica y de las nanopartículas de plata y de los efectos bactericidas sinérgicos tras su combinación con antibióticos convencionales.
- El desarrollo y aplicación de una plataforma analítica basada en ICP-MS que permita la detección y cuantificación directa de plata, así como la determinación de las especies de plata y su biodistribución en cultivos microbiológicos.

- La evaluación de la información resultante de estas técnicas con el fin de establecer una relación con los mecanismos de acción y de sinergia asociados a la actividad bactericida de la plata como tal y en combinación con antibióticos.

Después de una introducción general, esta memoria se ha estructurado en tres capítulos, en cada uno de los cuales se abordan los antecedentes científicos, las condiciones experimentales, los resultados y la discusión correspondiente a los objetivos específicos planteados. El primer capítulo se divide en tres subcapítulos, los cuales se centran en el desarrollo de un enfoque armonizado en relación con la detectabilidad y los distintos límites de detección en SP-ICP-MS, en la evaluación y validación de la técnica de SP-ICP-MS como método de *screening* para la detección de nanopartículas en suspensiones, y en la evaluación de la validez de la información cuantitativa obtenida mediante SP-ICP-MS. El segundo capítulo se centra en el desarrollo de una metodología analítica basada en la técnica de SC-ICP-MS que permita la identificación de biopartículas que contengan plata, junto con la cuantificación de su contenido individualizado. El tercer capítulo se divide en dos subcapítulos, los cuales se centran en la aplicación de una plataforma analítica basada en ICP-MS para la detección y cuantificación directa de plata y la determinación de su biodistribución en bacterias, así como la evaluación de los efectos bactericidas de las nanopartículas de plata, de plata iónica y de las combinaciones de plata con antibióticos convencionales. Por último, la memoria se cierra con unas conclusiones generales extraídas a partir de los resultados obtenidos a lo largo de la Tesis Doctoral.

OBJECTIVES

The development and implementation of single particle detection (SP) technique in combination with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) has opened up new possibilities for both ICP-MS and for particle analysis. This technique (SP-ICP-MS), initially focused on the analysis of inorganic particles, has been extended to the individual analysis of bioparticles (cells, microorganisms, yeasts…), leading to the single cell detection technique (SC-ICP-MS). Both analytical techniques are immersed in a consolidation process that requires a solid metrological basis for their harmonized use by the scientific community. On the other hand, silver-based nanomaterials are an alternative to the use of conventional antibiotics and the increase in resistance to them. However, the availability of results on the effect and mechanisms of action of these nanomaterials against different pathogens is still scarce.

Against this background, the main objective of this PhD Thesis is the development and application of an analytical platform based on the use of ICP-MS to obtain complementary information on the detection and quantification of silver nanoparticles and derived species in microbiological culture samples. This main objective involves different specific objectives, which are listed below:

- Harmonization of metrological criteria related to detectability in SP-ICP-MS, its validation as a qualitative screening technique and the assessment of its limitations to provide quantitative information.
- The development and application of an analytical methodology based on SC-ICP-MS technique applied to the analysis of microbiological cultures.
- The evaluation of bactericidal effects of ionic silver and silver nanoparticles, as well as the synergistic bactericidal effects after their combination with conventional antibiotics.
- The development and application of an analytical platform based on ICP-MS for the detection and direct quantification of silver, as well as for the determination of silver species and their biodistribution in microbiological cultures.
- The evaluation of the information resulting from these techniques to establish a relationship between the mechanisms of action and synergy associated with bactericidal activity of silver and in combination with antibiotics.

After a general introduction, this PhD Thesis has been structured in three different chapters, each including the scientific background, the experimental conditions, results and the discussion related to the specific objectives proposed above. The first chapter is divided into three sub-chapters, which focus on the development of a harmonized approach in relation to detectability and different limits of detection in SP-ICP-MS, the evaluation and validation of SP-ICP-MS technique as a screening method for detection of nanoparticles in suspensions, and the assessment of the validity of the quantitative information obtained by SP-ICP-MS. The second chapter focuses on the development of an analytical methodology based on SC-ICP-MS technique for the identification of bioparticles containing silver, together with the quantification of their individual content. The third chapter is divided into two sub-chapters, focused on the application of an analytical platform based on ICP-MS for the detection and direct quantification of silver and the determination of its biodistribution in bacteria, as well as the evaluation of bactericidal effects of silver nanoparticles, ionic silver and combinations of silver with conventional antibiotics. Finally, this thesis ends with some general conclusions drawn from the results obtained throughout the PhD Thesis.

III. EXPERIMENTAL

1. DETECCIÓN DE PARTÍCULAS INDIVIDUALES MEDIANTE ICP-MS

1.1. DETECTABILIDAD Y LÍMITES DE DETECCIÓN

1.1.1. INTRODUCCIÓN

La técnica de espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) es una de las principales técnicas de espectrometría atómica desarrollada originalmente para proporcionar información isotópica y de elementos totales. Sin embargo, cuando se utiliza a una frecuencia de adquisición de datos muy alta y con suspensiones suficientemente diluidas, ICP-MS se vuelve una técnica de conteo de partículas y puede proporcionar información partícula a partícula [83–85]. Aunque los orígenes de la detección de partículas individuales mediante ICP-MS (SP-ICP-MS) se remontan a finales del siglo pasado [85], un artículo fundamental de Degueldre y Favarger [86] en 2003 describió los principios de la técnica y demostró la viabilidad del uso de ICP-MS para el análisis de suspensiones coloidales. Sin embargo, ha sido la aplicación de SP-ICP-MS al análisis de nanopartículas sintéticas [87,88] y su implementación en instrumentos comerciales de ICP-MS [89–91] lo que ha impulsado su éxito en los últimos años.

SP-ICP-MS es una técnica que permite la detección y cuantificación de las formas disueltas y particuladas del elemento en la misma muestra, sin necesidad de separaciones previas, proporcionando información sobre la concentración en número y en masa (por debajo de los ng L^{-1}) y sobre su tamaño (si se dispone de información adicional sobre forma, composición y densidad de las partículas) [92].

1.1.1.1. Fundamentos teóricos de SP-ICP-MS

Las bases teóricas en las que se fundamenta la detección de partículas individuales introducidas en sistemas ICP-MS fueron descritas por Degueldre *et al*. [86] y sintetizadas por Laborda *et al*. [83,92]. Esta técnica está basada en los diferentes comportamientos en el plasma de un elemento en su forma disuelta y en su forma particulada debido a su distinta distribución en las gotas de aerosol. Las formas solubles de un elemento están distribuidas de forma homogénea en una disolución, por lo que la masa que entra al plasma y que llega al detector, en forma de iones, puede considerarse constante, y produce una señal estable durante el tiempo de análisis. Por el contrario, en una suspensión que contenga nanopartículas, el elemento no está distribuido de forma homogénea, si no que está como un grupo discreto de átomos en una pequeña fracción de gotas. Por tanto, cuando se introduce en el plasma una suspensión de nanopartículas a una concentración suficientemente

baja, cada una de las partículas será vaporizada, atomizada e ionizada, generando un paquete de iones que podrá ser detectado como un evento discreto.

Para que cada evento detectado corresponda a una partícula individual, además de necesitar suspensiones de partículas muy diluidas (< 10^8 partículas L^{-1}), se requiere utilizar una frecuencia de adquisición de datos lo suficientemente elevada (> 100 Hz). En estas condiciones, las partículas individuales serán registradas como eventos discretos sobre una línea base continua. La línea base se corresponde con la señal de fondo, constituida por las especies poliatómicas procedentes del plasma y/o la matriz, así como a la presencia de especies disueltas del elemento medido. En estas condiciones, la intensidad de cada evento es proporcional al número de átomos del elemento monitorizado en cada partícula detectada, y, por tanto, a la masa del elemento en la partícula, así como al tamaño de la partícula cuando se conocen la composición, forma y densidad de la partícula. Por otro lado, el número de eventos es directamente proporcional a la concentración en número de partículas.

Comparada con otras técnicas cuantitativas que implican relacionar una señal unidimensional con la concentración del analito, las señales de SP-ICP-MS son bidimensionales y permiten obtener información analítica en otros dominios además del habitual de la concentración en masa. Debido a que hay dos tipos de analitos (nanopartículas y especies disueltas) la información que se puede obtener es:

- Especies disueltas: concentración en masa del elemento disuelto.

- Nanopartículas: concentración en número de partículas, concentración en masa de la forma particulada, concentración en masa del elemento por partícula, tamaño de las partículas (si se conoce la forma, densidad y composición de las mismas), distribución en masa por partícula y distribución en tamaño.

1.1.1.2. Tratamiento de señales en SP-ICP-MS

En SP-ICP-MS las señales se registran como barridos de tiempo, los cuales están formados por un número de eventos de partículas sobre una línea base continua, debida a la señal de fondo, a la relación *m/z* monitorizada y/o a la presencia de formas disueltas del elemento medido (Figura 1.1.1.a)

Los barridos de tiempo pueden procesarse representando la intensidad de los eventos frente a su frecuencia, obteniéndose histogramas como el mostrado en la Figura 1.1.1.b, donde la primera distribución se debe al fondo y/o presencia de formas disueltas del elemento medido; y la segunda distribución es debida a las

propias partículas. En ocasiones, esta diferenciación puede no ser tan evidente y deben aplicarse criterios más rigurosos para la discriminación de la línea base y los eventos de partículas que, a su vez, tienen implicaciones en la capacidad de detección de la técnica. Estos criterios se estudiarán a lo largo de este capítulo.

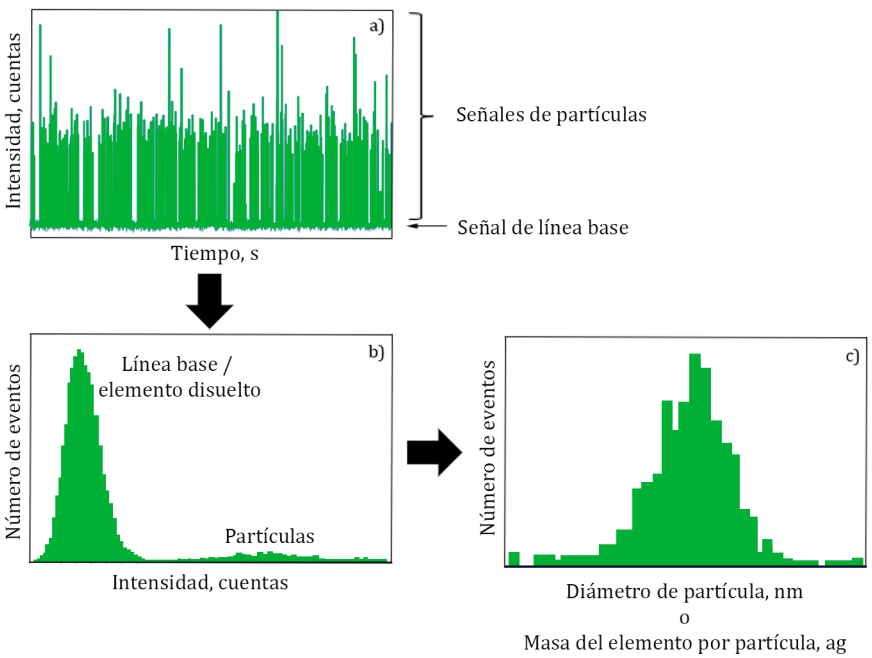


Figura 1.1.1. *a) Barridos de tiempo de una suspensión de partículas que contiene formas disueltas del elemento contenido en las partículas. b) Histograma de intensidad de los eventos procedente de los datos brutos. c) Distribuciones de tamaño de partícula o de masa del elemento por partícula obtenidas a partir de transformaciones de la distribución de las partículas del histograma de intensidad.*

Para poder obtener información analítica en masa o tamaño a partir de las señales obtenidas se requiere el uso de distintas estrategias de calibración. En la técnica de ICP-MS convencional, cuando se nebuliza una disolución de un elemento M de concentración en masa (X^M), la relación entre la señal Y_R (iones contados por unidad de tiempo) y la concentración en masa se puede expresar como [83,93,94]:

$$Y_R = K_R\, X^M = K_{intro}\, K_{ICPMS} K_M X^M \qquad (1)$$

donde K_R es la sensibilidad obtenida con una calibración convencional de una serie de estándares a través de la relación de señales de intensidad y la concentración en masa del elemento; K_{intro} ($K_{intro} = \eta_{neb} Q_{muestra}$) es un factor relacionado con la

introducción de muestra que depende del rendimiento de nebulización del analito (η_{neb}) y del caudal de introducción de muestra ($Q_{muestra}$); K_{ICPMS} es el factor de eficiencia que representa la relación entre el número de iones detectados y el de átomos introducidos en el plasma; y K_M ($K_M = AN_{Av}/M_M$) es un factor relacionado con el elemento medido, donde A es la abundancia isotópica del elemento analizado, N_{Av} el número de Avogadro y M_M es la masa atómica del elemento.

La condición básica en la que se basa SP-ICP-MS es que cada evento registrado representa una partícula individual. Si esta suposición es correcta, entonces el número de partículas detectadas (Y_N) durante un tiempo de adquisición (t_i) está directamente relacionado con la concentración en número de partículas (X^N):

$$Y_N = K_N\, X^N = K_{intro} t_i X^N = \eta_{neb} Q_{muestra} t_i X^N \qquad (2)$$

donde K_N es la sensibilidad analítica obtenida de la calibración de concentración en número (número de eventos de partículas contados frente a la concentración en número) durante un tiempo de adquisición t_i. Se asume que el rendimiento de nebulización de las especies disueltas y las partículas es el mismo ($K_N = K_{intro} t_i$), de lo contrario, el rendimiento de nebulización de partículas debe ser considerado.

Por otro lado, la intensidad neta de cada partícula detectada S_P ($S_P = Y - Y_B$), donde Y es la intensidad bruta e Y_B es la intensidad promedio de la línea base (ambos medidos en cuentas), es proporcional al número de átomos del elemento monitorizado en cada partícula detectada y, por tanto, a la masa del elemento por partícula (m_P):

$$S_P = K_m\, m_P = K_{ICPMS} K_M m_P \qquad (3)$$

donde K_m es la pendiente de la calibración de masa por partícula (intensidad neta de pico frente a masa del elemento por partícula), la cual es independiente del proceso de nebulización y dependiente del elemento, asumiendo que su rendimiento de nebulización es igual para la partícula que para el elemento disuelto. Si se conoce la composición, forma y densidad de la partícula y se asume una forma esférica, sólida y homogénea, la ecuación (3) puede expresarse como:

$$S_P = K_d\, d^3 = \frac{1}{6}\pi\rho F_P K_{ICPMS} K_M d^3 \qquad (4)$$

donde K_d es la pendiente obtenida de una calibración de tamaño (intensidad neta del evento frente a diámetro de partícula al cubo), d es el diámetro equivalente, ρ es la densidad y F_P es la fracción en masa del elemento en la partícula. En la Figura 1.1.1.c se muestra una distribución en tamaño o en masa del elemento por partícula.

Por último, la concentración en masa del elemento disuelto (X^D) se puede calcular a partir de la señal neta promedio de la línea base $S_{\bar{D}} = Y_{\bar{D}} - Y_B$, donde $Y_{\bar{D}}$ es la señal promedio de la línea base e Y_B es la intensidad promedio de la línea base de un blanco, todas ellas expresadas en cuentas. Si se considera un tiempo de lectura (t_{dwell}) específico y la ecuación (1) expresada en cuentas, la concentración en masa del elemento disuelto se relaciona con la señal neta promedio de la línea base a través de la ecuación:

$$S_{\bar{D}} = K_R\, t_{dwell} X^D = K_{intro}\, K_{ICPMS} K_M t_{dwell} X^D \qquad (5)$$

Las ecuaciones (2) - (5) son expresiones fundamentales que relacionan los diferentes dominios de señal en SP-ICP-MS con los correspondientes dominios de información (Figura 1.1.2). En primer lugar, a partir del dominio de señal de intensidad de eventos, se detectan nanopartículas de distintos tamaños y diferentes masas del elemento por partícula, lo que implica el dominio de tamaño o de masa del elemento por partícula. La transformación del dominio de señal de intensidad al dominio de masa de elemento por partícula y de tamaño implica usar las ecuaciones (3) y (4), respectivamente. Una vez que se han detectado y contado los eventos de partícula, el dominio de número de eventos puede transformarse en el dominio de concentración en número a través de la ecuación (2). Finalmente, el dominio de señal de intensidad de eventos de línea base se relaciona con el dominio de concentración en masa del elemento disuelto a través de la ecuación (5).

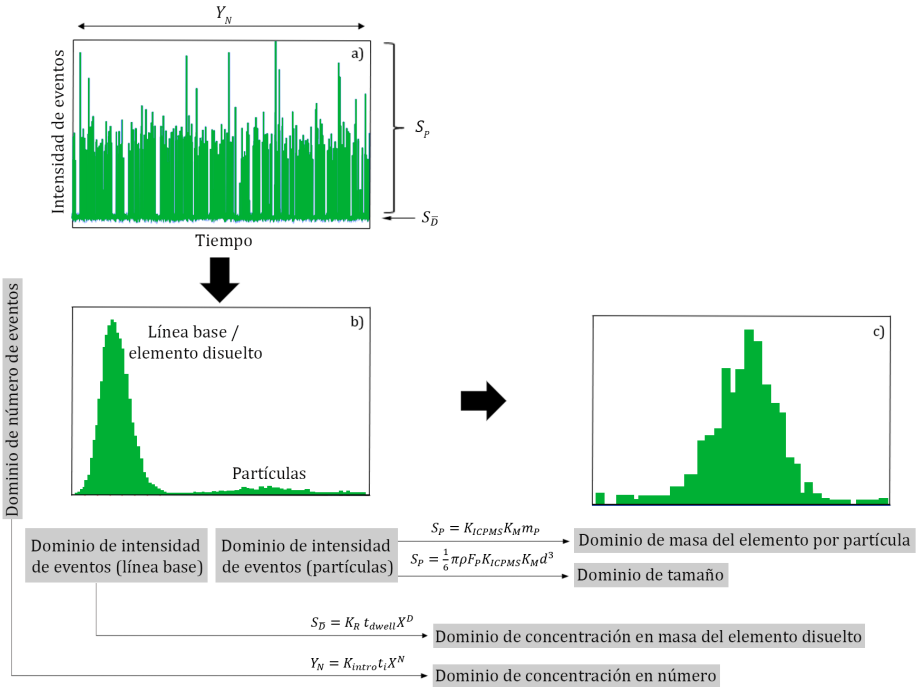


Figura 1.1.2. *Dominios y transformaciones involucrados en SP-ICP-MS.*

Por otro lado, mientras que la calibración de la concentración en masa de los elementos disueltos implica estándares de elementos convencionales preparados a partir de las especies disueltas del analito, la calibración de la concentración en número requiere estándares de concentración en número de nanopartículas. Finalmente, para la calibración del tamaño o de la masa del elemento por partícula se requieren estándares de distintos tamaños de la misma composición elemental y la misma geometría que las nanopartículas de estudio. Debido a la escasa disponibilidad de estos estándares de nanopartículas se suelen aplicar calibraciones indirectas basadas en el uso de estándares disueltos del elemento de interés. Asumiendo que las partículas se comportan en el ICP-MS igual que el elemento disuelto, estas calibraciones convencionales ($K_R = K_{intro}K_{ICPMS}K_M$) se pueden usar para el cálculo de los diferentes coeficientes incluidos en las ecuaciones (1), (2) y (3), una vez que se conoce el caudal de introducción de la muestra y el rendimiento de nebulización del analito. El caudal de introducción de la muestra se puede determinar gravimétricamente pesando la cantidad de agua introducida en el sistema de nebulización durante un tiempo determinado. El rendimiento de nebulización del analito se calcula normalmente por los métodos desarrollados por Pace *et al*. [88] basados en el uso de estándares de nanopartículas de concentración en número conocida (método de la frecuencia) o tamaño conocido (método del tamaño) como alternativa al método indirecto basado en determinar la relación entre el analito recogido a través del drenaje del sistema de nebulización y el introducido en el mismo. En el caso del método del tamaño son necesarios estándares de nanopartículas de tamaño conocido, así como estándares de concentración del elemento disuelto. Recientemente, Cuello-Nuñez *et al*. [95] han propuesto un método basado en la medición dinámica de los flujos de masa para determinar el rendimiento de nebulización de la muestra, evitando el uso de estándares de nanopartículas.

1.1.1.3. Revisión del concepto de valor crítico y límite de detección

Debido a los diferentes tipos de información que se pueden obtener de SP-ICP-MS, estas capacidades de detección de la técnica deben ser expresadas cuantitativamente como límites de detección (LOD). Aunque la utilidad de los LOD ha sido cuestionada por algunos autores [96,97], estos parámetros se consideran como un parámetro metrológico fundamental y han sido definidos por la IUPAC [98] y la ISO [99] en el contexto de métodos analíticos que proporcionan resultados cuantitativos en concentración. A pesar de su amplio uso, los LOD siguen siendo un

tema complejo y causan cierta confusión debido a los diferentes enfoques disponibles para su estimación [100].

En un sentido amplio, un LOD de concentración se define como la concentración más baja de un analito que puede ser detectado con una incertidumbre razonable. Intuitivamente, esta concentración corresponde con la señal más baja obtenida en una muestra que contiene analito que es significativamente diferente a la señal del blanco, la cual se obtiene a partir de una muestra que no contiene analito. El enfoque más utilizado para la estimación de los LOD de concentración fue desarrollado por Currie [101] para distribuciones normales y de Poisson, y se basa en la teoría de los test de significación y en la aparición y control de falsos positivos y negativos.

Cuando se analizan un número de muestras de blanco (concentración, X, igual a 0) se obtiene una distribución de señales de blanco alrededor de Y_B con una desviación estándar σ_B (distribuciones a la izquierda en la Figura 1.1.3). Debido a que puede haber situaciones en las que muestras que no contienen analito producen señales mayores que Y_B, se debe definir un valor umbral para decidir si el analito está presente o no en la muestra. Este valor umbral es conocido como límite de decisión o valor crítico Y_C y se define como la respuesta de un instrumento por encima de la cual una señal observada es atribuida a la presencia de un analito. La selección de este valor crítico implica que hay una cierta probabilidad α de que un analito sea detectado falsamente en un blanco, produciendo un falso positivo (error de tipo I). Por otro lado, cuando se analiza una muestra que contiene analito y que produce una distribución de señales en torno a un valor igual o mayor que Y_C hay una cierta probabilidad β de concluir erróneamente que el analito no está presente, produciendo un falso negativo (error de tipo II). Una vez que se ha definido Y_C, se debe establecer un valor mínimo detectable en el dominio de la señal como la señal correspondiente a una concentración de analito que da una probabilidad específica β de producir un error de tipo II. Por tanto, Y_D puede definirse como el valor más pequeño de una señal para la cual la probabilidad de que supere su valor crítico es 1-β. La relación entre los errores de tipo I y II, las probabilidades α y β, y los términos Y_C e Y_D se ejemplifican en la Figura 1.1.3.a.

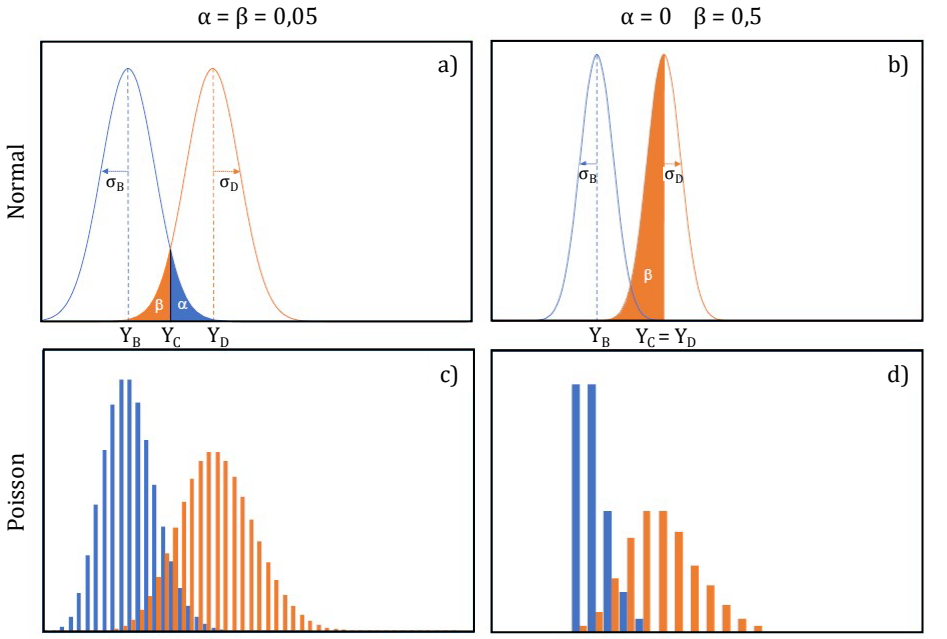


Figura 1.1.3. *Enfoque del límite de detección de concentración. Errores de tipo I y tipo II, α y β, respectivamente, y la relación entre Y_C e Y_D con diferentes criterios y valores de señal aplicados a distribuciones continuas normal y discretas de Poisson. a) y c) Y_B = 10; y b) y d) Y_B = 1.*

Si se consideran normales las distribuciones de la línea base, con una desviación estándar conocida (suponiendo que se ha obtenido a partir de un gran número de observaciones del blanco), el valor crítico puede definirse como:

$$Y_C = Y_B + k\sigma_B \qquad (6)$$

donde k denota el cuantil (1-α) de la distribución normal estándar ($z_{1-\alpha}$). Si las desviaciones estándar son constantes en el rango de Y_B a Y_D ($\sigma_B = \sigma_D$), y la probabilidad de producir un error de tipo I y tipo II es la misma ($\alpha = \beta$), el valor mínimo detectable es:

$$Y_D = Y_B + 2k\sigma_B \qquad (7)$$

Las ecuaciones (6) y (7) se pueden expresar como señales netas ($S = Y - Y_B$):

$$S_C = k\sigma_B \qquad (8)$$

$$S_D = 2k\sigma_B \quad (9)$$

Cuando la probabilidad de los errores de tipo I y tipo II se fija a 0,05 ($z_{1-\alpha} = z_{1-\beta} = 1{,}645$):

$$S_D = 3{,}29\sigma_B \quad (10)$$

aunque suele expresarse como:

$$S_D = 3\sigma_B \quad (11)$$

Esta expresión puede interpretarse como un redondeo de la expresión (10), en la que se considera tanto el error de tipo I como el de tipo II ($\alpha = \beta = 0{,}067$), o como un límite de detección basado en considerar que $Y_D = Y_C$, el cual implica que $\alpha = 0{,}00135$ y $\beta = 0{,}5$ (Figura 1.1.3.b).

La transformación de Y_C a Y_D (o S_C y S_D) al dominio de concentración (X_C y X_D, respectivamente), implica el uso de un factor de sensibilidad b, el cual relaciona la señal Y con la concentración X a través de una función de calibración ($Y = a + b\,X$). El valor mínimo detectable en el dominio de concentración se convierte en el límite de detección expresado como:

$$LOD = X_D = 3{,}29\frac{\sigma_B}{b} \quad (12)$$

$$LOD = X_D = 3\frac{\sigma_B}{b} \quad (13)$$

siendo esta última la expresión más frecuente encontrada en libros de texto y en la bibliografía. Por tanto, el límite de detección es el valor a partir del cual se puede confiar en que un determinado método analítico permite la detección, y se define *a priori,* utilizándose para seleccionar o comparar métodos. Una vez que se ha aplicado el método, el límite de detección no desempeña ningún papel en la decisión de detección, ya que el parámetro que se utiliza para decidir *a posteriori* si el resultado de un análisis indica la presencia o ausencia del analito es el valor crítico.

Como se ha visto, el enfoque básico está basado en las desviaciones estándar del blanco e implica conocer Y_B y σ_B que se obtienen realizando un número de medidas del blanco en las mismas condiciones (20 según IUPAC [102] o 10 según EURACHEM [103]), así como el factor de sensibilidad. Para medidas emparejadas, la desviación estándar de la señal neta se obtiene de $\sigma^2 = \sigma_D^2 + \sigma_B^2 = 2\sigma_B^2$ ($\sigma_B = \sigma_D$), y k aumenta en un factor de $\sqrt{2}$ en las expresiones para el valor crítico y los límites de detección [101].

Si se consideran técnicas de conteo como espectrometría de masas, entonces los sistemas analíticos se vuelven heterocedásticos (la desviación estándar de la señal depende de su magnitud) y las señales asumen solamente valores discretos, siguiendo distribuciones de Poisson. Las distribuciones de Poisson muestran una asimetría significativa para valores de señales bajas, aunque para valores suficientemente grandes ($Y > 5$ cuentas [104]), pueden aproximarse a distribuciones normales, como se muestra en la Figura 1.1.3.c y Figura 1.1.3.d para valores Y_B igual a 10 y 1, respectivamente. Debido a que en las distribuciones de Poisson el promedio es igual a la varianza ($Y = \sigma^2$) el enfoque anterior debe ser adaptado. El valor crítico puede expresarse como:

$$Y_C = Y_B + k\sigma_B = Y_B + k\sqrt{Y_B} \tag{14}$$

Debido a que $\sigma_B \neq \sigma_D$, $\sigma_B^2 = Y_B$ y $\sigma_D^2 = Y_D$, la ecuación (7) para $\alpha = \beta$ se transforma en:

$$Y_D = Y_B + k^2 + 2Y_C = Y_B + k^2 + 2k\sqrt{Y_B} \tag{15}$$

Las ecuaciones (14) y (15) pueden expresarse en términos de señal neta como:

$$S_C = 1{,}64\sqrt{Y_B} \tag{16}$$

$$S_D = 2{,}71 + 3{,}29\sqrt{Y_B} \tag{17}$$

La ecuación (17) muestra que S_D nunca será igual a 0, incluso en el caso de un blanco igual a 0 ($Y_B = \sigma_B = 0$).

La Tabla 1.1.1 resume las expresiones comunes utilizadas para la estimación de los valores críticos y mínimos detectables para $\alpha = \beta = 0{,}05$ con distribuciones de Poisson.

Tabla 1.1.1. *Expresiones utilizadas para la estimación de los valores netos críticos y mínimos detectables para $\alpha = \beta = 0{,}05$* [101]. *Para las expresiones de los valores brutos (Y_C e Y_D) se debe añadir el valor de Y_B.*

Distribución	Blanco conocido		Medidas emparejadas	
	Valor crítico	Valor mínimo detectable	Valor crítico	Valor mínimo detectable
Normal	$S_C = 1{,}64\sigma_B$	$S_D = 3{,}29\sigma_B$	$S_C = 2{,}33\sigma_B$	$S_D = 4{,}65\sigma_B$
Poisson	$S_C = 1{,}64\sqrt{Y_B}$	$S_D = 2{,}71 + 3{,}29\sqrt{Y_B}$	$S_C = 2{,}33\sqrt{Y_B}$	$S_D = 2{,}71 + 4{,}65\sqrt{Y_B}$

El objetivo principal de este apartado se centra en el desarrollo de un enfoque armonizado en relación con la detectabilidad y los distintos límites de detección en SP-ICP-MS. Para ello, se desarrollará una estrategia de discriminación e identificación de partículas basada en la aplicación de un valor crítico en función del tiempo de lectura. Además, se propondrá la armonización de expresiones para la estimación de los diferentes valores críticos y límites de detección en los diferentes dominios, y la aplicación de estos términos en diferentes condiciones experimentales e instrumentales.

1.1.2. EXPERIMENTAL

1.1.2.1. Instrumentación

El análisis mediante la técnica de detección individual de partículas (SP-ICP-MS) se realizó con dos espectrómetros de masas con fuente de ionización de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) diferentes. El primero era un ICP-MS Perkin Elmer ELAN DRC-e (Perkin Elmer, Toronto, Canadá) equipado con un nebulizador *slurry* concéntrico de vidrio y una cámara de nebulización ciclónica (Glass Expansion, Melbourne, Australia). Los datos brutos de los barridos de tiempo se procesaron utilizando una versión modificada de la herramienta de cálculo de partículas individuales desarrollada por RIKILT [105]. El segundo era un ICP-MS Perkin Elmer NexION 2000B (Perkin Elmer, Toronto, Canadá). Se utilizaron dos sistemas de introducción de muestras diferentes: una cámara ciclónica con un nebulizador concéntrico de vidrio (Meinhard); y una cámara Asperon™ equipada con un micronebulizador concéntrico de vidrio de alta eficiencia (Meinhard). Las suspensiones se midieron mediante SP-ICP-MS usando el módulo Syngistix™ Nano-Application versión 2.5 (Perkin Elmer Inc.).

Los parámetros instrumentales y de adquisición en modo individual de partículas se muestran en la Tabla 1.1.2 para ambos instrumentos. También se utilizaron hojas de cálculo Excel (Microsoft, Redmond, EE.UU.) y el software de análisis de datos OriginPro 2019b (OriginLab Corporation, Northampton, USA).

Tabla 1.1.2. *Parámetros instrumentales y de adquisición de datos para SP-ICP-MS en función del instrumento ICP-MS: ELAN DRC-e o NexION 2000B.*

ICP-MS	ELAN DRC-e	NexION 2000B
Cámara	Ciclónica	Ciclónica
Parámetros instrumentales		
Potencia RF	1200 W	1600 W
Flujo de gas argón		
Plasma	15 L min^{-1}	15 L min^{-1}
Auxiliar	1,2 L min^{-1}	1,2 L min^{-1}
Nebulizador	1,0 L min^{-1}	1,14 L min^{-1}
Caudal de introducción de muestra	1,0 mL min^{-1}	330 - 400 µL min^{-1}
Parámetros de adquisición de datos		
Tiempo de lectura	5 ms	100 µs, 5 ms
Tiempo de asentamiento	3 ms	-
Tiempo total de adquisición	60 s	60 s, 300 s
Isótopos monitorizados	^{107}Ag, ^{197}Au	^{107}Ag, ^{197}Au

1.1.2.2. Estándares y reactivos

Las suspensiones de nanopartículas de oro y de plata utilizadas se prepararon a partir de estándares comerciales de nanoComposix (nanoComposix, St. Diego, EE.UU.). Las nanopartículas de plata estaban estabilizadas con citrato y tenían un diámetro nominal de 97 ± 11 nm; y las de oro estaban estabilizadas con polietilenglicol (PEG 0,8 kDa) y su diámetro nominal era 47,8 ± 1,8 nm.

Las disoluciones acuosas de plata se prepararon a partir de una disolución estándar de 1000 mg L^{-1} (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) y se diluyeron en agua ultrapura (18 MΩ cm de resistividad), obtenida a partir de un equipo de purificación Milli-Q (Millipore Co., Bedford, EE. UU.).

Las disoluciones acuosas multielementales [Multielemental Fluka I (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.), Trace Metal I (J. T. Baker, Holanda), AccuTrace Reference Standard 3 (J. T. Baker, Holanda) e ICP Multielemental solution VIII (Scharlau, Scharlab. S.L., Barcelona, España)], indio, silicio y titanio (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) se prepararon a partir de disoluciones estándares de 5 - 1000 mg L^{-1} y se diluyeron en HNO_3 al 1% (*v/v*) (J.T. Baker, Holanda).

Los rendimientos de nebulización se determinaron con un estándar de nanopartículas monodispersas de oro de 50 y 100 nm estabilizadas con PEG, procedentes de nanoComposix, y con un diámetro nominal de 47,8 ± 1,8 nm y 99,4 ± 3,0 nm, respectivamente.

Las suspensiones de nanopartículas se prepararon a partir de alícuotas de las suspensiones concentradas, por pesada en una balanza analítica GH-200 (A&D, California, EE.UU.) con una precisión de ± 0,1 mg, y tras 1 min de sonicación en baño (Ultrasons, J.P. Selecta, Barcelona, España). Se evitaron mayores tiempos de sonicación para evitar un calentamiento excesivo de las suspensiones. El resto de las disoluciones se prepararon de la misma manera sin sonicación previa.

1.1.2.3. Procesamiento de datos de SP-ICP-MS

Para las medidas del Apartado 1.1.3.1.1 con el instrumento ICP-MS Perkin Elmer ELAN DRC-e, las suspensiones se midieron en modo de partículas individuales usando un tiempo de lectura de 5 ms con un tiempo de adquisición total de 60 s y registrando 12.000 lecturas por barrido de tiempo (Tabla 1.1.2). Debido a que la velocidad de adquisición de datos del instrumento está limitada por la capacidad de la memoria RAM del ordenador, se midieron al menos dos isótopos con el fin de utilizar el tiempo de asentamiento para vaciar la memoria. Esta estrategia permite reducir los tiempos de lectura a 5 ms usando un tiempo de asentamiento de 3 ms.

El rendimiento de nebulización del analito se calculó de acuerdo con los métodos desarrollados por Pace *et al*. [88], usando el estándar de nanopartículas de oro de 100 nm descrito anteriormente. Los rendimientos de nebulización promedio obtenidos fueron 2,65 ± 0,03 % y 2,59 ± 0,06 % para el método de la frecuencia y el método del tamaño, respectivamente (n = 3). Los caudales de muestra se midieron gravimétricamente por triplicado.

Para las medidas del Apartado 1.1.3.1.2 y 1.1.3.2 con el instrumento ICP-MS Perkin Elmer NexION 2000B, las suspensiones se midieron en modo de partículas individuales usando un tiempo de lectura de 20, 50, 100 y 200 µs y 3, 5 y 10 ms con un tiempo de adquisición total de 60 s y registrando 3.000.000, 1.200.000, 600.000 y 300.000, 20.000, 12.000 y 6.000 lecturas por barrido de tiempo, respectivamente. Las señales registradas se procesaron con el módulo Syngistix™ Nano-Application versión 2.5 (Perkin Elmer Inc.) aplicando un criterio 5σ.

El rendimiento de nebulización del analito se calculó de acuerdo a los métodos desarrollados por Pace *et al*. [88], usando los estándares de nanopartículas de oro de

50 nm descritas anteriormente. Los rendimientos de nebulización promedio obtenidos fueron 5,45 ± 0,01 % y 5,22 ± 0,05 % para el método de la frecuencia y el método del tamaño, respectivamente (n = 3). Los caudales de muestra se midieron gravimétricamente por triplicado.

1.1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.1.3.1. Discriminación de eventos de partículas/línea base

En función del tiempo de lectura (*dwell time*) seleccionado, que es el que controla la frecuencia de adquisición, los eventos de partículas se registran como pulsos (eventos de una lectura) o picos (eventos de varias lecturas). Debido a que la duración de los eventos de nanopartículas está en el rango de 300 - 1000 μs [106,107], cuando se utilizan tiempos de lectura en el rango de milisegundos (3 - 10 ms), mayores que la duración del evento de la partícula individual, los eventos son registrados como pulsos (una única medida), mientras que utilizando tiempos de lectura en el rango de los microsegundos (10 - 200 μs), los tiempos son menores que la duración de cada evento, por lo que se registran como señales transitorias compuestas por varias medidas. Los perfiles de los eventos producidos por nanopartículas de oro de 50 nm para diferentes tiempos de lectura se recogen en la Figura 1.1.4.

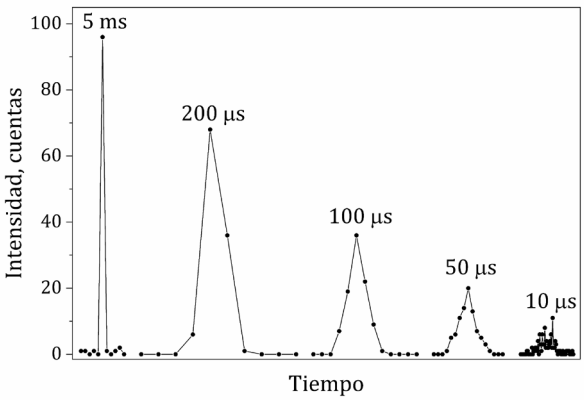


Figura 1.1.4. *Perfiles de los eventos de partícula registrados a diferentes tiempos de lectura para AuNPs de 50 nm. Intensidad total: 96 cuentas. Escala de tiempo para 200, 100, 50 y 10 μs: x100.*

La señal correspondiente a cada evento se debe al total de iones detectados para cada partícula. Por tanto, la intensidad neta total de un evento registrado como un pico (S_P) corresponderá a la suma de las intensidades netas registradas a lo largo del mismo ($S_P = \sum S_{P_i}$), siendo igual que la intensidad neta de la misma partícula registrada como pulso. De este modo, la intensidad neta total de un evento (medido en cuentas) es independiente del tiempo de lectura, mientras que la altura del pico disminuye con el tiempo de lectura si se trabaja en microsegundos. Este comportamiento se muestra en la Figura 1.1.4 donde se obtuvo una intensidad total promedio por evento de 96 cuentas para unas nanopartículas de oro de 50 nm. Asumiendo un perfil triangular de una altura S_{Pmax} y una duración (anchura) w para un pico, y al menos dos lecturas registradas por partícula ($t_{dwell} \leq w/2$), la ecuación (3) se puede escribir como:

$$S_{Pmax} = \frac{2}{w} K_{ICPMS} K_M t_{dwell} m_P \tag{18}$$

Una de las cuestiones más críticas en SP-ICP-MS es la identificación de los eventos correspondientes a partículas en un barrido de tiempo. Tanto en el caso de pulsos como de picos, la altura de los mismos debe ser lo suficientemente grande como para poder distinguirlos de la línea base y de su ruido asociado. Esto requiere de un criterio robusto que discrimine los eventos correspondientes a partículas de las lecturas de la línea base, lo cual también determinará el tamaño mínimo o la masa del elemento por partícula que se puede detectar. Un criterio inadecuado hará que las lecturas de la línea base se consideren partículas, y esto afectará al número mínimo de partículas que puedan ser detectadas a partir de un determinado tamaño.

Cuando los eventos de partículas son registrados como pulsos, el uso de un umbral relacionado con la línea base es imprescindible, mientras que cuando son registrados como señales transitorias/picos, podrían usarse enfoques alternativos similares a los aplicados a la detección de picos cromatográficos [90,108].

Respecto al ruido asociado a la línea base, las fluctuaciones aleatorias de la señal debido a diferentes fuentes de ruido también son responsables de la distribución de la línea base observada en los histogramas de SP-ICP-MS. En los instrumentos ICP-MS de cuadrupolo equipados con multiplicadores de electrones secundarios, el ruido asociado a señales de baja intensidad presenta un comportamiento Poissoniano, cuya desviación estándar es igual a la raíz cuadrada de la señal en cuentas. Sin embargo, la contribución del ruido de parpadeo, que es directamente proporcional a la magnitud de la señal, llega a ser significativa conforme aumenta ésta. Por tanto, para una señal Y, expresada como iones contados que llegan al detector durante un determinado tiempo de lectura, su ruido total (σ_t) puede expresarse como [109]:

$$\sigma_t = \sqrt{Y + \xi^2 Y^2} \quad (19)$$

donde ξ es el coeficiente del ruido de parpadeo.

Teniendo en cuenta los tipos de señales y los enfoques y criterios que se pueden aplicar en función del tiempo de lectura y del valor de la intensidad de la línea base y de su ruido asociado, se van a estudiar, por separado, los criterios aplicados en el caso de tiempos de lectura de milisegundos y de microsegundos.

1.1.3.1.1. Tiempos de lectura de milisegundos

El criterio para la discriminación entre los eventos de partículas y de la línea base se ha basado en el concepto de valor crítico o límite de decisión, desarrollado por Currie para describir la capacidad de detección de un método analítico [101]. En SP-ICP-MS las lecturas de la línea base pueden ser consideradas como medidas de blanco, produciendo una distribución de señales de la línea base alrededor de Y_B con una desviación estándar σ_B, por lo que para saber si lecturas que están por encima de Y_B corresponden a la línea base o a partículas, se puede aplicar la ecuación (6) relacionada con el valor crítico.

La mayoría de los procedimientos de SP-ICP-MS siguen métodos semi-empíricos basados en los conceptos de límite de detección para análisis cuantitativos convencionales, utilizando un criterio *k*-sigma, siendo *k* un múltiplo de la desviación estándar de la línea base. La mayoría de los procedimientos usan valores desde 3 hasta 8 [88,110–114] para el parámetro *k*, aunque los más utilizados son 3 y 5. El número de falsos positivos será más o menos significativo en función del criterio adoptado. Para conseguir la mejor capacidad de detección en SP-ICP-MS, el número de falsos positivos debería ser cero o muy próximo a cero, por lo que el objetivo de usar coeficientes más altos es la reducción de estos falsos positivos. Para distribuciones normales de línea base, la aplicación de un criterio 3σ implica que un 0,135% de los eventos detectados (α = 0,00135) sean falsos positivos, mientras que con la aplicación de un criterio 5σ, la probabilidad de tener falsos positivos está muy por debajo del 0,1% ($\alpha = 3x10^{-7}$).

Sin embargo, la aplicación directa del concepto de límite de detección en SP-ICP-MS puede producir efectos engañosos, incluso si se considera el comportamiento de Poisson de las distribuciones. Hay que tener en cuenta que las señales de ICP-MS asumen solamente valores discretos y siguen comportamientos de Poisson con distribuciones que muestran una asimetría significativa para señales por debajo de unas 5 cuentas [104]. Por esta razón, en este capítulo se ha realizado un estudio

sistemático para establecer una estrategia de discriminación de los eventos de partículas y de línea base, basada en la aplicación de un valor crítico Y_C como límite de decisión *a posteriori*, y se ha adaptado a las señales de ICP-MS obtenidas en una variedad de situación típicas en SP-ICP-MS.

Como paso previo a la discriminación de las lecturas de las partículas y de la línea base para medidas de milisegundos, se modeló la desviación de la señal de la línea base según el comportamiento del ruido. En la Figura 1.1.5 se muestra la modelización del ruido para el instrumento ICP-MS ELAN DRC-e Perkin Elmer. Siguiendo la ecuación (19) se obtuvo un coeficiente del ruido de parpadeo de 0,041 ± 0,004.

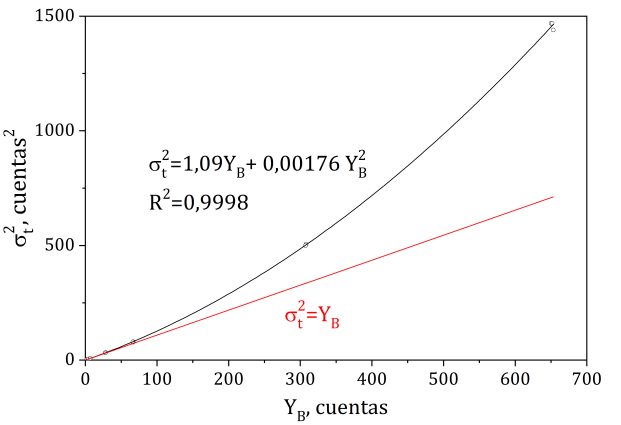


Figura 1.1.5. *Modelización del comportamiento del ruido de la línea base en SP-ICP-MS. Línea negra: medidas experimentales. Línea roja: comportamiento Poisson. Instrumento ICP-MS Perkin Elmer ELAN DRC-e.*

La Figura 1.1.5 también muestra que el comportamiento de Poisson de la desviación estándar de la línea base está limitado a valores de baja intensidad de señal. Por encima de aproximadamente 10 cuentas, la desviación estándar de las señales se aleja progresivamente del comportamiento ideal de Poisson, siendo mayor que la raíz cuadrada de la intensidad. Esta sobredispersión de las señales a valores de intensidad altos se observa claramente en la Figura 1.1.6, con un ensanchamiento respecto de la distribución de Poisson de un 5% para señales de unas 50 cuentas, aumentando hasta más de un 40% para señales de 600 cuentas.

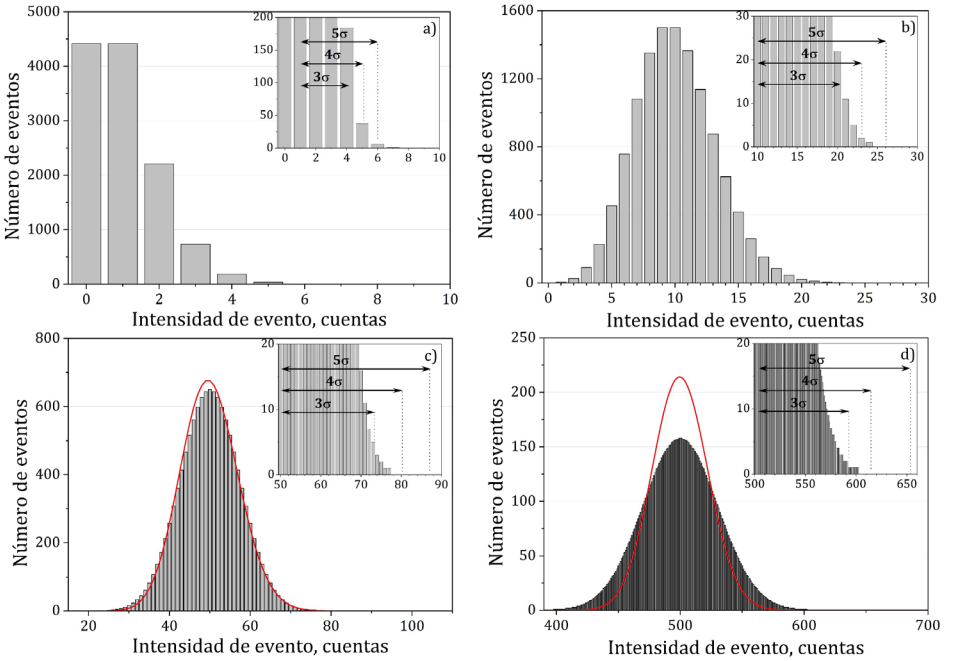


Figura 1.1.6. *Distribuciones discretas simuladas de la señal de la línea base correspondientes a: a) 1, b) 10, c) 50 y d) 500 cuentas. Línea roja: distribución teórica Poisson-normal.*

De esta forma, tras demostrar que la distribución de la línea base muestra una sobredispersión con respecto al perfil del comportamiento de Poisson esperado en función de la magnitud de la señal, la expresión (6) para el cálculo del valor crítico se transforma en:

$$Y_C = Y_B + k\sqrt{Y_B + \xi^2 Y_B^2} \qquad (20)$$

Aunque para valores de $Y_B \leq 10$ cuentas, se puede considerar solamente la contribución de Poisson:

$$Y_C = Y_B + k\sqrt{Y_B} \qquad (21)$$

Como se ha comentado anteriormente, debido a que la aplicación del valor crítico conlleva un riesgo de detectar falsos positivos, el cálculo de este valor crítico implica establecer un determinado factor *k* para controlar estos falsos positivos. Para ello, se estimaron los valores críticos y los falsos positivos que se obtienen en función de la intensidad de la línea base y del factor *k*. En la Tabla 1.1.3 se recogen estos valores críticos estimados y los falsos positivos en función del factor *k* y la intensidad

de la línea base. Al comparar la segunda y la tercera columna se confirmó que para valores de $Y_B \leq 10$ cuentas la contribución del coeficiente del ruido de parpadeo puede despreciarse. De este modo, los valores críticos se calcularon a partir de las ecuaciones (20) cuando $Y_B > 10$ cuentas y (21) cuando $Y_B \leq 10$ cuentas, y se redondearon al valor entero superior. El número de falsos positivos se determinó a partir de distribuciones simuladas discretas de Poisson para $Y_B \leq 10$ cuentas, mientras que para $Y_B > 10$ cuentas se consideraron distribuciones discretas de Poisson-normal. La Figura 1.1.6 muestra las distribuciones discretas simuladas y los falsos positivos en función del criterio *k*-sigma.

Tabla 1.1.3. *Estimación teórica de la desviación estándar de la línea base (σ_t), de los valores críticos (Y_C) y de los falsos positivos en función de la intensidad de la línea base y el criterio* k*-sigma (simulación con 12.000 datos). Los valores en paréntesis no se usaron para el cálculo.*

Señal de la línea base	**σ_t calculada**		**Criterio *k*-sigma**							
	$\sigma_t = \sqrt{Y_B}$	$\sigma_t = \sqrt{Y_B + \xi^2 Y_B^2}$	**3σ**		**4σ**		**5σ**		**8σ**	
cuentas	**cuentas**	**cuentas**	**Y_c cuentas**	**Falsos positivos**	**Y_c cuentas**	**Falsos positivos**	**Y_c cuentas**	**Falsos positivos**	**Y_c cuentas**	**Falsos positivos**
0,01	0,10	(0,10)	1	0	1	0	1	0	1	0
0,1	0,32	(0,32)	2	2	2	2	2	2	3	0
1	1,00	(1,00)	4	44	5	7	6	1	9	0
5	2,24	(2,25)	12	25	14	3	17	0	23	0
10	3,16	(3,19)	20	19	23	1	26	0	36	0
50	(7,07)	7,36	73	7	80	0	87	0	109	0
100	(10,00)	10,81	133	10	144	0	155	0	187	0
500	(22,36)	30,34	592	10	622	0	652	0	743	0

Respecto a los falsos positivos, el criterio 3σ es claramente insuficiente para eliminar todos los falsos positivos, mientras que el criterio 4σ falla a bajas intensidades. Por otro lado, el criterio 5σ elimina los falsos positivos satisfactoriamente a señales de intensidad baja, mientras que sobrestima los valores críticos a señales de intensidad alta. Finalmente, el criterio 8σ elimina completamente los falsos positivos, aunque sobrestima los valores críticos en todo el rango de intensidades. Como puede verse en la Tabla 1.1.3, a señales de intensidad muy baja (por debajo de 0,01 cuentas) los valores críticos se fijan a 1 cuenta, asegurando la ausencia teórica de falsos positivos en estas condiciones. Por otro lado,

las señales medias por debajo de 1 cuenta no mostraron una influencia clara del criterio umbral debido a la forma en la que se realizó la discretización de las distribuciones continuas teóricas (los valores de la variable dependiente iguales o superiores a 1 se redondearon al número entero más cercano; de lo contrario, se fijaron a 0).

Tras el estudio teórico, se midieron disoluciones de agua ultrapura y plata iónica con concentraciones hasta 10 μg L^{-1} para determinar experimentalmente los falsos positivos y compararlos con los estimados teóricamente a partir de distribuciones simuladas de una forma similar a las de la Tabla 1.1.3. En la Tabla 1.1.4 se muestran los resultados obtenidos, los cuales confirman que el criterio 5σ garantiza la ausencia de falsos positivos en el rango de intensidades estudiadas dentro de la incertidumbre estadística, lo que justifica el uso del criterio incluso para intensidades de línea base altas. Como regla general, los valores críticos calculados a partir de las ecuaciones (6), (20) y (21) deben ser números enteros redondeados por exceso.

Tabla 1.1.4. *Desviaciones estándar de la línea base experimentales (σ_t), valores críticos (Y_C) y falsos positivos en función de la intensidad de la señal de la línea base usando un criterio 5σ. Las señales de la línea base corresponden a medidas de agua ultrapura y disoluciones de Ag(I) desde 0 a 10 μg L^{-1}. La incertidumbre está expresada como la desviación estándar de 3 réplicas.*

Señal promedio de la línea base	**σ_t experimental**	**Criterio 5σ**			
		experimental		**calculado**	
cuentas	**cuentas**	**Y_c cuentas**	**Falsos positivos**	**Y_c cuentas**	**Falsos positivos**
0,05	0,24	2 ± 0	3 ± 2	2	0
0,25	0,51	4 ± 1	4 ± 4	3	2
1,12	1,05	7 ± 0	1 ± 2	7	0
1,47	1,25	8 ± 0	2 ± 2	8	0
6,96	2,72	21 ± 0	1 ± 1	21	0
28,04	5,63	57 ± 1	2 ± 1	56	0
66,30	8,88	112 ± 1	4 ± 4	111	0
308,15	23,14	420 ± 2	2 ± 1	419	0
646,52	38,21	841 ± 3	3 ± 4	841	0

1.1.3.1.2. Tiempos de lectura de microsegundos

Como se ha comentado anteriormente, cuando los eventos de partículas se registran como señales transitorias, pueden aplicarse métodos similares a los aplicados en la detección de picos cromatográficos para discriminar los eventos de partículas de los de línea base [90,108]. Estos enfoques implican la aplicación de algoritmos que consideran otros criterios aparte del umbral de la línea base, como la anchura de los picos.

En cualquier caso, para los análisis de microsegundos lo habitual es utilizar el criterio descrito anteriormente utilizando tiempos de lectura de milisegundos, consistente en la aplicación de un criterio *k*-sigma y el cálculo del valor crítico mediante la ecuación (6).

Como se ha puesto de manifiesto en el apartado anterior, el paralelismo entre los criterios para el cálculo de los umbrales para la discriminación de eventos y la teoría convencional de límites de detección es sólo aparente y su aplicación no es directa. En primer lugar, como ya hemos visto, la intensidad de las lecturas de la línea base siguen distribuciones de Poisson y consisten en valores discretos (0, 1, 2… cuentas); en segundo lugar, las intensidades promedio de la línea base pueden cubrir un amplio rango de valores y en el caso de tiempos de lectura de microsegundos pueden ser extremadamente pequeñas (por ejemplo, 0,001 cuentas); y tercero, la magnitud de la distribución de la línea base, expresada como el número de lecturas, depende del tiempo total de adquisición y del tiempo de lectura seleccionado, pudiendo ser extremadamente alto en el caso de utilizar microsegundos (más de un millón de lecturas).

Como paso previo a la discriminación de las lecturas de partículas y de línea base, se modeló la desviación de la señal de la línea base según el comportamiento del ruido para el instrumento ICP-MS NexION 2000B Perkin Elmer, que fue el utilizado para las medidas en microsegundos. En la Tabla 1.1.5 se muestran los coeficientes del ruido de parpadeo obtenidos siguiendo la ecuación (19) para diferentes tiempos de lectura. Se observó que los coeficientes ξ obtenidos para todos los tiempos de lectura estaban en torno a 0,03 - 0,04, lo que indicaba que este coeficiente era independiente del tiempo de lectura. Además, al comparar estos coeficientes con el obtenido para el otro ICP-MS utilizado en el Apartado 1.1.3.1.1 (ξ = 0,041) se obtuvo que los valores fueron similares para ambos instrumentos, lo que indicaba que el ruido tenía el mismo comportamiento en ambos ICP-MS, ya que utilizan detectores similares.

Tabla 1.1.5. *Coeficientes del ruido de parpadeo a diferentes tiempos de lectura (n=2). Instrumento ICP-MS Perkin Elmer NexION 2000B.*

Tiempo de lectura µs	**Coeficiente del ruido de parpadeo, ξ**
5000	0,037 ± 0,005
100	0,042 ± 0,003
50	0,034 ± 0,004
20	0,037 ± 0,004

La Figura 1.1.7 muestra distribuciones discretas de Poisson de la línea base para intensidades promedio de línea base desde 0,001 hasta 10 cuentas y desde 10^4 a 10^6 lecturas. Teniendo en cuenta que para las intensidades de línea base más bajas, las distribuciones están formadas por lecturas de 0 y 1 cuenta, y que el valor crítico calculado para la discriminación debe ser un número entero (redondeado por exceso), el valor crítico mínimo a aplicar deberá ser de 1 cuenta. En estas condiciones, el coeficiente seleccionado no es decisivo para líneas base por debajo de 1 cuenta, ya que se obtiene el mismo valor crítico (o diferencias de 1 cuenta debido al redondeo) usando un criterio de 3σ y 5σ (Figura 1.1.7.a, b y c). Sin embargo, para intensidades promedio de línea base de 1 o más cuentas, la selección se vuelve significativa, así como la eficacia de la discriminación.

Aunque en las primeras publicaciones de SP-ICP-MS se propuso un criterio 3σ [88], su uso no siempre ha estado convenientemente justificado desde un punto de vista estadístico. Como se ha indicado anteriormente, la aplicación de coeficientes más grandes se ha justificado con el fin de reducir el porcentaje de los falsos positivos [93,112]. En la Figura 1.1.7.b puede verse que después de aplicar un criterio 3σ y 5σ, no se observaron falsos positivos para medidas de 10^4 lecturas, mientras que se detectaron 5 y 50 falsos positivos para el caso de 10^5 y 10^6 lecturas, respectivamente. Para intensidades de línea base mayores, (Figura 1.1.7.c y d) podrían detectarse en torno a 100 falsos positivos cuando el número de lecturas está en el rango del millón.

Como puede verse en la Figura 1.1.7, el número de lecturas, que depende del tiempo total de adquisición y del tiempo de lectura, se vuelve crítico a la hora de seleccionar un criterio umbral. Trabajando a milisegundos, el número de lecturas se encuentra en las decenas de miles (por ejemplo, 12.000 lecturas para un minuto de tiempo de adquisición y un tiempo de lectura de 5 ms); mientras que este número de lecturas aumenta hasta cientos de miles y más de un millón cuando se trabaja a microsegundos (por ejemplo, 1,2 millones de lecturas para un minuto de tiempo de

adquisición y un tiempo de lectura de 50 µs). En condiciones normales, cuando se miden suspensiones con partículas, la proporción de lecturas de línea base con respecto a lecturas de partículas sigue siendo alta (aproximadamente entre el 95% y más del 99% para mili y microsegundos, respectivamente) debido a la baja concentración en número de partículas necesaria para evitar el solapamiento de dos o más partículas en un solo evento [106].

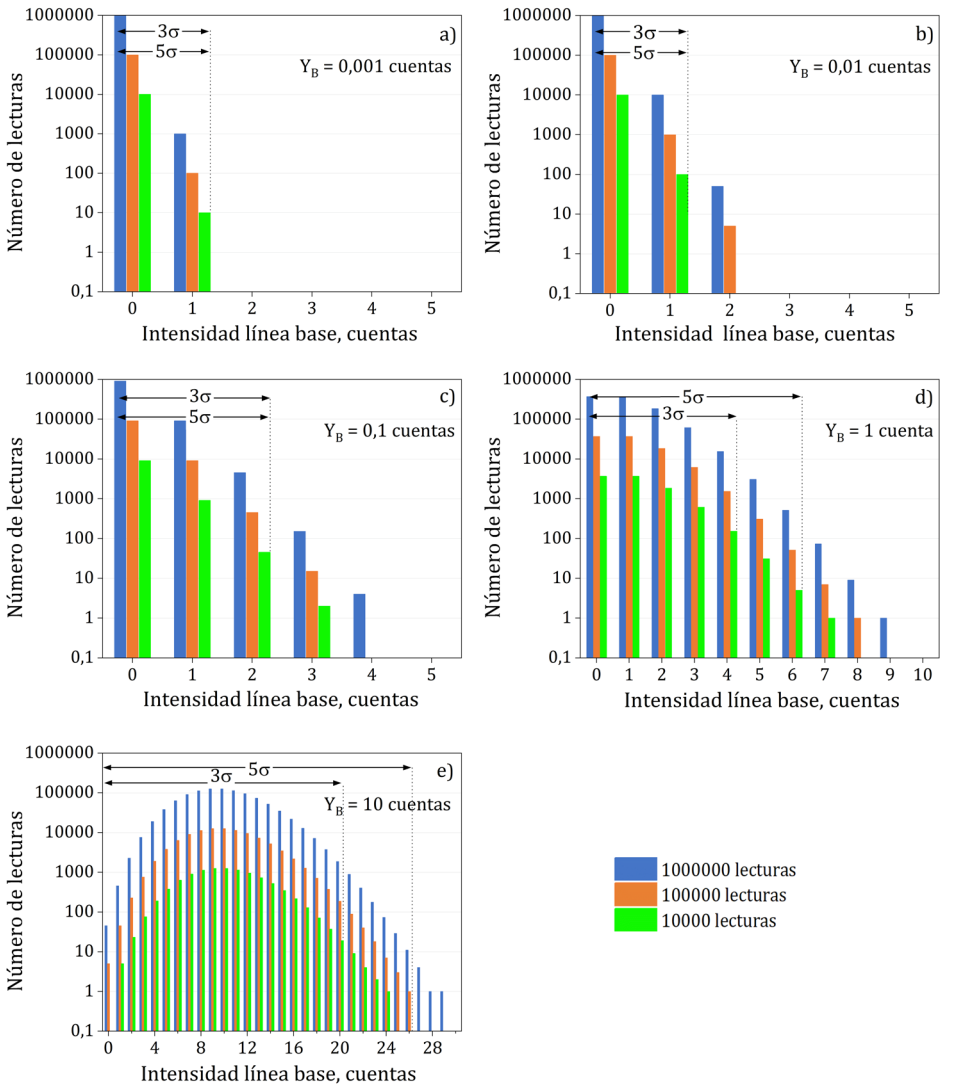


Figura 1.1.7. *Distribuciones discretas de Poisson de la línea base para intensidades promedio de a) 0,001, b) 0,01, c) 0,1, d) 1 y e) 10 cuentas, con 10^4 (verde), 10^5 (naranja) y 10^6 (azul) lecturas.*

En el Apartado 1.1.3.1, se ha demostrado que el criterio 5σ redondeado por exceso permite eliminar los falsos positivos en un rango amplio de intensidades de línea base trabajando con tiempos de lectura de milisegundos y un número de lecturas en el rango de decenas de miles. Como puede verse en la Figura 1.1.7, cuando se trabaja a microsegundos y cientos de miles o millones de lecturas, esta estrategia también es válida, aunque puede resultar conveniente añadir un término de seguridad ($\varepsilon \geq 1$) al criterio 5σ para evitar la presencia de falsos positivos. Esta corrección se aplicaría especialmente para las intensidades promedio de línea base a partir de 1 cuenta y un millón de lecturas o más, ya que en estas condiciones, la aplicación de un término de seguridad igual a 1 (criterio corregido: $5\sigma + 1$) limitaría el número de falsos positivos por debajo de 10.

El criterio desarrollado para la discriminación de eventos de línea base y de partículas es la base para la estimación de los valores críticos y límites de detección asociados a la masa de elemento por partícula y a su tamaño, tal y como se desarrollará en el siguiente apartado.

1.1.3.2. Valores críticos y límites de detección

Como se ha comentado en secciones previas, la capacidad de detección de un método analítico convencional se presenta en términos de dominios de señal y concentración, pasando del primero al segundo mediante el uso de calibraciones. Sin embargo, cuando se trata de partículas, el dominio de los resultados implica tanto concentraciones en número como la masa del elemento por partícula o el tamaño. Debido a los diferentes tipos de información que SP-ICP-MS puede proporcionar, estas capacidades de detección deben ser expresadas cuantitativamente como valores críticos y límites de detección.

1.1.3.2.1. Valores críticos y límites de detección en masa por partícula y tamaño

Los valores críticos estimados en los apartados anteriores para la discriminación de los eventos de partículas de los de línea base, descrito en términos de intensidad de señal [ecuación (6)], pueden expresarse en términos de masa de elemento por partícula (X_C^{masa}) o de tamaño ($X_C^{tamaño}$) cuando las partículas son esféricas y sólidas. En el último caso, el valor crítico, expresado en nanómetros, puede ser expresado en función del diámetro de las partículas, o de un diámetro equivalente si la morfología es desconocida. Las expresiones de estos valores críticos

varían en función del tiempo de lectura y del tipo de los eventos implicados (pulsos o señales transitorias):

- *Tiempos de lectura de milisegundos*:

$$X_C^{masa} = \frac{5\,\sigma_B}{K_{ICPMS} K_M} \tag{22}$$

$$X_C^{tamaño} = \left(\frac{30\,\sigma_B}{\pi \rho F_P K_{ICPMS} K_M}\right)^{1/3} \tag{23}$$

- *Tiempos de lectura de microsegundos*:

$$X_C^{masa} = \frac{5\,\sigma_B}{\frac{2}{w} K_{ICPMS} K_M t_{dwell}} \tag{24}$$

$$X_C^{tamaño} = \left(\frac{30\,\sigma_B}{\frac{2}{w}\pi \rho F_P K_{ICPMS} K_M t_{dwell}}\right)^{1/3} \tag{25}$$

La desviación estándar experimental de la línea base o las expresiones de $\sqrt{Y_B + \xi^2 Y_B^2}$ o $\sqrt{Y_B}$ pueden usarse para estimar el valor de σ_B.

Las ecuaciones utilizadas en las publicaciones de SP-ICP-MS para el cálculo de los LOD de tamaño están principalmente basadas en el uso de un criterio 3σ [90,93,108,115–127], aunque también se ha usado el criterio 5σ [128–131]. La interpretación del criterio 3σ en base a la teoría del LOD implicaría la consideración de errores de tipo I (falsos positivos) y de tipo II (falsos negativos), donde $\alpha = \beta =$ 0,0677, pero también podría considerarse α = 0,00135 y β = 0,5, donde el límite de detección es igual al valor crítico ($Y_D = Y_C$). Este último enfoque ha sido desaconsejado para el cálculo convencional del LOD [104] porque implica una probabilidad del 50% de falsos negativos. Sin embargo, esto no es relevante en el contexto de la detección mediante SP-ICP-MS porque la detección de las partículas no se ve comprometida, aunque se pierda la mitad de la distribución de partículas cuando se aplica un criterio LOD basado en $Y_D = Y_C$. Esto puede explicarse por el hecho de que las dos distribuciones implicadas corresponden a la distribución de la línea base, formada por un gran número de lecturas de la línea base, y a la distribución de las partículas, formada por un número mucho menor de señales producidas por partículas de diferentes tamaños, incluso en el caso de partículas monodispersas.

Este enfoque no se ha seguido intencionadamente en la mayoría de las publicaciones citadas anteriormente, aunque su eficacia se ha demostrado para la detección de partículas [132]. La Figura 1.1.8 muestra la validez del enfoque propuesto para la detección de nanopartículas de plata de 97 nm en unas condiciones experimentales, donde el $LOD_{tamaño}$ era 91 nm y la mitad de la distribución de las nanopartículas se pudo detectar, confirmando la presencia de partículas de más de 91 nm presentes en la distribución original.

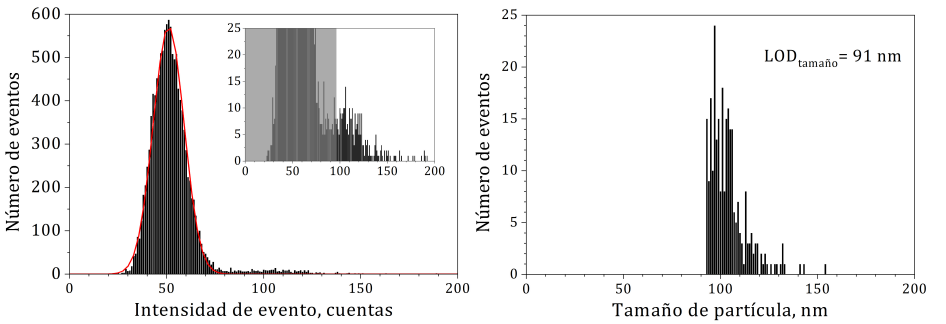


Figura 1.1.8. *Detección de AgNPs de 97 nm en las condiciones de trabajo donde* $LOD_{tamaño}$ *= 91 nm (Ag(I): 2 µg* L^{-1}*). Criterio LOD =* $Y_D = Y_C = Y_B + 5\sigma$ *(área gris).*

A la vista de los resultados obtenidos, se consideró adecuado mantener el mismo criterio para definir los valores críticos y los límites de detección correspondientes a tamaños o masa de elemento por partícula, y no entrar en conflicto con el uso rutinario que la comunidad de SP-ICP-MS viene haciendo. Una vez que se ha decidido el criterio para la estimación del LOD de tamaño y de masa por partícula, éste debe adaptarse al tipo de eventos de partículas implicados (pulsos o señales transitorias):

- T*iempos de lectura de milisegundos*:

Trabajando con tiempos de lectura de milisegundos, la masa total del elemento en la partícula es proporcional a la intensidad (altura) del pulso a través de la ecuación (3), y el LOD de masa por partícula se expresa como:

$$LOD_{masa} = X_C^{masa} = \frac{5\sigma_B}{K_{ICPMS}K_M} \qquad (26)$$

Para partículas sólidas, homogéneas y esféricas [ecuación (4)], la ecuación (26) puede expresarse como:

$$LOD_{tamaño} = X_C^{tamaño} = \left(\frac{30\,\sigma_B}{\pi\rho F_P K_{ICPMS} K_M}\right)^{1/3} \quad (27)$$

- *Tiempos de lectura de microsegundos*:

Cuando se trabaja con tiempos de lectura de microsegundos, los eventos de partículas son registrados como señales transitorias, cuyas alturas son proporcionales al tiempo de lectura, y son siempre más pequeñas que los mismos eventos registrados como pulsos. Usando la ecuación (18), las ecuaciones (26) y (27) pueden transformarse en:

$$LOD_{masa} = X_C^{masa} = \frac{5\sigma_B}{\frac{2}{w} K_{ICPMS} K_M t_{dwell}} \quad (28)$$

$$LOD_{tamaño} = X_C^{tamaño} = \left(\frac{30\,\sigma_B}{\frac{2}{w}\pi\rho F_P K_{ICPMS} K_M t_{dwell}}\right)^{1/3} \quad (29)$$

Los tiempos de lectura juegan un papel muy importante con relación al LOD de masa por partícula y de tamaño alcanzable. Cuando se trabaja con tiempos de lectura de milisegundos, las partículas son registradas como pulsos, cuya intensidad es independiente del tiempo de lectura. Por tanto, estos límites de detección están limitados por el ruido de la línea base y por la propia intensidad de la línea base. Para una velocidad de conteo de la línea base fija ($Y_{R,B}$) y considerando que $\sigma_B = \sqrt{Y_{R,B} t_{dwell}}$, los LOD de tamaño y masa por partícula disminuyen al disminuir la raíz cuadrada del tiempo de lectura [ecuación (26) y (27)]. Sin embargo, para tiempos de lectura de microsegundos, los LOD de tamaño y masa por partícula dependen de la intensidad máxima de las señales transitorias, lo que depende a su vez del tiempo de lectura utilizado y de la anchura de las señales. Para una anchura de la señal fija, esto significa que los LOD de tamaño y masa por partícula aumentan al disminuir con la raíz cuadrada del tiempo de lectura cuando se usan tiempos de lectura de microsegundos [ecuaciones (28) y (29)].

En la Figura 1.1.9 se representan los LOD de tamaño experimentales elevados al cubo frente a la raíz cuadrada y a la inversa de la raíz cuadrada del tiempo de lectura para tiempos de lectura de milisegundos (3 - 10 ms) y microsegundos (200 - 20 µs), respectivamente. Los resultados mostraron la relación predicha entre el tiempo de lectura y los LOD de tamaño para nanopartículas de plata. Estas medidas se realizaron con un instrumento comercial de cuadrupolo (NexION 2000B Perkin Elmer) equipado con sistema de introducción de muestra convencional (cámara ciclónica con un nebulizador concéntrico de vidrio).

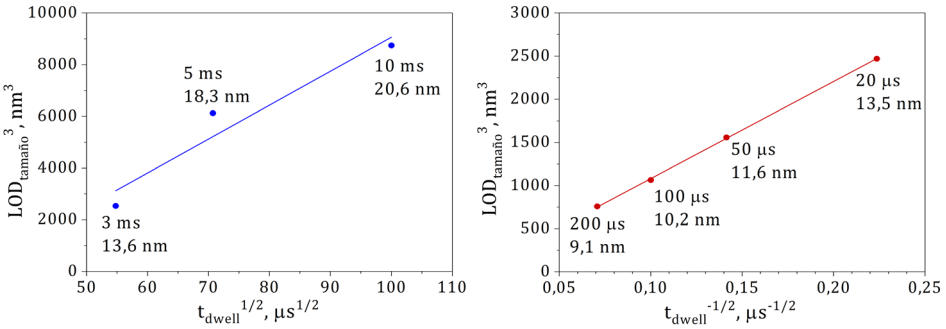


Figura 1.1.9. *Variaciones experimentales de los LOD de tamaño para AgNPs en función del tiempo de lectura. a) Milisegundos y b) microsegundos.*

Mientras que cuando se trabaja a tiempos de lectura de milisegundos se recomiendan tiempos de lectura pequeños, en el caso de microsegundos ocurre lo contrario. En ambos casos, la duración del evento de la partícula limita los tiempos de lectura adecuados. Como regla general, deberían usarse tiempos de lectura mayores del doble de la duración de los eventos cuando se trabaja a milisegundos para registrar los eventos de partícula como pulsos; mientras que a microsegundos, los tiempos de lectura deberían ser menores de la mitad de la duración del evento. Debido a estas razones, no se han considerado tiempos de lectura menores de 3 ms y mayores de 200 µs en la Figura 1.1.9, porque esos tiempos de lectura corresponden al límite entre ambos modos de registro, registrando eventos de partícula con 1 y 2 lecturas dentro de la misma medida. Finalmente, el rendimiento específico del instrumento ICP-MS juega un papel importante en los LOD de masa y tamaño a través de su eficiencia de detección y la duración de los eventos de partícula, que a su vez depende del plasma y de las condiciones de funcionamiento del espectrómetro de masas [133].

1.1.3.2.2. Valores críticos y límites de detección de concentración en número de partículas

El valor crítico para la discriminación de los eventos de partículas de los de línea base, descrito en términos de intensidad de señal [ecuación (6)], puede ser descrito en términos de número de eventos de partículas. Cuando se detectan eventos de partículas en un blanco, teniendo en cuenta que el conteo está gobernado por la estadística de Poisson y considerando medidas emparejadas de blanco y muestra, el valor crítico para la detección de partículas en términos de número de eventos es:

$$Y_{C,N} = Y_{N,B} + 2{,}33\sqrt{Y_{N,B}} \tag{30}$$

donde $Y_{N,B}$ (=$\sigma_{N,B}^2$) es el número promedio de eventos mayores que el valor crítico de la intensidad de la señal en el blanco, el cual corresponde a partículas detectadas.

Este valor crítico para la detección de partículas, que ha sido descrito en términos de número de eventos de partículas [ecuación (30)], puede expresarse como concentración en número de partículas ($X_C^{número}$):

$$X_C^{número} = \frac{2{,}33\ \sigma_{N,B}}{\eta_{neb} Q_{muestra} t_i} = \frac{2{,}33\ \sqrt{Y_{N,B}}}{\eta_{neb} Q_{muestra} t_i} \tag{31}$$

Por otro lado, si el criterio aplicado para la discriminación de eventos de partículas y de línea base garantiza que no se detectan partículas en un blanco que no contiene partículas (ausencia de falsos positivos), el conteo de los eventos correspondientes a partículas en una muestra puede ser considerado como un proceso de conteo ideal de Poisson con un blanco de cero, cuyo valor crítico es 0 y el valor de detección mínimo puede redondearse a 3 eventos de partícula [101].

El valor de detección mínimo puede relacionarse con el límite de detección de concentración en número ($LOD_{número}$) a través de la ecuación (2) [83]:

$$LOD_{número} = X_D^{número} = \frac{3}{\eta_{neb} Q_{muestra} t_i} \tag{32}$$

Si se detectan partículas en el blanco, la expresión convencional para α = β = 0,05 en medidas emparejadas (blanco restado) puede usarse para calcular el $LOD_{número}$ [101]:

$$LOD_{número} = \frac{4{,}65\sigma_{N,B} + 2{,}71}{\eta_{neb} Q_{muestra} t_i} \tag{33}$$

donde $\sigma_{N,B}$ es la desviación estándar del número de eventos contados en el blanco ($Y_{N,B}$). Esta se puede calcular a partir de una serie de medidas del blanco (por ejemplo, 10) o estimando a partir del número de partículas contadas ($\sigma_{N,B} = \sqrt{Y_{N,B}}$). Como el LOD sólo se usa como figura de mérito, la ecuación (33) puede simplificarse a:

$$LOD_{número} = \frac{5\sigma_{N,B} + 3}{\eta_{neb} Q_{muestra} t_i} \tag{34}$$

Si el criterio de discriminación no garantiza un bajo número de falsos positivos (por ejemplo, usando un criterio 3σ), los límites de detección de concentración en número se van a empeorar significativamente, afectando a la detectabilidad de las

partículas por encima del límite de detección. Por otro lado, el límite de detección de concentración en número depende también de la introducción de la muestra en el ICP-MS y del tiempo de adquisición, por lo que se puede mejorar aumentando el rendimiento de nebulización, mediante el aumento del caudal de muestra, y/o usando tiempos de adquisición mayores.

1.1.3.2.3. Valores críticos y límites de detección de concentración en masa de elemento disuelto

En el caso de instrumentos ICP-MS con detectores basados en multiplicadores de electrones secundarios, las distribuciones de la línea base siguen perfiles de Poisson, las cuales se tratan como Poisson-normal para valores promedio por encima de unas 5 cuentas. De acuerdo con las expresiones convencionales para el cálculo del límite de detección de concentración en masa de elemento disuelto (LOD_{dis}), se deben conocer los siguientes parámetros: la desviación estándar de la intensidad promedio de la línea base de un blanco ($\sigma_{\bar{B}}$) y la sensibilidad analítica (b). Dado que la sensibilidad analítica puede expresarse en cuentas como $K_R t_{dwell}$ (la ecuación (1) implica señales expresadas en cuentas por segundo), se deduce la siguiente expresión:

$$LOD_{dis} = X_D^{dis} = \frac{3\sigma_{\bar{B}}}{K_R t_{dwell}} \tag{35}$$

En el caso de distribuciones de la línea base del blanco, a pesar de su naturaleza de Poisson, sus medias pueden considerarse normalmente distribuidas debido al teorema del límite central, con $\sigma_{\bar{B}} = \sigma_B/\sqrt{m}$, siendo m el número de lecturas de la línea base. Por tanto, el límite de detección puede expresarse como:

$$LOD_{dis} = \frac{3\sqrt{Y_{R,B}}}{K_R\sqrt{t_i}} \tag{36}$$

considerando $\sigma_{\bar{B}} = \sqrt{Y_B} = \sqrt{Y_{R,B}\, t_{dwell}}$, donde $Y_{R,B}$ es la intensidad de la línea base del blanco expresada en cuentas por segundo, y m es igual al número total de lecturas ($=t_i/t_{dwell}$), ya que en la práctica las lecturas correspondientes a partículas representan menos del 5% del número total de lecturas. $\sigma_{\bar{B}}$ puede calcularse a partir de un número de medidas replicadas de la línea base del blanco (por ejemplo, 10) o estimándose a partir de la intensidad de la línea base ($Y_{R,B}$).

La ecuación (36) muestra que los límites de detección para la fracción disuelta son independientes del tiempo de lectura utilizados y, para cada isótopo y dada una intensidad de la línea base del blanco, sólo dependen del tiempo de adquisición total

y, por tanto, del número de cuentas acumuladas durante ese tiempo (ΣY_B), que en última instancia, controlan la desviación estándar de la línea base del blanco. Aunque la evaluación de la ecuación (36) requeriría un gran número de réplicas para confirmar empíricamente la validez del teorema del límite central, la Tabla 1.1.6 muestra las desviaciones estándar experimentales de la línea base del blanco y los límites de detección tras medir un número razonable de réplicas (10) y tiempos de lecturas desde 20 a 100 µs. Los resultados de la Tabla 1.1.6 confirman que, a pesar de que los tiempos de lectura abarcan casi un orden de magnitud, los límites de detección se encuentran en el mismo orden. Esto es debido a que las cuentas acumuladas de la línea base del blanco durante el tiempo de adquisición (60 s) fueron similares para los tres tiempos de lectura considerados (aproximadamente 2200 cuentas) y, por tanto, sus desviaciones estándar relativas (2,0 - 3,0%) están en concordancia con la esperada (2,1%). Esto demuestra que la capacidad de detección de elementos disueltos no depende del tiempo de lectura seleccionado y puede ser mejorado aumentando el tiempo de adquisición total. Estas medidas se realizaron con un instrumento comercial de cuadrupolo (NexION 2000B Perkin Elmer) equipado con sistema de introducción de muestra convencional (cámara ciclónica con un nebulizador concéntrico de vidrio).

Tabla 1.1.6. *Límites de detección teóricos y experimentales de concentración en masa del elemento disuelto (LOD_{dis}) para plata (^{107}Ag) medida en SP-ICP-MS a diferentes tiempos de lectura. Tiempo total de adquisición: 60s. Número de réplicas: 10.*

Tiempo de lectura µs	Número de lecturas	$Y_{R,B}$ cps	ΣY_B cuentas	$\sigma_{\bar{B}}$ cuentas	$RSD_{\bar{B}}$ %	K_R cps (µg L^{-1})$^{-1}$	LOD_{dis} teórico ng L^{-1}	LOD_{dis} experimental ng L^{-1}
100	600 000	36 ± 1	2160 ± 60	$1{,}07 \times 10^{-4}$	2,97	$8{,}95 \times 10^{4}$	0,026	0,036
50	1 200 000	38 ± 1	2280 ± 60	$3{,}87 \times 10^{-5}$	2,04	$9{,}01 \times 10^{4}$	0,026	0,026
20	3 000 000	38 ± 1	2280 ± 60	$2{,}12 \times 10^{-5}$	2,79	$9{,}03 \times 10^{4}$	0,026	0,035

1.1.3.2.4. Sumario de expresiones de cálculo

La Tabla 1.1.7 resume las expresiones propuestas para los valores críticos y límites de detección implicados en SP-ICP-MS. Mientras que los valores críticos se utilizan como límites de decisión *a posteriori* en términos relacionados con la presencia de partículas y elemento disueltos en una muestra, los límites de detección se usan *a priori* como figuras de mérito de los métodos.

Tabla 1.1.7. *Expresiones para el cálculo de los valores críticos y los límites de detección en SP-ICP-MS.*

Dominio	**Señales de pulso**		**Señales transitorias**	
Masa por partícula	$X_C^{masa} = X_D^{masa} =$	$\frac{5\sigma_B}{K_{ICPMS}K_M}$ $\frac{5\sqrt{Y_B}}{K_{ICPMS}K_M}$	$X_C^{masa} = X_D^{masa} =$	$\frac{5\sigma_B}{\frac{2}{w}K_{ICPMS}K_M t_{dwell}}$ $\frac{5\sqrt{Y_B}}{\frac{2}{w}K_{ICPMS}K_M t_{dwell}}$
Tamaño de partícula	$X_C^{tamaño} = X_D^{tamaño} =$	$\left(\frac{30\,\sigma_B}{\pi\rho F_P K_{ICPMS}K_M}\right)^{1/3}$ $\left(\frac{30\,\sqrt{Y_B}}{\pi\rho F_P K_{ICPMS}K_M}\right)^{1/3}$	$X_C^{tamaño} = X_D^{tamaño} =$	$\left(\frac{30\,\sigma_B}{\frac{2}{w}\pi\rho F_P K_{ICPMS}K_M t_{dwell}}\right)^{1/3}$ $\left(\frac{30\,\sqrt{Y_B}}{\frac{2}{w}\pi\rho F_P K_{ICPMS}K_M t_{dwell}}\right)^{1/3}$
Dominio	**Señales de pulso y transitorias**			
Concentración en número	$X_C^{número} =$	$\frac{2{,}33\sigma_{N,B}}{\eta_{neb}Q_{muestra}t_i}$ $\frac{2{,}33\sqrt{Y_{N,B}}}{\eta_{neb}Q_{muestra}t_i}$	$X_D^{número} =$	$\frac{5\sigma_{N,B}+3}{\eta_{neb}Q_{muestra}t_i}$ $\frac{5\sqrt{Y_{N,B}}+3}{\eta_{neb}Q_{muestra}t_i}$
Concentración en masa del elemento disuelto	$X_C^{dis} =$	$\frac{1{,}64\sigma_{\overline{B}}}{K_R t_{dwell}}$ $\frac{1{,}64\sqrt{Y_{R,B}}}{K_R\sqrt{t_i}}$	$X_D^{dis} =$	$\frac{3\sigma_{\overline{B}}}{K_R t_{dwell}}$ $\frac{3\sqrt{Y_{R,B}}}{K_R\sqrt{t_i}}$

Su cálculo requiere conocer diferentes parámetros teóricos y experimentales incluidos en los denominadores y la correspondiente desviación estándar del blanco. El término blanco debe entenderse en un amplio sentido, aplicando tanto blancos de reactivos como de matriz, que conducen a los respectivos valores críticos o límites de detección instrumentales y metodológicos. Alternativamente, las desviaciones estándar pueden estimarse como la raíz cuadrada de los valores promedio ($\sigma = \sqrt{Y}$) por el comportamiento Poissoniano de las medidas. Esta última expresión no se aplicaría a los límites de detección de tamaño y masa por partícula cuando la intensidad de la línea base exceda un cierto valor, ya que entonces habría que añadir la contribución adicional del ruido de parpadeo. Entonces, la desviación estándar se consideraría como $\sigma_B = \sqrt{Y_B + \xi^2 Y_B^2}$, donde ξ es el coeficiente del ruido de parpadeo [134]. Este coeficiente y la intensidad de la línea base por encima de la cual el coeficiente se vuelve significativo dependen del detector. En las condiciones de este trabajo, utilizando instrumentos de ICP-MS de cuadrupolo con multiplicadores de electrones, se obtuvieron coeficientes del ruido de parpadeo de 0,04, los cuales se vuelven relevantes por encima de 10 - 100 cuentas.

Como se ha explicado anteriormente, los límites de detección y los valores críticos de tamaño y masa por partícula se calculan a partir de las mismas expresiones. En el caso de los de concentración en número, el límite de detección mínimo se calcula con la expresión (32) en condiciones en las que no se detectan partículas en el blanco. Si se detectan partículas en el blanco, se debe aplicar un criterio 2,33σ para establecer un valor crítico que permita tomar la decisión sobre la presencia o ausencia de partículas; mientras que se aplica un criterio 5σ + 3 para estimar el límite de detección. Este criterio se aplica a medidas emparejadas gobernadas por la estadística de Poisson, el cual es el caso del conteo de partículas.

Respecto a los conceptos relacionados con el elemento disuelto, el valor crítico y el límite de detección de concentración en masa se calculan mediante el criterio 1,64σ y 3σ, respectivamente, asumiendo que se conoce la línea base promedio de los blancos y que éstos siguen distribuciones normales.

1.1.3.2.5. Límites de detección estimados para SP-ICP-MS

La Tabla 1.1.8 recoge los límites de detección estimados de tamaño para distintos metales y óxidos para un instrumento comercial de cuadrupolo (NexION 2000B Perkin Elmer) equipado con sistema de introducción de muestra convencional (cámara ciclónica con un nebulizador concéntrico de vidrio) en las condiciones experimentales de la Tabla 1.1.2 (rendimiento de nebulización: 5%, duración (anchura) de los eventos de partículas: 500 μs). Más del 50% de los elementos mostraron $LOD_{tamaño}$ por debajo de 10 nm, para nanopartículas metálicas y de óxidos, con $LOD_{tamaño}$ por debajo de 5 nm para algunos óxidos de tierras raras debido a los bajos niveles de línea base y a la alta sensibilidad.

Respecto a la concentración del elemento disuelto, se obtuvieron LOD_{dis} del orden de picogramos por litro, más bajos que usando un ICP-MS en modo estándar. Esto se debe a que los tiempos de adquisición total usados en SP-ICP-MS son del rango de minutos, mientras que en el modo estándar los isótopos se monitorizan durante segundos (por ejemplo, 1 segundo cuando se mide con un tiempo de lectura de 50 ms y 20 barridos). El incremento del tiempo de adquisición implica un incremento proporcional de las cuentas registradas, mientras que la desviación estándar incrementa con la raíz cuadrada de la señal, lo que produce una reducción de los límites de detección proporcional a la raíz cuadrada del tiempo de adquisición. De cualquier manera, los LOD mostrados en la Tabla 1.1.8 son límites de detección instrumentales y deben considerarse como el mejor escenario para el análisis en SP-ICP-MS.

Tabla 1.1.8. *LOD de tamaño de partícula y concentración en masa del elemento disuelto.*

Elemento	Isótopo	Composición de partícula	K_R [a] cps (µg L^{-1})$^{-1}$	$Y_{R,B}$ [a] cps	$LOD_{tamaño}$ [b] nm		LOD_{dis} [d] ng L^{-1}
					t_{dwell} = 5 ms	t_{dwell} = 100 µs [c]	
Ag	107	Ag	62644	203	17,4	12,3	0,09
Al	27	Al	140231	1771	29,9	21,2	0,1
		Al_2O_3			32,6	23,0	
As	75	As	10876	24	26,7	18,9	0,2
		As_2O_3			33,7	23,9	
Au	197	Au	27343	21	12,7	9,0	0,06
B	11	B	26333	4745	60,3	42,7	1,0
		B_2O_3			93,8	66,3	
Ba	137	Ba	22924	34	26,0	18,4	0,1
		$BaSO_4$			28,6	20,2	
Be	9	Be	15758	1	18,6	13,1	0,02
Bi	209	Bi	131040	15	9,0	6,3	0,01
		Bi_2O_3			9,6	6,8	
Ca	44	Ca	147864	11780	48,5	34,3	0,3
		CaO			42,0	29,7	
		$CaCO_3$			54,6	38,6	
Cd	111	Cd	14972	2	14,1	10,0	0,04
		CdSe			19,3	13,6	
Ce	140	Ce	108913	7	9,6	6,8	0,01
		CeO_2			9,8	7,0	
Co	59	Co	103622	270	16,2	11,5	0,06
		CoO			19,6	13,9	
		Co_3O_4			20,4	14,4	
Cr	52	Cr	89534	84751	47,8	33,8	1,3
		Cr_2O_3			60,3	42,6	
Cu	65	Cu	26502	58	19,7	14,0	0,1
		CuO			24,2	17,1	
Dy	163	Dy	37892	0,1	6,1	4,3	0,003
		Dy_2O_3			6,6	4,7	
Er	166	Er	51046	0,1	5,5	3,9	0,002
		Er_2O_3			5,8	4,1	
Eu	153	Eu	74744	0,3	6,9	4,9	0,003
		Eu_2O_3			6,5	4,6	
Gd	157	Gd	30872	0,1	6,7	4,8	0,004
		Gd_2O_3			7,2	5,1	
Hf	180	Hf	54727	2	7,6	5,4	0,009
		HfO_2			9,0	6,3	
Hg	5	Hg	2209	98	43,0	30,4	1,7
Ho	165	Ho	149531	0,1	3,8	2,7	0,001
		Ho_2O_3			4,1	2,9	

Elemento	Isótopo	Composición de partícula	K_R [a] cps (µg L^{-1})$^{-1}$	$Y_{R,B}$ [a] cps	$LOD_{tamaño}$ [b] nm		LOD_{dis} [d] ng L^{-1}
					t_{dwell} = 5 ms	t_{dwell} = 100 µs [c]	
In	115	In	171019	6	7,7	5,4	0,005
		In_2O_3			8,2	5,8	
		$In(OH)_3$			10,3	7,3	
Ir	193	Ir	79601	4	6,5	4,6	0,01
La	139	La	568165	2,1	4,6	3,3	0,001
		La_2O_3			4,8	3,4	
Li	7	Li	62259	85	40,6	28,7	0,06
Lu	175	Lu	152549	0,1	3,7	2,6	0,001
		Lu_2O_3			3,9	2,8	
Mg	24	Mg	188923	4782	37,0	26,2	0,1
		MgO			33,6	23,8	
Mn	55	Mn	146823	1181	19,6	13,9	0,09
		Mn_2O_3			26,2	18,5	
Mo	95	Mo	19064	3	12,7	9,0	0,03
		MoO_3			18,8	13,3	
Na	23	Na	210199	47730	63,7	45,0	0,4
Nd	143	Nd	15940	0,9	12,8	9,0	0,02
		Nd_2O_3			13,1	9,3	
Ni	60	Ni	21914	36	19,5	13,8	0,1
		NiO			23,3	16,5	
Pb	208	Pb	80277	175	15,2	10,7	0,06
		PbO			16,5	11,7	
Pd	105	Pd	30498	5	11,4	8,1	0,03
Pr	141	Pr	131954	0,9	6,3	4,5	0,003
		Pr_6O_{11}			6,8	4,8	
Pt	195	Pt	24533	0	5,3	3,7	0,005
Rh	103	Rh	157201	2	5,7	4,0	0,004
		Rh_2O_3			7,0	4,9	
Ru	101	Ru	26899	2	9,7	6,9	0,02
		RuO_2			12,9	9,1	
Sb	121	Sb	33214	8	14,6	10,3	0,03
		Sb_2O_3			16,7	11,8	
		Sb_2O_5			19,3	13,6	
Sc	45	Sc	80869	2507	36,6	25,9	0,2
		Sc_2O_3			38,8	27,4	
Se	82	Se	1816	194	72,8	51,5	3,0
Si	29	Si	10969	120537	148,5	105,0	12,3
		SiO_2			183,3	129,6	
Sm	147	Sm	19342	0,9	11,6	8,2	0,02
		Sm_2O_3			12,2	8,6	
Sn	118	Sn	40690	257	23,5	16,6	0,2
		SnO_2			25,9	18,3	

Elemento	Isótopo	Composición de partícula	K_R [a] cps (µg L^{-1})$^{-1}$	$Y_{R,B}$ [a] cps	$LOD_{tamaño}$ [b] nm		LOD_{dis} [d] ng L^{-1}
					t_{dwell} = 5 ms	t_{dwell} = 100 µs [c]	
Sr	88	Sr	174518	264	20,7	14,6	0,04
		$SrCO_3$			22,1	15,6	
Tb	159	Tb	153955	0,1	3,9	2,8	0,001
		Tb_4O_7			4,3	3,0	
Te	125	Te	3237	1	22,0	15,6	0,1
		TeO_2			24,5	17,3	
Ti	47	Ti	8757	43	34,0	24,1	0,3
		TiO_2			41,4	29,3	
Tl	205	Tl	112528	12	8,6	6,1	0,01
		Tl_2O_3			9,4	6,6	
Tm	169	Tm	157368	0,3	4,5	3,2	0,001
		Tm_2O_3			4,8	3,4	
V	51	V	109688	441	19,6	13,9	0,07
		V_2O_3			24,1	17,0	
Y	89	Y	107231	5	10,4	7,3	0,008
		Y_2O_3			10,8	7,6	
Yb	173	Yb	25406	0,2	8,4	6,0	0,007
		Yb_2O_3			8,0	5,7	
Zn	66	Zn	35387	1479	33,3	23,5	0,4
		ZnO			38,7	27,4	

[a] Agua ultrapura

[b] ICP-MS cuadrupolo. Eficiencia de transporte: 5% (cámara ciclónica y nebulizador concéntrico). Caudal de introducción de muestra: 0,4 L min^{-1}.

[c] Duración (anchura) de los eventos de partícula: 500 µs

[d] Tiempo de adquisición total: 60 s

La Tabla 1.1.9 muestra los límites de detección mínimos de concentración en número con distintos sistemas de introducción de muestra, calculados a través de la ecuación (32). Estos LOD están en el rango de 100 - 500 partículas por mL para tiempos de adquisición de un minuto. Como puede verse, las mejoras en el rendimiento de nebulización con sistemas de nebulización neumática no resultaron en una reducción de los LOD debido a que se requiere un menor caudal de introducción de muestra. La forma más adecuada de mejorar los LOD es aumentando el tiempo de adquisición.

Tabla 1.1.9. *LOD de concentración en número para diferentes sistemas comerciales de introducción de muestras.*

Sistema de introducción de muestra	η_{neb} %	$Q_{muestra}$ mL min^{-1}	$LOD_{número}$[(a)] L^{-1}
Cámara ciclónica + nebulizador concéntrico (Glass Expansion)	2,6	1,1	1,0x10^5
Cámara ciclónica + nebulizador concéntrico (Meinhard)	5,3	0,4	1,4x10^5
Cámara Asperon™ + nebulizador concéntrico de alta eficiencia (Meinhard)	37,7	0,016	4,9x10^5

(a) Tiempo total de adquisición: 60 s

1.1.4. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado una estrategia relacionada con la detectabilidad de SP-ICP-MS, y aunque en la bibliografía se han propuesto diferentes criterios para la identificación de los eventos de partículas sobre la línea base, se ha seleccionado un valor crítico basado en el criterio 5σ (σ: desviación estándar de la línea base) para eliminar o minimizar el riesgo de falsos positivos sin comprometer la detección de las partículas pequeñas, cuando se trabaja con tiempos de lectura de milisegundos. En el caso de microsegundos, se podría añadir un término de seguridad (ε = 1) al criterio 5σ de forma práctica para que los falsos positivos sean despreciables en situaciones con intensidades promedio de la línea base a partir de 1 cuenta y un millón de lecturas o más. Por otro lado, la existencia de eventos de partículas en el blanco limita las capacidades de SP-ICP-MS para confirmar la presencia de partículas. Se ha propuesto un criterio 2,33σ (σ: desviación estándar del número de partículas contadas en el blanco) debido a la naturaleza emparejada de las medidas de SP-ICP-MS. El enfoque desarrollado armoniza los conceptos y expresiones de los valores críticos y límites de detección de SP-ICP-MS en los distintos dominios involucrados en la detección de partículas. Finalmente, se ha realizado una estimación de los distintos límites de detección que se pueden conseguir para distintos elementos/partículas con distintos sistemas de introducción de muestras en instrumentos comerciales de cuadrupolo.

1.2. SP-ICP-MS COMO MÉTODO DE *SCREENING*

1.2.1. INTRODUCCIÓN

SP-ICP-MS es una técnica que proporciona información cuantitativa sobre el tamaño y la concentración en número cuando las partículas producen distribuciones de tamaño por encima de los límites de detección del método. De lo contrario, se obtienen distribuciones parciales [135–138] o solamente pulsos aislados sobre la línea base [139–141]. En estos casos, las concentraciones en número se subestiman y la información de tamaño/masa por partícula que se puede obtener es limitada y, por tanto, debería considerarse cualitativa, confirmando la presencia de partículas por encima de un determinado tamaño. Debido a esto, SP-ICP-MS ha sido considerada como una técnica de cribado (*screening*) por distintos autores [142–144], aunque hasta ahora no se ha realizado un tratamiento metrológico ni su validación como método de *screening*.

Cuando SP-ICP-MS se usa como método de *screening* para la detección de partículas, el objetivo es determinar su ausencia o presencia en una muestra. Por tanto, a partir de un barrido de tiempo, que debe ser procesado convenientemente, se debe obtener una respuesta binaria del tipo sí/no, positivo/negativo o presente/ausente. Mientras que un método cualitativo convencional implica manejar una señal relacionada con la composición química del analito, en el caso de partículas, las señales tienen que estar relacionadas también con su tamaño [145]. Respecto a la composición, ICP-MS proporciona información sobre la presencia de elementos, y al trabajar en modo de detección de partículas individuales lo hace partícula a partícula. La información cualitativa sobre la presencia de partículas proporcionada por SP-ICP-MS va a tener también un cierto carácter cuantitativo, ya que sólo si la concentración en número de partículas es superior a un determinado valor y las partículas contienen una cantidad de elemento (o tienen un tamaño) mayor a un determinado valor, la respuesta será positiva.

Los objetivos principales de este apartado se centran en la evaluación y validación de la técnica de SP-ICP-MS como método de *screening* para la detección de nanopartículas en suspensiones. Estos objetivos implican la aplicación de criterios metrológicos y de conceptos relacionados con la detectabilidad en SP-ICP-MS desarrollados en el Apartado 1.1. El método de *screening* se aplicará a la detección de partículas de oro, plata y aluminio en muestras alimentarias que contienen aditivos metálicos.

1.2.2. EXPERIMENTAL

1.2.2.1. Instrumentación

El análisis mediante la técnica de detección individual de partículas (SP-ICP-MS) se realizó con el espectrómetro de masas con fuente de ionización de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) Perkin Elmer ELAN DRC-e, descrito en el capítulo de detectabilidad y límites de detección (Capítulo 1.1). El sistema de introducción de muestra y los parámetros instrumentales y de adquisición se corresponden con los descritos en el Apartado 1.1.2.1 del Capítulo 1.1. Los isótopos monitorizados fueron ^{107}Ag, ^{197}Au y ^{27}Al.

1.2.2.2. Estándares y reactivos

Las suspensiones de nanopartículas de oro y de plata utilizadas procedían de nanoComposix (nanoComposix, St. Diego, EE.UU.) y estaban estabilizadas con citrato. Los diámetros nominales de las nanopartículas de oro y de plata eran 103 ± 10 nm y 97 ± 11 nm, respectivamente.

Las disoluciones acuosas de oro, plata y aluminio se prepararon a partir de una disolución estándar de 1000 mg L^{-1} (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) y se diluyeron en agua ultrapura (18 MΩ cm de resistividad), obtenida a partir de un equipo de purificación Milli-Q (Millipore Co., Bedford, EE. UU.) o Tween 20 al 0,1% (*v/v*).

Los rendimientos de nebulización se determinaron con patrones de nanopartículas monodispersas de oro estabilizadas con polietilenglicol (PEG 0,8 kDa), procedentes de nanoComposix, y con un diámetro nominal de 99,4 ± 3,0 nm.

La preparación de las suspensiones de nanopartículas y de las suspensiones se prepararon de la misma manera que en el Apartado 1.1.2.2 del Capítulo 1.1.

1.2.2.3. Muestras

Se analizaron cuatro productos comerciales a lo largo de este estudio. Dos de los productos eran unas perlas de azúcar con un recubrimiento plateado que se usan para decoración en pastelería. Unas perlas estaban recubiertas de plata y otras de aluminio, conteniendo E174 (plata) o E173 (aluminio), respectivamente, además de otros ingredientes. Ambos tipos de perlas tenían un diámetro de 4 mm, con una composición de azúcar y almidón. Perlas sin recubrimiento, del mismo tamaño y del mismo fabricante se usaron como blancos de matriz.

Los otros dos productos consistían en materiales pulverulentos utilizados con fines decorativos en pastelería para proporcionar acabados metálicos plateados o dorados. Según la etiqueta, cada producto contenía aditivos alimentarios de plata metálica (E174) u oro (E175), respectivamente, además de mica y otros componentes.

1.2.2.4. Procedimientos

1.2.2.4.1. Liberación de partículas a partir de perlas de decoración

Para realizar los experimentos de liberación de partículas, se pesaron con precisión (± 0,1 mg) 5 perlas de azúcar recubiertas con aluminio o plata (250 – 300 mg) y se pusieron en tubos de polietileno. Se añadieron 50 mL de agua ultrapura y se agitaron en un agitador orbital analógico Heidolph Reax 2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) durante 2 horas a 45 rpm, temperatura ambiente y en oscuridad. Tras este período, las suspensiones se centrifugaron durante 12 min a 500 rpm o 7 min a 1500 rpm (centrífuga Heraeus Multifuge X1R equipada con un rotor oscilante (Thermo Fisher Scientific, Walthman, EE.UU.)) para eliminar, según su tamaño, partículas metálicas de plata o aluminio mayores de 1 µm, respectivamente. Los sobrenadantes se diluyeron 1:5 en agua ultrapura y las suspensiones sobrenadantes se sonicaron durante 1 min en un baño de ultrasonidos (Ultrasons, J.P. Selecta, Barcelona, España) y se midieron mediante SP-ICP-MS.

Para las muestras control de la matriz alimentaria, se puso una perla blanca sin recubrimiento (50 mg) en un tubo de polietileno y se añadieron 50 mL de agua ultrapura. La mezcla se agitó durante 2 horas a 45 rpm, temperatura ambiente y en oscuridad, y posteriormente se centrifugó durante 12 min a 500 rpm y 20^0C. Los sobrenadantes se sonicaron durante 1 min en un baño de ultrasonidos y se midieron mediante SP-ICP-MS.

1.2.2.4.2. Análisis de materiales pulverulentos para decoración

Para realizar los análisis de los materiales en polvo, se pesaron con precisión 50 mg de cada uno de ellos en tubos de polietileno. Se añadieron 50 mL de Tween 20 al 0,1% (*v/v*) y se agitaron vigorosamente. Las mezclas se centrifugaron durante 10 min a 5000 rpm, y tras esto, se sonicaron durante 5 min. Tras este período, las suspensiones se centrifugaron durante 12 min a 5000 rpm para eliminar las partículas mayores de 1 µm. Los sobrenadantes se sonicaron durante 1 min en un baño de ultrasonidos y se midieron mediante SP-ICP-MS.

1.2.2.4.3. Procesamiento de datos de SP-ICP-MS

Las suspensiones se midieron en modo de partículas individuales usando un tiempo de lectura de 5 ms con un tiempo de adquisición total de 60 s y registrando 12.000 lecturas por barrido de tiempo (Tabla 1.1.2). Debido a que la velocidad de adquisición de datos del instrumento está limitada por la capacidad de la memoria RAM del ordenador, se midieron al menos dos isótopos con el fin de utilizar el tiempo de asentamiento para vaciar la memoria. Esta estrategia permite reducir los tiempos de lectura a 5 ms usando un tiempo de asentamiento de 3 ms.

Los análisis de *screening* se realizaron midiendo por triplicado un blanco de la muestra. Los datos brutos del barrido de tiempo de los blancos y de las muestras se procesaron para discriminar las lecturas de partículas y de línea base aplicando un criterio 5σ iterativo utilizando una versión modificada de la herramienta de cálculo de partículas individuales desarrollada por RIKILT [105]. A partir de los barridos de tiempo procesados de los blancos, se obtuvo el número promedio de partículas ($Y_{N,B}$) y el valor crítico para la detección de partículas [Ecuación (12)]. Este valor crítico se comparó con el número de partículas detectadas en los barridos de tiempo procesados de las muestras para confirmar la presencia o ausencia de partículas en la muestra.

El rendimiento de nebulización del analito se calculó de acuerdo a los métodos desarrollados por Pace *et al*. [88], usando el estándar de nanopartículas de oro de 100 nm descrito anteriormente. Se obtuvieron resultados similares para el método de la frecuencia y el método del tamaño (3,15 ± 0,11 % y 3,09 ± 0,15 %, respectivamente, n = 3). Los caudales de muestra se midieron gravimétricamente por triplicado.

1.2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.2.3.1. Discriminación de eventos de partículas/línea base y detección de partículas

Como se ha visto anteriormente, el primer paso y uno de los más importantes, en SP-ICP-MS es la identificación de los eventos de partículas en un barrido de tiempo, lo que conlleva la aplicación de un valor crítico para la discriminación de los eventos de línea base y de partículas, y de un valor crítico para la detección de partículas. La Tabla 1.2.1 recoge los valores críticos obtenidos para unas medidas en las que se analizó oro, plata y aluminio en agua ultrapura y en unas muestras control (blanco) compuestas por una matriz alimentaria (Apartado 1.2.2.4.1). Excepto en el

caso del aluminio en la muestra de matriz alimentaria, las señales de la línea base fueron menores de 1 cuenta (promedio de 10 medidas), lo que da unas desviaciones estándar promedio experimentales en concordancia con el comportamiento de Poisson esperado. Los valores críticos para la identificación de eventos de partícula en los barridos de tiempo se calcularon a partir de la ecuación (6) con k = 5, siendo igual a 2 cuentas, excepto en el caso del aluminio en la matriz alimentaria debido al alto nivel de la línea base. Tras aplicar el criterio 5σ, los eventos de partícula detectados fueron menores de 10, y en la mayoría de los casos, estaban por debajo de 5. Como puede verse en la Figura 1.2.1, los eventos obtenidos pueden considerarse falsos positivos derivados de la propia línea base y no por la presencia de verdaderas partículas en el blanco. Los valores críticos brutos para la detección de partículas se calcularon a partir de la ecuación (30), mientras que los valores cítricos netos se obtuvieron restando el número promedio de eventos de partículas del blanco al valor crítico bruto. En todos los casos, los valores críticos se expresaron como números enteros redondeados por exceso debido a la naturaleza discreta de los eventos de partículas. En general, solo se necesitaron más de 6 - 8 eventos para confirmar la presencia de partículas, excepto en el caso del aluminio, donde se necesitaron más de 16 eventos.

Tabla 1.2.1. *Valores críticos para la discriminación de eventos de partículas y de línea base y valores críticos para la detección de partículas en agua ultrapura y una muestra control de matriz alimentaria para oro, plata y aluminio (n=10).*

		^{197}Au		^{107}Ag		^{27}Al	
		Agua ultrapura	**Matriz alimentaria**	**Agua ultrapura**	**Matriz alimentaria**	**Agua ultrapura**	**Matriz alimentaria**
Límite de la línea base							
Señal de la línea base	Y_B (cuentas)	0,105	0,093	0,054	0,070	0,106	2,251
Desviación estándar (exp.)	σ_B (cuentas)	0,336	0,308	0,236	0,280	0,330	1,593
Desviación estándar (teor.)	σ_B (cuentas)	0,323	0,305	0,232	0,265	0,326	1,500
Valor crítico	Y_C (cuentas)	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	11 ± 2
Valor crítico de tamaño [(a)]	$X_C^{tamaño}$ (nm)	25	25	28	31	48	81
Detección de partículas							
Eventos de partícula en el blanco	$Y_{N,B}$ (eventos)	2,80	3,36	2,60	2,19	8,17	3,93
Desviación estándar (exp.)	$\sigma_{N,B}$ (eventos)	1,62	2,90	1,43	1,50	2,89	2,10
Desviación estándar (teor.)	$\sigma_{N,B}$ (eventos)	1,67	1,83	1,61	1,48	2,86	1,98
Valor crítico	$Y_{C,N}$ (eventos)	7	8	7	6	16	8
Valor crítico neto	$S_{C,N}$ (eventos)	4 ± 2	4 ± 2	4 ± 1	3 ± 1	7 ± 1	4 ± 2
Valor crítico de concentración en número	$X_C^{número}$(L^{-1})	1,36x10^5	1,49x10^5	1,31x10^5	1,20x10^5	2,32x10^5	1,61x10^5

[(a)] Diámetro de partículas metálicas, sólidas y esféricas

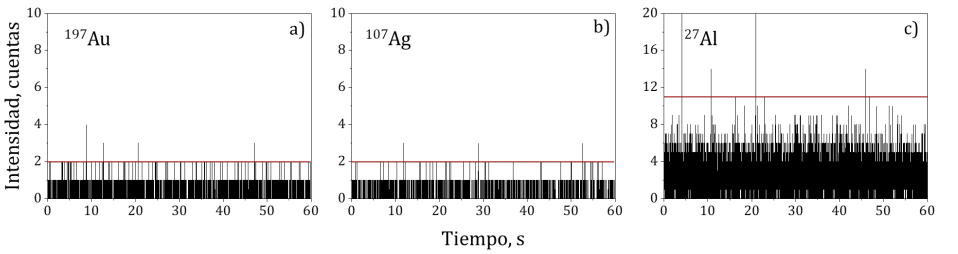


Figura 1.2.1. *Barridos de tiempo de la muestra control (blanco) de matriz alimentaria para a) oro, b) plata y c) aluminio. Línea roja: valores críticos para la identificación de eventos de partícula (criterio 5σ).*

1.2.3.2. Valores críticos de tamaño y concentración en número

Los valores críticos de tamaño se estimaron de acuerdo con el criterio 5σ usado para la discriminación de los eventos de línea base y de partículas para un tiempo de lectura de milisegundos. La aplicación de las ecuaciones (22), (23) y (31) implica que la detección de partículas se limitaría a muestras que contienen más de, aproximadamente, 200 partículas por mililitro con tamaños por encima de 25 - 30 nm para el caso del oro y la plata, y de 50 - 80 nm para el aluminio, en las condiciones instrumentales utilizadas en este trabajo.

Los métodos de *screening* cualitativos se desarrollan principalmente para evaluar un nivel de concentración máximo permitido [146], pero también pueden usarse para evaluar un nivel de concentración mínimo [147]. Este es el caso de la evaluación de la presencia de partículas a partir de la determinación del número de falsos positivos utilizando las ecuaciones (22), (23) y (31).

La reducción del valor crítico de tamaño requeriría una mejora de la sensibilidad mediante la mejora de la eficiencia de detección del instrumento, o la reducción de la desviación estándar de la línea base, la cual puede conseguirse reduciendo la intensidad de la línea base, por ejemplo, trabajando con tiempo de lectura menores. En cualquier caso, la presencia de especies disueltas del elemento presente en las muestras contribuye a aumentar los niveles de la línea base, incrementando el valor crítico de tamaño e impidiendo la detección de partículas pequeñas.

Por otro lado, la reducción de los valores críticos de concentración en número requiere el aumento del tiempo total de adquisición, ya que las mejoras del rendimiento de nebulización suelen implicar una reducción del caudal de la muestra, lo cual anula el efecto.

1.2.3.3. Validación del método

En una primera aproximación, un método de *screening* basado en SP-ICP-MS para la detección de partículas debe contestar a la pregunta: ¿hay partículas en la muestra? Sin embargo, las connotaciones cuantitativas de cualquier método instrumental cualitativo transforman la pregunta en: ¿hay partículas por encima de un cierto tamaño y concentración en la muestra? En cualquier caso, la validación de dicho método debe incluir la evaluación de una serie de parámetros analíticos. Aunque no hay un método único para la validación de métodos cualitativos convencionales [147], varios documentos e informes han tratado el tema [103,146,148,149] y Linsinger *et al*. han propuesto un posible planteamiento para la detección y cuantificación de nanopartículas en alimentos [145]. Teniendo en cuenta estas fuentes, la estrategia de validación de SP-ICP-MS como método de *screening* ha incluido los siguientes parámetros: límites de decisión (valor crítico) en términos de concentración en número y tamaño, región de incertidumbre, ratio de falsos positivos y falsos negativos, sensibilidad, especificidad y selectividad.

El nivel de concentración en número mínimo puede evaluarse mediante el valor crítico o límite de decisión calculado con la ecuación (31) [145,149]. La Tabla 1.2.1 recoge los valores críticos obtenidos para los diferentes elementos en dos matrices diferentes, agua ultrapura y matriz alimentaria. Se obtuvieron valores críticos similares para los tres elementos en ambas matrices (aproximadamente $2x10^5$ L^{-1}). Debido a las connotaciones especiales de las partículas como analito, su detección positiva está relacionada con su presencia por encima de un valor crítico de concentración en número, pero también por encima de un valor crítico de tamaño. Estos valores críticos de tamaño se muestran en la Tabla 1.2.1 y han sido discutidos en secciones previas.

Las prestaciones analíticas en análisis cualitativo pueden ser evaluadas de diferentes formas [150]. En este estudio, se han utilizado curvas características para determinar la región de incertidumbre, mientras que las ratios de falsos positivos y falsos negativos, la sensibilidad y la especificidad se evaluaron a partir de tablas de contingencia.

Las curvas características se obtuvieron representando el porcentaje de casos de detección positiva frente a la concentración de partículas. La curva define la región de incertidumbre donde se obtienen respuestas falsas (falsos positivos y falsos negativos), siendo conceptualmente equivalente al intervalo de incertidumbre alrededor del valor predicho en un análisis cuantitativo [150,151]. La región de incertidumbre se define como el intervalo entre la concentración en número correspondiente al valor crítico, donde la tasa de falsos positivos es del 5%, y la

concentración en número donde la tasa de falsos negativos es del 5% (95% de falsos positivos). La Figura 1.2.2 muestra las curvas obtenidas para nanopartículas de oro y plata de 100 nm a niveles de concentración en número de los valores críticos y para tamaños de partícula por encima del valor crítico de tamaño. La región de incertidumbre asociada al tamaño no se estudió debido a que no se dispone de estándares de nanopartículas totalmente monodispersos. Las curvas se realizaron midiendo 10 veces las suspensiones de nanopartículas de oro y de plata de 100 nm en un rango de concentraciones de 10^3 - 10^6 L^{-1}, y calculando el porcentaje de respuesta positiva, donde una respuesta positiva implica que el número de eventos de partículas detectado es igual o mayor que el valor crítico $Y_{C,N}$ [ecuación (30)]. Los resultados experimentales se ajustaron a una función sigmoidea y los límites de la región de incertidumbre se obtuvieron al 95 y 5% de los resultados positivos. Los resultados obtenidos mostraron que la región de incertidumbre del método de *screening* cubrió un rango desde $5x10^4$ L^{-1} hasta $3x10^5$ L^{-1}, aproximadamente un orden de magnitud, y podría considerarse independiente de la composición de las partículas.

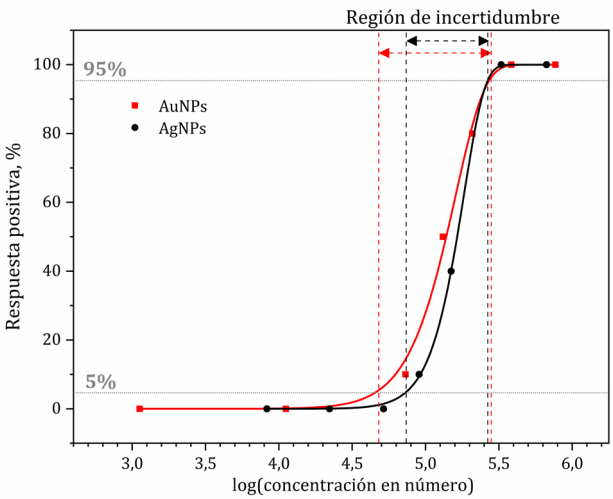


Figura 1.2.2. *Regiones de incertidumbre de SP-ICP-MS como método cualitativo de* screening *para la detección de partículas. Curvas características para AuNPs (línea roja) y AgNPs (línea negra).*

Las tablas de contingencia se realizaron usando los datos de las curvas características de las nanopartículas de plata y oro. Estos datos se incluyen en el Anexo A1.1. La Tabla 1.2.2 muestra las figuras de mérito calculadas a partir de las tablas de contingencia (las expresiones de cálculo se recogen en el Anexo A1.1). La sensibilidad en un análisis cualitativo se refiere a la capacidad del método para reconocer muestras verdaderamente positivas, y está directamente relacionada con las respuestas positivas verdaderas; mientras que la especificidad es la capacidad del método para detectar muestras verdaderamente negativas, y está directamente relacionado con las respuestas negativas verdaderas [148]. Por otro lado, las tasas de falsos positivos y falsos negativos evalúan, respectivamente, la probabilidad de que una muestra de análisis que es un negativo haya sido calificada como positiva por el método, y viceversa. Estos parámetros son complementarios de la especificidad y la sensibilidad, respectivamente. El método de SP-ICP-MS demostró una especificidad mayor del 95%, mientras que la sensibilidad fue aproximadamente del 80%, lo que indica que el método es más fiable para la identificación de muestras que contienen partículas a concentraciones en número por debajo del valor crítico, lo que da una baja tasa de falsos positivos.

Tabla 1.2.2. *Parámetros analíticos de validación para la detección de partículas en SP-ICP-MS.*

	AgNPs	**AuNPs**	**Promedio**
Sensibilidad (%)	80,0	82,5	81,3
Especificidad (%)	97,5	96,7	97,1
Tasa de falsos positivos (%)	2,5	3,3	2,9
Tasa de falsos negativos (%)	20,0	17,5	18,8
Región de incertidumbre (L^{-1})	$7x10^4$ - $3x10^5$	$5x10^4$ - $3x10^5$	$6x10^4$ - $3x10^5$

La selectividad está relacionada con la capacidad que tiene el método para determinar analitos concretos de otros componentes de comportamiento similar en mezclas o matrices sin interferencias [152]. La selectividad debe comprobarse frente a constituyentes de la matriz, otros tipos de partículas y variedades diferentes del mismo tipo de partículas (por ejemplo, diferentes recubrimientos) [145]. Debido a la respuesta específica del elemento de ICP-MS, SP-ICP-MS es selectivo para partículas que contienen elementos específicos independientes de su naturaleza química, es decir, las partículas que contienen plata se detectan como tal, independientemente de si son partículas metálicas o partículas de óxido de plata. Respecto a las

variaciones en el mismo tipo de partícula, una vez que la partícula es suficientemente grande para ser detectada, SP-ICP-MS no es selectivo a otras propiedades de la partícula, como la forma o la carga superficial. Por tanto, la selectividad frente a otros constituyentes de la matriz se evaluó mediante el análisis de un número de muestras de blanco de la matriz alimentaria formada por unas perlas de azúcar blancas que no estaban recubiertas con aditivos metálicos. La Tabla 1.2.1 muestra los resultados obtenidos para agua ultrapura y matriz alimentaria. No se observaron efectos significativos debido a la matriz alimentaria en el caso de la plata y del oro. En el caso del aluminio, la contribución de la matriz estaba relacionada con la presencia de una mayor cantidad de aluminio disuelto (nivel de la línea base alto), y aunque no tuvo efecto sobre la selectividad, afectó a los valores críticos de concentración en número y de tamaño, como se ha comentado previamente.

1.2.3.4. Aplicación de SP-ICP-MS como método de *screening*

El método desarrollado para la detección de partículas mediante SP-ICP-MS se aplicó al *screening* de unas muestras de alimentos que contienen aditivos metálicos. La Comisión Europea ha aprobado el uso de tres metales como aditivos alimentarios para colorear el recubrimiento de productos de pastelería: aluminio (E173), plata (E174) y oro (E175) [153]. La seguridad de la plata y el oro como aditivos alimentarios se ha reevaluado recientemente por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) [154,155] recomendando que se incluya en las especificaciones de estos aditivos alimentarios información sobre el tamaño de partícula y el porcentaje (en número) de partículas en la escala nano cuando se comercialicen en polvo.

En este trabajo se estudiaron dos tipos de muestras alimentarias relacionadas con la presencia o liberación de partículas metálicas. El primer tipo consistía en materiales en polvo para decoración con acabados dorados o plateados. La etiqueta de los dos productos analizados especificaba que contenían los aditivos E175 (oro) y E174 (plata), respectivamente, además de mica y otros componentes. El segundo tipo de muestras consistía en perlas de azúcar con un recubrimiento plateado, que se usan en decoración de pastelería, especificando en la etiqueta que contenían E174 (plata) o E173 (aluminio), entre otros ingredientes.

Debido a la hidrofobicidad de las muestras en polvo, se prepararon suspensiones estables en Tween 20 al 0,1% (*v/v*), que se centrifugaron para eliminar partículas mayores de 1 µm (Apartado 1.2.2.4.2). Las suspensiones se analizaron directamente mediante SP-ICP-MS para detectar la presencia de partículas que

contuviesen plata, oro o aluminio. La Figura 1.2.3 muestra los barridos de tiempo de las suspensiones del blanco y de las muestras. No se detectaron partículas de oro en las muestras analizadas, mientras que una pequeña cantidad de partículas de plata se detectaron en el polvo plateado. Todas las muestras contenían cantidades significativas de partículas que contenían aluminio, correspondientes a la mica (silicato de aluminio y potasio) especificada en las etiquetas (E555).

Los resultados obtenidos revelaron que, a pesar de lo que se indicaba en la etiqueta de ambos productos, no había plata ni oro en el polvo dorado, mientras que la cantidad de partículas que contienen plata en el polvo plateado era extremadamente pequeña, por debajo de 3 ng g^{-1}.

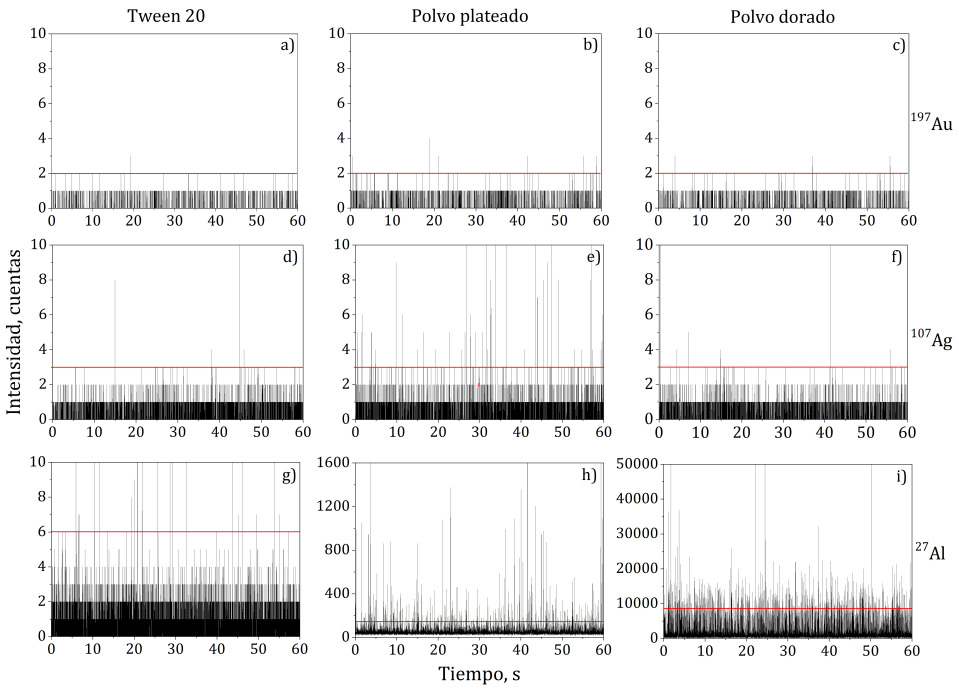


Figura 1.2.3. *Barridos de tiempo de SP-ICP-MS de un blanco (0,1% Tween 20) y materiales en polvo, plateado y dorado, usados para decoración de pastelería. Línea roja: valores críticos para la identificación de eventos de partícula (criterio 5σ).*

Respecto a las perlas de azúcar, éstas fueron dispersadas en agua para liberar el recubrimiento metálico que contenía el aditivo. Las muestras se prepararon según el procedimiento descrito en el Apartado 1.2.2.4.1 y las suspensiones resultantes se analizaron para detectar las partículas liberadas que contenían plata o aluminio. La Figura 1.2.4 muestra los barridos de tiempo de las

muestras analizadas, las cuales se pueden comparar con los blancos que se muestran en la Figura 1.2.1. Se detectaron tanto partículas que contenían plata como aluminio, lo que confirmó la liberación de partículas del recubrimiento. Por otro lado, el aumento de la línea base en comparación con los blancos, confirmó la presencia de formas disueltas de plata y de aluminio. Por esta razón, los valores críticos de tamaño obtenidos (línea roja en la Figura 1.2.4) fueron más grandes que los presentados previamente, con valores de 66 y 97 nm para la plata y el aluminio, respectivamente. Se estableció un valor umbral de 100 nm (línea verde en la Figura 1.2.4), confirmándose que la mayoría de las partículas detectadas fueron mayores de ese valor. Como se ha comentado anteriormente, la aplicación de este método de *screening* con un instrumento de última generación y trabajando con tiempos de lectura de 0,1 ms o menos podría mejorar los valores críticos de tamaño y favorecería la detección de las partículas más pequeñas.

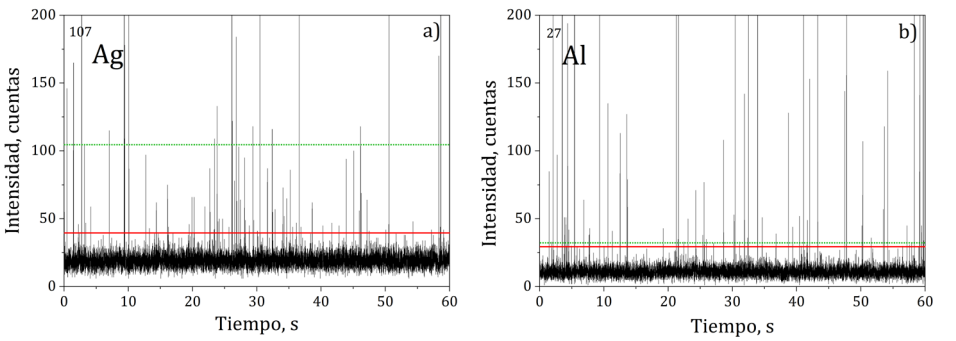


Figura 1.2.4. *Barridos de tiempo de SP-ICP-MS de las perlas de azúcar plateadas que contienen aditivos alimentarios de a) plata (E174) y b) aluminio (E173). Línea roja sólida: valor crítico de tamaño (66 y 97 nm para plata y aluminio, respectivamente). Línea verde punteada: valor umbral de 100 nm.*

1.2.4. CONCLUSIONES

SP-ICP-MS ha sido evaluado y validado como método cualitativo para la determinación de la presencia o ausencia de partículas que contienen elementos específicos en una muestra. Esta evaluación implica, en primer lugar, la identificación de eventos de partículas en los barridos de tiempo usando el valor crítico basado en el criterio 5σ, seguido del análisis de los blancos apropiados. La validación del método ha incluido la determinación de distintos parámetros analíticos como son los valores críticos de concentración en número y de tamaño, las regiones de

incertidumbre, y otros parámetros analíticos como la sensibilidad, especificidad, selectividad y la relación de falsos positivos y falsos negativos. Por último, el método de *screening* se ha aplicado a la detección de partículas de plata, oro y aluminio en dos tipos diferentes de muestras alimentarias que contenían aditivos metálicos. En el caso del oro, se ha confirmado la ausencia de partículas en todas las muestras estudiadas; mientras que en el caso del aluminio, se ha confirmado la presencia de partículas en todas ellas. Por el contrario, la presencia de plata se ha confirmado solamente en algunas de las muestras analizadas.

1.3. VALIDEZ DE LA INFORMACIÓN OBTENIDA POR SP-ICP-MS

1.3.1. INTRODUCCIÓN

Como se ha visto en el Capítulo 1.2, donde se ha aplicado la técnica SP-ICP-MS como método de *screening,* la pregunta a la que respondía este método era si había partículas en la muestra. Cuando la respuesta es afirmativa, las siguientes preguntas que deberían hacerse serían: ¿cuál es la masa de elemento por partícula o el tamaño de las partículas (si se conoce o asume la forma, composición y densidad de las partículas)? y, ¿cuál es la concentración de partículas? Estas preguntas dependerán de las características de la población de partículas en la muestra y de la capacidad del instrumento de registrar las distribuciones completas de estas partículas.

Si las partículas son más grandes que el valor crítico en tamaño, se podrá obtener información cuantitativa sobre la distribución de tamaños y la concentración en número de las partículas. De lo contrario, solamente se podrá obtener información parcial, restringiéndose a las partículas que superen el valor crítico en tamaño, y, por tanto, subestimando su concentración en número y sobreestimando su tamaño medio. En estos casos, es habitual que los histogramas obtenidos muestren la cola de la distribución de las partículas, poniendo de manifiesto que ésta se ha detectado de forma incompleta. Sin embargo, en el caso de utilizar tiempos de lectura de microsegundos, registrando los eventos de partículas como señales transitorias, también pueden obtenerse distribuciones aparentemente completas, de las que se derivarán resultados aparentemente correctos.

Cuando se utiliza SP-ICP-MS en estudios de laboratorios donde se añaden nanopartículas en concentraciones, tamaños y composición conocidos, la información proporcionada por SP-ICP-MS puede ser comparada con las nanopartículas originales [156–159]. Sin embargo, en el caso de análisis de muestras en las que se desconoce la naturaleza exacta de las partículas, será necesario utilizar tanto criterios robustos como métodos alternativos o complementarios para confirmar los resultados que se obtengan mediante SP-ICP-MS [160–162].

El objetivo de este apartado se centra en el desarrollo de una estrategia que permita evaluar la validez de la información cuantitativa obtenida mediante SP-ICP-MS, su verificación a través de distintos casos y su aplicación al análisis de muestras complejas.

1.3.2. EXPERIMENTAL

1.3.2.1. Instrumentación

El análisis mediante la técnica de detección individual de partículas (SP-ICP-MS) se realizó con el espectrómetro de masas con fuente de ionización de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) Perkin Elmer NexION 2000B, descrito en el capítulo de detectabilidad y límites de detección (Capítulo 1.1). El sistema de introducción de muestra utilizado fue una cámara ciclónica con un nebulizador concéntrico de vidrio (Meinhard). Los parámetros instrumentales y de adquisición se corresponden con los descritos en el Apartado 1.1.2.1 del Capítulo 1.1.

1.3.2.2. Estándares y reactivos

Las suspensiones de nanopartículas de oro y de plata utilizadas procedían de nanoComposix (nanoComposix, St. Diego, EE.UU.). Las nanopartículas de plata estaban estabilizadas con citrato y tenían un diámetro nominal de 39 ± 5 nm; y las de oro estaban estabilizadas con PEG y su diámetro nominal era 47,8 ± 1,8 nm.

Las disoluciones acuosas de oro y plata se prepararon a partir de una disolución estándar de 1000 mg L^{-1} (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) y se diluyeron en agua ultrapura (18 MΩ cm de resistividad), obtenida a partir de un equipo de purificación Milli-Q (Millipore Co., Bedford, EE. UU.).

Los rendimientos de nebulización se determinaron con patrones de nanopartículas monodispersas de oro estabilizadas con PEG, procedentes de nanoComposix, y con un diámetro nominal de 47,8 ± 1,8 nm.

La preparación de las suspensiones de nanopartículas y de las suspensiones se prepararon de la misma manera que en el Apartado 1.1.2.2 del Capítulo 1.1.

1.3.2.3. Muestras

Se analizaron dos productos antimicrobianos, identificados como M1 y M2, los cuales consistían en suspensiones acuosas que contenían nanopartículas de plata estabilizadas con un ligando orgánico natural. Estas muestras fueron proporcionadas por Laboratorios Enosan S.L., España.

1.3.2.4. Procesamiento de datos de SP-ICP-MS

Las suspensiones se midieron en modo de detección de partículas individuales usando un tiempo de lectura de 100 µs, con un tiempo de adquisición total de 300 y 60 s registrando 3.000.000 y 600.000 lecturas por barrido de tiempo, respectivamente; y un tiempo de lectura de 5 ms, con un tiempo de adquisición de 60 s registrando 12.000 lecturas por barrido.

El rendimiento de nebulización del analito se calculó de acuerdo con los métodos desarrollados por Pace *et al*. [88], usando los estándares de nanopartículas de oro de 50 nm descritas anteriormente. Se obtuvieron resultados similares para el método de la frecuencia y el método del tamaño (6,31 ± 0,02 % y 6,29 ± 0,02 %). Los caudales de muestra se midieron gravimétricamente por triplicado.

Las señales registradas se procesaron inicialmente con el módulo Syngistix™ Nano-Application versión 2.5 (Perkin Elmer Inc.) aplicando un criterio 5σ. Alternativamente, los barridos registrados se exportaron y procesaron con el *software* SPCal 0.7.1 [163] usando la opción de filtro de Poisson.

1.3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.3.1. Efecto del valor crítico de tamaño en las distribuciones de tamaño

Todas las nanopartículas presentan distribuciones de tamaño más o menos anchas, lo que significa que la información sobre las partículas en una muestra está condicionada por la capacidad del método de SP-ICP-MS para detectar concentraciones bajas de nanopartículas y por su capacidad de detectar la distribución completa, incluyendo las nanopartículas más pequeñas. Por otro lado, los valores críticos y los límites de detección de tamaño en SP-ICP-MS dependen del rendimiento del instrumento utilizado y del elemento monitorizado, además de la línea base a través de su ruido asociado [164].

El efecto de la línea base sobre la distribución de tamaños de una suspensión de nanopartículas puede observarse en la Figura 1.3.1. En esta figura se presentan las distribuciones de tamaño de nanopartículas de 40 nm obtenidas para distintos niveles de línea base modificados a través de la concentración de plata iónica presente (de 0,02 a 2,50 µg L^{-1}), que a su vez afecta al valor crítico en tamaño. Los eventos de nanopartículas se detectaron por encima de la línea base usando el *software* de Perkin Elmer aplicando un criterio 5σ, donde se calculó el valor umbral a partir de la intensidad de la línea base medida en cuentas (Y_B) como $Y_B + 5\sqrt{Y_B}$

(redondeado al entero superior), debido al comportamiento de Poisson de la línea base [134]. Los valores críticos de tamaño se calcularon de acuerdo con el mismo criterio, aplicando las ecuaciones (23) y (25) para eventos de partículas registrados como pulsos o picos, respectivamente.

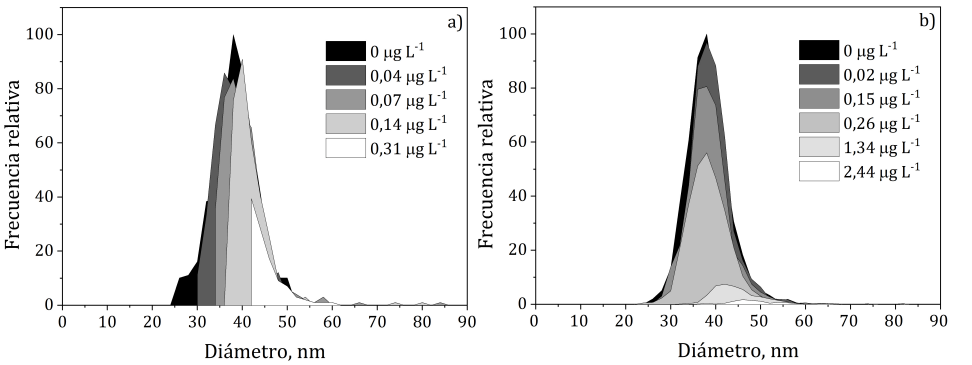


Figura 1.3.1. *Distribuciones de tamaño de AgNPs de 40 nm con concentraciones crecientes de Ag(I) para tiempos de lectura de a) 5 ms y b) 100 µs. La leyenda muestra la concentración de Ag(I) adicionada a las suspensiones de AgNPs.*

Cuando se usó un tiempo de lectura de 5 ms (Figura 1.3.1.a), la parte de la distribución correspondiente a las partículas de menor tamaño fue desapareciendo progresivamente conforme aumentaba la intensidad de la línea base. En este caso, el valor crítico de tamaño aumentó desde 23 nm, para una línea base correspondiente a agua ultrapura, hasta 41 nm debido a la presencia de plata disuelta. En esta situación, cuando se compara con la distribución original (en negro), se obtuvo una distribución parcial debido a que las señales de las nanopartículas menores de 41 nm no pudieron discriminarse del ruido de la línea base. A pesar de esto, la apariencia de la distribución medida confirmó a primera vista que parte de la distribución de las nanopartículas se había perdido y que no era posible obtener información cuantitativa sobre las nanopartículas de la suspensión.

Cuando las mismas nanopartículas se midieron a un tiempo de lectura de 100 µs (Figura 1.3.1.b), se obtuvieron distribuciones de tamaños aparentemente completas, aunque su rango disminuyó y el máximo se desplazó a tamaños mayores cuando la concentración de plata disuelta y, por tanto, la intensidad de la línea base, aumentaron. En ausencia de la distribución de tamaño original, y sin confirmación de los resultados obtenidos, la concentración de las nanopartículas en algunas de estas suspensiones estaría subestimada y su tamaño medio, sobreestimado. Cuando

se comparan la Figura 1.3.1.a y Figura 1.3.1.b, la principal diferencia es que las distribuciones obtenidas en la Figura 1.3.1.a son auto explicativas, ya que muestran distribuciones incompletas, mientras que las de la Figura 1.3.1.b no lo son.

Esta diferencia en la apariencia de las distribuciones de tamaño cuando son medidas a tiempos de lectura de milisegundos y microsegundos depende de la naturaleza de los eventos, pulsos o picos, y de cómo han sido procesados. Usando el *software* de Perkin Elmer, la aplicación de cualquier criterio umbral en pulsos elimina directamente los que están por debajo de ese umbral, mientras que cuando se trabaja con picos, éstos se "pierden parcialmente" en el ruido de la línea base, y su intensidad neta total se reduce. El resultado es que los picos grandes se vuelven más pequeños, y que los picos pequeños se pierden, lo que produce un desplazamiento de la distribución de tamaño a tamaños más grandes y la detección de menos partículas, pero se mantiene una distribución de tamaño aparentemente completa. Resultados similares se obtuvieron cuando los datos brutos se procesaron con un *software* de acceso libre [163], como se muestra en la Figura A1.2.1 (Anexo A1.2).

En la Tabla 1.3.1 se observan los efectos del incremento de la intensidad de la línea base en la determinación del tamaño promedio de las nanopartículas y su concentración en número usando el *software* de Perkin Elmer. Los resultados obtenidos usando el *software* libre SPCal se presentan en la Tabla A1.2.1. Con ambos tratamientos de datos, el incremento en el valor crítico de tamaño implica aparentemente, un aumento en el tamaño promedio y una disminución de la concentración en número, lo cual está relacionado directamente con la pérdida progresiva de las partículas más pequeñas. Esto significa que, cuando se analizan muestras desconocidas en SP-ICP-MS, los resultados obtenidos deben ser evaluados de alguna manera para confirmar su validez. En caso contrario, la información obtenida debe ser considerada cualitativa o semicuantitativa, y sólo podría confirmarse la presencia de partículas por encima de un cierto tamaño y/o número de partículas por encima de una cierta concentración en número [134].

Aunque los casos presentados implican intensidades altas de la línea base debido a la presencia de especies disueltas, las situaciones también se aplicarían a los isótopos con altos niveles de fondo debido a la existencia de especies poliatómicas o incluso a intensidades bajas de línea base si el tamaño de las nanopartículas medidas está cerca del límite de detección de tamaño.

Tabla 1.3.1. *Tamaño promedio, concentración en número de nanopartículas, valores críticos de tamaño ($X_C^{tamaño}$) y recuperaciones para suspensiones de AgNPs de 40 nm a las que se les adicionó concentraciones crecientes de Ag(I) para tiempos de lectura de 5 ms y 100 µs. Tiempo total de adquisición: 60 s. Media ± desviación estándar (n=3).*

Suspensión	Intensidad línea base cuentas	$X_C^{tamaño}$ nm	Tamaño promedio nm	Concentración en número L^{-1}	Recuperación %
Tiempo de lectura: 5 ms					
AgNPs 40 nm	2	22,9	39,1 ± 0,2	(1,64 ± 0,07)x10^7	100 ± 4
AgNPs 40 nm + 0,04 µg L^{-1} Ag(I)	8	28,8	41,1 ± 0,5	(9,8 ± 0,5)x10^6	63 ± 3
AgNPs 40 nm + 0,07 µg L^{-1} Ag(I)	13	31,9	44,3 ± 0,6	(4,2 ± 0,2)x10^6	27 ± 1
AgNPs 40 nm + 0,14 µg L^{-1} Ag(I)	27	35,5	49,3 ± 0,9	(1,7 ± 0,1)x10^6	10,3 ± 0,4
AgNPs 40 nm + 0,31 µg L^{-1} Ag(I)	64	40,9	58,8 ± 0,8	(2,4 ± 1,2)x10^5	1,4 ± 0,7
Tiempo de lectura: 100 µs					
AgNPs 40 nm	0,05	19,4	38,4 ± 0,2	(1,50 ± 0,03)x10^8	100 ± 2
AgNPs 40 nm + 0,02 µg L^{-1} Ag(I)	0,1	19,4	38,1 ± 0,2	(1,37 ± 0,02)x10^8	96 ± 2
AgNPs 40 nm + 0,15 µg L^{-1} Ag(I)	0,5	24,4	37,5 ± 0,3	(1,27 ± 0,04)x10^8	87 ± 3
AgNPs 40 nm + 0,26 µg L^{-1} Ag(I)	1	28,0	38,5 ± 0,1	(8,6 ± 0,2)x10^7	59 ± 2
AgNPs 40 nm + 1,34 µg L^{-1} Ag(I)	5	35,2	44,1 ± 0,6	(1,2 ± 0,1)x10^7	8,4 ± 0,7
AgNPs 40 nm + 2,44 µg L^{-1} Ag(I)	11	39,6	51,4 ± 2,4	(2,9 ± 0,1)x10^6	1,9 ± 0,1

1.3.3.2. Procedimiento para determinar la validez de la información de SP-ICP-MS

Con el objetivo de evitar los problemas de malinterpretación comentados anteriormente cuando se analizan muestras desconocidas mediante SP-ICP-MS, los resultados obtenidos deben evaluarse de alguna manera, especialmente cuando se trabaja con tiempos de microsegundos. Schwertfeger *et al*. [165] propusieron una estrategia que implica el análisis de muestras a diferentes diluciones con el fin de reducir la concentración del elemento disuelto, compensando el menor número de partículas contadas con el aumento del tiempo de adquisición. En estas condiciones, la información obtenida se consideraba válida si las concentraciones en número determinadas a dos concentraciones diferentes eran similares. Aznar *et al*. [166] también propusieron un método de control de calidad de los resultados basados en diluciones progresivas de las muestras mientras se mantenía la distribución de tamaños y las partículas contadas eran proporcionales a la dilución aplicada.

Mientras que el enfoque de Aznar *et al*. era empírico y comprobaban diferentes diluciones para encontrar el rango de medición óptimo para cada muestra, Schwertfeger *et al*. propusieron la dilución de las muestras para reducir la concentración del elemento disuelto por debajo del límite de detección obtenido en un análisis estándar de ICP-MS, en combinación con el aumento del tiempo de adquisición si fuera necesario. Sin embargo, este criterio debe considerarse engañoso ya que los límites de detección de los elementos disueltos medidos en ICP-MS en modo de detección de partículas individuales son mucho más bajos que en el modo estándar, debido a los mayores tiempos de adquisición usados en SP-ICP-MS, y el hecho de que el incremento de los tiempos de adquisición contribuye a reducir aún más estos límites de detección, como ya se vio en apartados anteriores [164].

El procedimiento propuesto en esta Tesis Doctoral es que, como regla general, las muestras deben diluirse al máximo para reducir la intensidad de la línea base a niveles de blanco, con el fin de obtener el mejor valor crítico de tamaño, o al menos, valores correspondientes a valores críticos de tamaño por debajo del extremo inferior de la distribución de nanopartículas. Incluso en condiciones de niveles de línea base del blanco, si la distribución de tamaño medida toma un valor próximo al valor crítico de tamaño, parte de la distribución del tamaño real se perderá y la información cuantitativa estará sesgada.

La Figura 1.3.2 muestra un diagrama de flujo que resume la evaluación del método propuesto. Primero, la medida de un blanco instrumental (por ejemplo, agua ultrapura) permite obtener la intensidad promedio de la línea base del blanco ($Y_{Bblanco}$) para estimar el mejor valor crítico de tamaño. Por simplicidad, se considera que no hay partículas en el blanco, y así el conteo de los eventos de partículas de la muestra pueden considerarse un proceso de conteo de Poisson ideal con blanco cero. En condiciones ideales, la detección de un evento de partícula en un barrido de tiempo de una muestra podría confirmar la presencia de partículas en la muestra [101].

A continuación, al medir la suspensión de nanopartículas, se obtiene información sobre la intensidad de la línea base de la suspensión (Y_{Bsusp}) y del número de eventos de partícula ($Y_{Nsusp(1)}$). El valor crítico de tamaño en la suspensión puede estimarse a partir de las ecuaciones (23) y (25) y de la intensidad de la línea base de la suspensión Y_{Bsusp}. Siempre que el extremo inferior de la distribución de tamaño medida, definida como el tamaño mínimo de la distribución de tamaño de partícula (PSD_{min}) con un número de partículas mayor que 0 (valor crítico para un blanco cero) sea mayor que el valor crítico de tamaño ($X_C^{tamaño}$), la suspensión puede diluirse (por ejemplo, 1:2) para hacer una segunda medida de confirmación $Y_{Nsusp(2)}$.

Por el contrario, si el PSD_{min} está cerca del valor crítico de tamaño (valores consecutivos), la suspensión debe diluirse hasta reducir la línea base a niveles del blanco, a menos que el nivel de la línea base y de la suspensión no sean estadísticamente diferentes y, por tanto, en este caso los valores críticos de tamaño no podrían mejorarse por dilución, por lo que no se podría realizar ninguna acción adicional.

Si se detectan partículas en el blanco, se debe considerar un valor crítico para la detección de partículas mayor que 0 y deberían usarse expresiones más complejas para su cálculo [101,134]. Cuando se miden suspensiones diluidas, el tiempo de adquisición debe aumentarse convenientemente para contar al menos 100 eventos de partículas (límite de cuantificación en número mínimo en condiciones ideales de conteo) [101].

La concordancia entre las concentraciones en número determinadas de ambas diluciones confirmará la información obtenida, tanto de concentración en número como de distribución de tamaño, ya que de lo contrario, parte de la distribución de tamaños original de las nanopartículas no se detecta y la información deberá considerarse semicuantitativa o cualitativa.

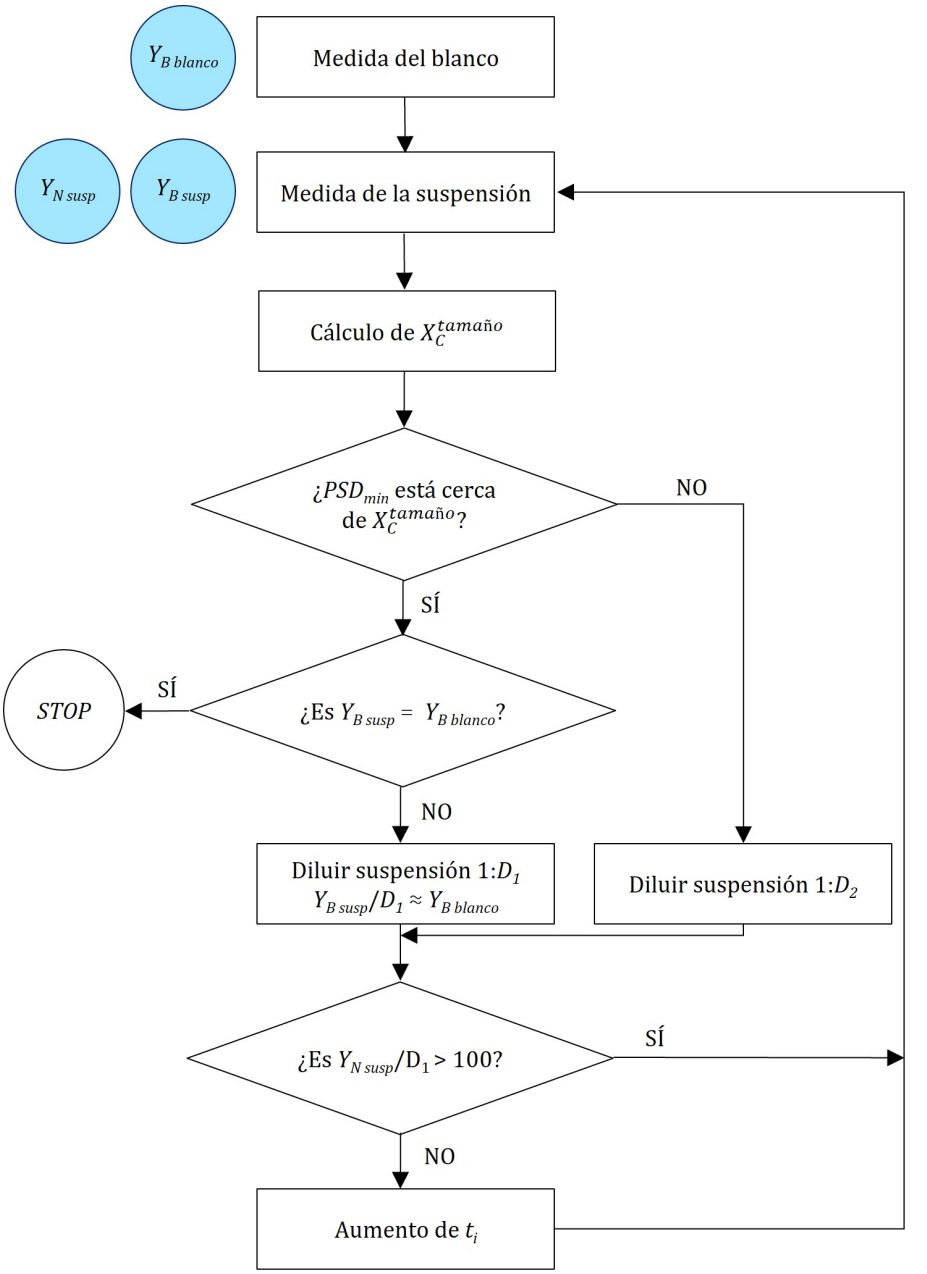


Figura 1.3.2. *Diagrama de flujo para evaluar la validez de la información obtenida mediante SP-ICP-MS.* $Y_{Bblanco}$*: intensidad promedio de la línea base del blanco.* Y_{Bsusp}*: intensidad promedio de la línea base de la suspensión.* Y_{Nsusp}*: número de eventos de partícula de la suspensión.* $X_C^{tamaño}$*: valor crítico de tamaño.* t_i*: tiempo de adquisición total. D1 y D2: factores de dilución.* PSD_{min}*: tamaño mínimo de la distribución de tamaño de partícula.*

1.3.3.3. Pruebas de concepto del procedimiento

Se estudiaron dos casos genéricos como pruebas de concepto del procedimiento presentado anteriormente. El primer caso considera la presencia de especies disueltas, las cuales pueden eliminarse por dilución; mientras que el segundo corresponde a una situación en la que el nivel de la línea base de la muestra es similar a un blanco.

Respecto al primer caso, la Tabla 1.3.2 resume los pasos seguidos para la evaluación de la información obtenida de una suspensión que contiene nanopartículas de plata de 40 nm y 2,6 μg L^{-1} de plata iónica. Como consecuencia de la presencia de la plata disuelta, el valor crítico real en esta suspensión era 34 nm, y por tanto, mayor que el extremo inferior (aproximadamente 25 nm) de la distribución de tamaño original mostrada en la Figura 1.3.1, por lo que las nanopartículas detectadas representaban solamente el 15 % de la distribución real.

Por lo tanto, se realizó una dilución 1:50 para reducir la línea base y el valor crítico de tamaño. El tiempo de adquisición se aumentó de 60 a 300 segundos para incrementar el número de eventos registrados por encima de 100. En estas condiciones, el valor crítico se redujo a 18 nm y la recuperación de las nanopartículas aumentó hasta el 80%.

Posteriormente, se realizó una dilución 1:125 que permitió reducir la intensidad de la línea base a valores cercanos al nivel del blanco (0,2 frente a 0,1 cuentas promedio de la línea base) y obtener un valor crítico de tamaño de 16 nm, el cual era claramente menor que el extremo inferior de la distribución (aproximadamente 25 nm), por lo que se pudo obtener la distribución de tamaño completa con una recuperación cuantitativa de las nanopartículas.

Para confirmar estos resultados, se realizó una última dilución 1:2 (dilución 1:250 de la suspensión original), que concordaba con los resultados de la dilución 1:125.

Tabla 1.3.2. *Tamaño promedio, concentración en número de nanopartículas, valores críticos de tamaño ($X_C^{tamaño}$) y recuperaciones para suspensiones de AgNPs de 40 nm en las que se adicionó 2,6 µg L^{-1} de Ag(I) analizadas a diferentes diluciones y tiempos de adquisición total. Tiempo de lectura: 100 µs. Media ± desviación estándar (n=3).*

Suspensión	Tiempo de adquisición s	Intensidad línea base cuentas	$X_C^{tamaño}$ nm	Tamaño promedio nm	Número de eventos	Concentración en número L^{-1}	Recuperación %
AgNPs 40 nm	60	0,1	14,4	38,0 ± 0,2	3085 ± 26	(1,45 ± 0,01)x10^8	100 ± 2
AgNPs 40 nm + 2,6 µg L^{-1} Ag(I)	60	27	34,2	46,1 ± 0,3	968 ± 40	(4,56 ± 0,02)x10^8	15 ± 1
Dilución 1:50	300	0,4	18,1	38,0 ± 0,3	511 ± 16	(1,92 ± 0,06)x10^8	80 ± 3
Dilución 1:125	300	0,2	16,4	37,6 ± 0,2	244 ± 10	(2,7 ± 0,1)x10^8	98 ± 4
Dilución 1:250	300	0,1	14,4	36,7 ± 1,0	136 ± 10	(3,1 ± 0,2)x10^8	103 ± 4

Respecto a las distribuciones de tamaño obtenidas, la Figura 1.3.3 mostró que la información de la suspensión original está claramente sesgada, aunque aparentemente se observó una distribución completa de nanopartículas de plata a partir de 35 nm, la cual corresponde a la cola de la distribución real. Las diluciones sucesivas mostraron una concordancia entre ellas, aunque el bajo número de eventos registrados para las diluciones más altas implica una menor precisión debido a la estadística de conteo.

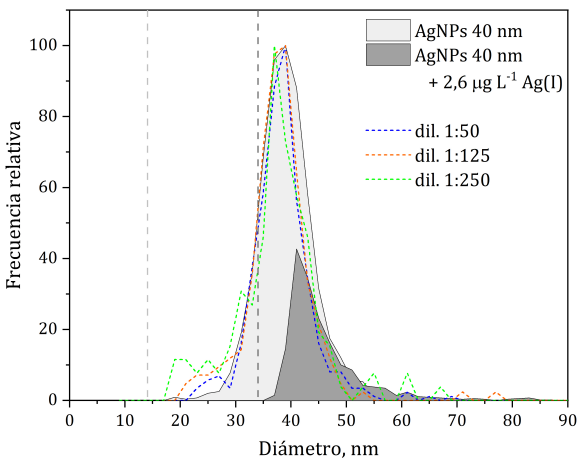


Figura 1.3.3*. Distribuciones de tamaño de suspensiones de AgNPs de 40 nm, sin adicionar (gris clara) y adicionando 2,6 µg L^{-1} de Ag(I) (gris oscuro), y las diluciones de esta última suspensión. Líneas grises: valores críticos de tamaño. Tiempo de lectura: 100 µs.*

En esta primera prueba de concepto, la principal contribución a la línea base fue debido al elemento disuelto y la dilución permitió mejorar los valores críticos de tamaño y, por tanto, detectar la distribución completa de las nanopartículas. Sin embargo, cuando la intensidad de la línea base es despreciable (o constante debido a interferencias poliatómicas del plasma), los valores críticos de tamaño no pueden mejorarse a través de las diluciones. La Tabla 1.3.3 muestra el efecto de la dilución de suspensiones de nanopartículas de oro de 50 nm medidas a tiempo de lectura de 5 ms y 100 µs en condiciones que proporcionan valores críticos menores que el PSD_{min} (11 nm en ambos casos) o mucho mayores (42 y 34, respectivamente). Esto se logró modificando el voltaje del deflector del cuadrupolo de enfoque del ICP-MS para reducir la transmisión de iones al espectrofotómetro y, por tanto, la sensibilidad total. En estas condiciones, la recuperación de todas las diluciones fue cuantitativa, a pesar de que la distribución de las nanopartículas registrada en condiciones de baja sensibilidad representó el 78 - 80% y el 63% a 5 ms y 100 µs, respectivamente.

***Tabla 1.3.3**. Tamaño promedio, concentración en número de nanopartículas, valores críticos de tamaño ($X_C^{tamaño}$) y recuperaciones para AuNPs de 50 nm analizadas a diferentes sensibilidades y tiempos de lectura de 5 ms y 100 µs. Tiempo de adquisición total: 60 s. Media ± desviación estándar (n=3).*

	Intensidad línea base cuentas	$X_C^{tamaño}$ nm	Tamaño promedio nm	Número de eventos	Concentración en número L^{-1}	Recuperación total %	Recuperación dilución %
Tiempo de lectura: 5 ms							
AuNPs 50 nm	0,1	10,6	48,5 ± 0,4	380 ± 17	(1,90 ± 0,08)x10^7		
Dilución 1:2	0,1	10,6	47,1 ± 0,7	187 ± 9	(1,89 ± 0,09)x10^7		100 ± 5
AuNPs 50 nm (sensibilidad baja) [a]	0,0	41,6	50,4 ± 0,5	296 ± 20	(1,48 ± 0,10)x10^7	78 ± 5	
Dilución 1:2	0,0	41,6	49,2 ± 0,6	149 ± 7	(1,51 ± 0,07)x10^7	80 ± 4	102 ± 5
Tiempo de lectura: 100 µs							
AuNPs 50 nm	0,0	10,9	48,3 ± 0,3	1770 ± 24	(8,68 ± 0,12)x10^7		
Dilución 1:2	0,0	10,9	47,9 ± 0,1	861 ± 37	(8,57 ± 0,37)x10^7		99 ± 4
AuNPs 50 nm (sensibilidad baja) [b]	0,0	33,9	48,9 ± 0,1	1119 ± 40	(5,49 ± 0,20)x10^7	63 ± 2	
Dilución 1:2	0,0	33,9	48,6 ± 0,4	541 ± 35	(5,39 ± 0,35)x10^7	63 ± 4	98 ± 6

[a] Sensibilidad reducida al 2%

[b] Sensibilidad reducida al 3%

Mientras que a tiempos de lectura de 5 ms las recuperaciones bajas eran evidentes al observar el perfil de las distribuciones registradas (Figura 1.3.4.a), esto no ocurrió cuando se trabaja a 100 µs (Figura 1.3.4.b), como ocurrió en los casos presentados anteriormente. La consecuencia directa de estos resultados es que las

mediciones de confirmación basadas en la dilución de una suspensión no son válidas cuando el nivel de la línea base en la suspensión medida es cercano al blanco y el límite inferior de la distribución es similar al valor crítico de tamaño. En estas condiciones, el diagrama de flujo de la Figura 1.3.2 conduce al *STOP* e implica que los resultados obtenidos no pueden ser confirmados y que muy probablemente, la suspensión contiene nanopartículas por debajo del valor crítico de tamaño que no han sido detectadas. En estas condiciones, los resultados deben ser considerados cualitativos o semicuantitativos.

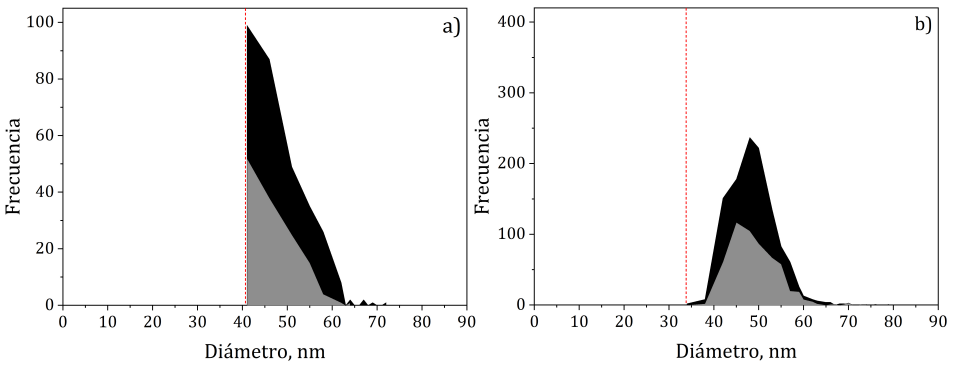


Figura 1.3.4. *Distribuciones de tamaño de suspensiones de AuNPs de 50 nm (negro) y para una dilución 1:2 (gris) en condiciones de baja sensibilidad a tiempos de lectura de a) 5 ms y b) 100 µs. Líneas rojas: valores críticos de tamaño.*

1.3.3.4. Aplicación del procedimiento en nanomateriales bactericidas

Se analizaron mediante SP-ICP-MS dos nanomateriales antimicrobianos (M1 y M2) consistentes en suspensiones acuosas que contenían nanopartículas de plata. En estudios previos se había determinado mediante espectrometría de absorción atómica (EAA) que las suspensiones originales tenían un contenido de plata total de 143 ± 4 y 736 ± 25 mg L^{-1}, respectivamente, así como que las suspensiones contenían nanopartículas de plata y un contenido significativo de plata disuelta. Ambas suspensiones se diluyeron aproximadamente $1:10^7$ para reducir la contribución de la plata disuelta a niveles del blanco, siguiendo el procedimiento descrito en la Figura 1.3.2. En el caso del análisis de M1, se aumentó el tiempo de adquisición total a 300 segundos para detectar un mayor número de eventos de partículas.

La Figura 1.3.5 muestra las distribuciones obtenidas para ambos nanomateriales a dos diluciones sucesivas. Las distribuciones de tamaño obtenidas estaban en el rango de aproximadamente 20 - 60 nm, con diámetros promedio de 20

- 25 nm (Tabla 1.3.4). Los valores críticos de tamaño calculados a partir de la medida de las líneas base estaban en el rango de 8 - 15 nm, los cuales coincidían con los extremos inferiores de las distribuciones obtenidas y, por tanto, esto indicaba que parte de las distribuciones de tamaño originales podrían haberse perdido. Además, las diferencias observadas entre las concentraciones en número de las dos diluciones sucesivas de las suspensiones (Tabla 1.3.4) también sugerían la detección parcial de las distribuciones originales, por lo que estos resultados no deberían considerarse cuantitativos.

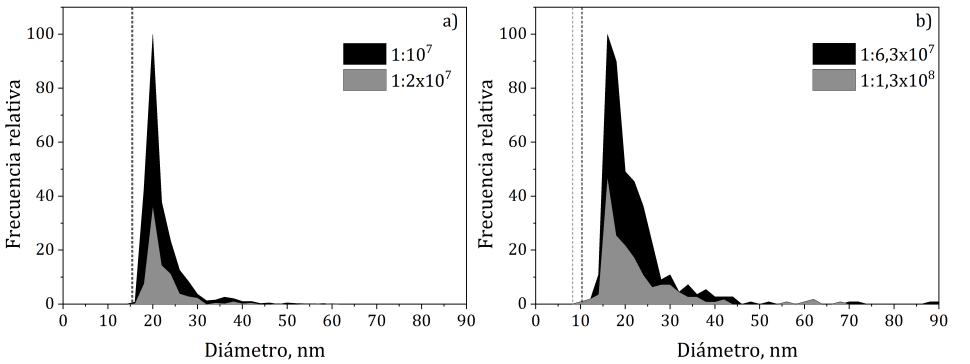


Figura 1.3.5. *Distribuciones de tamaño de los nanomateriales antimicrobianos a) M1 a una dilución 1:10⁷ (negro) y 1:2x10⁷ (gris); y b) M2 a una dilución 1:6,3x10⁷ (negro) y 1:1,3x10⁸ (gris). Tiempo de lectura: 100 µs. Líneas punteadas: valores críticos de tamaño de las diluciones correspondientes.*

Tabla 1.3.4. *Tamaño promedio y concentración en número de nanopartículas, valores críticos de tamaño ($X_C^{tamaño}$) para los nanomateriales antimicrobianos analizados. Tiempo de lectura: 100 µs. Media ± desviación estándar (n=3).*

Nanomaterial	Dilución	Tiempo de adquisición s	Intensidad línea base cuentas	$X_C^{tamaño}$ nm	Tamaño promedio nm	Número de eventos	Concentración en número L^{-1}
M1	$1:10^7$	300	0,13	15,3	19,6 ± 0,9	917 ± 40	$(8,2 \pm 0,4)x10^{13}$
	$1:2x10^7$	300	0,09	15,3	20,1 ± 1,1	316 ± 25	$(5,6 \pm 0,4)x10^{13}$
M2	$1:6,3x10^7$	60	0,07	10,3	24,1 ± 0,6	465 ± 27	$(1,3 \pm 0,1)x10^{15}$
	$1:1,3x10^8$	60	0,04	8,2	24,5 ± 1,0	175 ± 19	$(9,5 \pm 1,0)x10^{14}$

Adicionalmente, ambos nanomateriales se habían analizado mediante cromatografía hidrodinámica acoplada a ICP-MS (HDC-ICP-MS) y microscopía electrónica de transición (TEM) para su caracterización detallada. En el Anexo A1.3 se muestra la caracterización resultante de ambos nanomateriales (Tabla A1.3.1 y Figura A1.3.1). Los resultados recogidos en la Tabla A1.3.1 muestran que ambos nanomateriales contenían nanopartículas de plata de aproximadamente 10 - 15 nm y plata disuelta en altas proporciones, lo que dificulta la detección y caracterización de las nanopartículas en SP-ICP-MS. De hecho, los valores críticos de tamaño tras la dilución son similares a los tamaños promedio de las nanopartículas, lo que justifica la sobreestimación de los tamaños medidos en SP-ICP-MS. Por otro lado, la afirmación de que a la vista de las distribuciones mostradas en la Figura 1.3.5 no se han detectado las nanopartículas más pequeñas está totalmente justificada, confirmando la validez del procedimiento propuesto.

1.3.4. CONCLUSIONES

Se ha propuesto y validado un procedimiento para evaluar críticamente y confirmar la validez de la información cuantitativa obtenida en SP-ICP-MS. Esta estrategia está basada en la estimación de los valores críticos de tamaño y el análisis de diluciones sucesivas. Si la distribución de tamaños obtenida está por encima del valor crítico de tamaño estimado en la muestra, la información puede considerarse cuantitativa; de lo contrario, la información deberá considerarse cualitativa o semicuantitativa. Este procedimiento se ha validado frente a dos casos genéricos en los que se considera tanto la presencia de especies disueltas, que puede eliminarse por dilución, como las situaciones en las que la intensidad de la línea base de la muestra es similar a la de un blanco. Además, el procedimiento también ha sido aplicado al análisis de nanomateriales antimicrobianos, justificando la incapacidad de SP-ICP-MS para proporcionar información cuantitativa en los casos estudiados, lo que ha servido para confirmar la validez del procedimiento propuesto.

2. DETECCIÓN DE CÉLULAS INDIVIDUALES MEDIANTE ICP-MS

2.1. INTRODUCCIÓN

El modo de análisis de partículas individuales puede aplicarse en ICP-MS no sólo a partículas de naturaleza inorgánica u orgánica, sino también a distintos tipos de biopartículas (células, bacterias, microalgas, levaduras...). Este modo de trabajo se conoce genéricamente como detección de células individuales (SC-ICP-MS) y permite la detección y cuantificación del contenido de distintos elementos en células individuales [167].

Las células son la unidad morfológica y funcional de todos los organismos vivos. Debido a la complejidad estructural asociada a ellas, células del mismo tipo que han sido incubadas en las mismas condiciones fisiológicas o han sido expuestas a los mismos estímulos externos, pueden exhibir diferencias significativas en la expresión intracelular de las biomoléculas. Esta variación célula a célula en los genes, transcripciones y proteínas puede ser la causa de varias enfermedades o de trastornos neurológicos y del desarrollo. Debido a esto, surge la necesidad de desarrollar nuevos métodos que permitan el análisis célula a célula y obtener información de esa variabilidad celular. Los metales son elementos importantes para el mantenimiento de la integridad de la estructura del ADN y ARN y en otros procesos biológicos. Es por esto, que el estudio de la variación celular en términos de metalómica es de vital importancia [81,168,169]. Los métodos tradicionales utilizados para la determinación del contenido de metales de las células proporcionan concentraciones de masa promedio, ya que se asume una distribución homogénea de los metales en las células [81]. Sin embargo, la cuantificación del contenido de metales en células individuales puede ayudar a comprender los mecanismos de absorción y eliminación de los metales o de nanopartículas que contienen metales por parte de las células, los mecanismos de interacción entre los fármacos metálicos y las células, y la distribución de nutrientes entre una población de células [80].

SC-ICP-MS es una técnica que permite el análisis célula a célula. Esta técnica permite cuantificar la absorción y bioacumulación de metales y nanopartículas metálicas en las células, así como los metales endógenos de las mismas. SC-ICP-MS es capaz de proporcionar información sobre el contenido de los metales por célula, la distribución de metales en la población de células, el número de células que contienen metales o nanopartículas metálicas y el número de nanopartículas por célula [167].

La mayoría de los conceptos y procedimientos discutidos para SP-ICP-MS pueden ser aplicados directamente en SC-ICP-MS. Cuando se introduce en el plasma

una suspensión de células a una concentración suficientemente baja, cada una de las células será vaporizada, atomizada e ionizada y se generará un paquete de iones a partir de los metales presentes en las células que podrá ser detectado como un evento discreto. Para que cada evento detectado corresponda a una célula individual se requiere usar suspensiones muy diluidas (10^8 células L^{-1}) y una frecuencia de adquisición de datos lo suficientemente elevada [167]. Asimismo, los cálculos para SC-ICP-MS también son similares a los de SP-ICP-MS, con la excepción de que en este caso no es necesario convertir las distribuciones de masa en tamaño, ya que la información requerida en SC-ICP-MS es la distribución en masa del elemento medido en la población de células [81].

El primer manuscrito donde se propuso el uso del término de SC-ICP-MS fue publicado por Li *et al.* en 2005, quienes analizaron muestras de bacterias incubadas en un medio rico en uranio y demostraron que las señales de uranio procedían de compuestos de uranio incorporados en bacterias individuales, las cuales se comportaban como partículas grandes en el ICP [170]. A partir de entonces, SC-ICP-MS ha sido utilizado para el análisis de diferentes tipos de sistemas unicelulares de distintos orígenes, como líneas celulares humanas o de otros mamíferos, bacterias, levaduras o algas [81,168]. Algunos parámetros como el tamaño de la célula, la morfología o la estabilidad, determinada por la composición o estructura de las mismas, tienen una influencia en el análisis mediante SC-ICP-MS, y es en este contexto donde las diferencias entre SP-ICP-MS y SC-ICP-MS se hacen más evidentes debido a que la estabilidad de las nanopartículas y de las células no es la misma. En función del tipo de célula el problema puede ser más o menos complejo. Algunas células, como las bacterias y levaduras, son bastante resistentes y es posible trabajar con ellas en suspensiones acuosas simples, mientras que con otras células es necesario trabajar en medios óptimos que prevengan su disrupción, ya que la existencia de gradientes de presión osmótica entre las células y los medios podrían producir la lisis de las células, y con ello, la liberación de los analitos en la suspensión [81]. Asimismo, los medios utilizados podrían inducir efectos matriz que deben tenerse en cuenta durante el análisis. Además, algunas células tienden a adherirse a las superficies, lo que conduce a un menor rendimiento de nebulización y efectos memoria, problema que puede ser minimizado mediante un proceso de tripsinización [81]. Por otro lado, para mejorar los problemas de estabilidad se puede realizar una fijación química de la estructura celular con diferentes fijadores como formaldehído. La fijación celular es muy utilizada en situaciones en las que existe un período de tiempo entre la preparación y el análisis de las células y se realiza para evitar la degradación celular, o cuando la preparación de las muestras puede afectar a la estructura de las células. El uso de formaldehído produce el

entrecruzamiento entre las proteínas y ácidos nucleicos de las células, preservando eficazmente la estructura y composición de las mismas [168]. En algunos casos, como cuando la concentración iónica de interés es alta en el medio o el medio es complejo, es necesario aislar las células del medio de cultivo y volverlas a suspender en medio fresco o en una solución isotónica que no contenga el elemento de interés. De este modo, se evitarán señales de fondo altas, interferencias o el exceso de partículas, que podrían enmascarar la señal generada por las células individuales [167].

Otro problema importante asociado a SC-ICP-MS está relacionado con la introducción de muestra en el ICP. Los sistemas de introducción de muestra convencionales suelen estar formados por una cámara de nebulización ciclónica y un nebulizador neumático concéntrico, los cuales están diseñados para filtrar las partículas grandes (hasta 3 - 5 μm) y evitar que entren al plasma [80,81,168]. Sin embargo, algunas células son más grandes que el tamaño de gota que permiten estos sistemas de introducción convencionales, ya que algunas células humanas pueden tener tamaños entre 7 y 150 μm [168]. Nomizu *et al.* en 1994 usaron un nebulizador concéntrico para el análisis de células de 10 - 20 μm para cuantificar el contenido de calcio mediante ICP-OES, y obtuvieron un rendimiento de nebulización menor del 0,1% [171]. Asimismo, en publicaciones más recientes también se han obtenido rendimientos entre 2 - 3 % al usar sistemas de introducción convencionales en el análisis de cobalto y nanopartículas de plata en diferentes células [172,173]. Con el objetivo de superar estas limitaciones, se han desarrollado y comercializado nuevos sistemas de introducción. Estos sistemas se han diseñado para proporcionar unos rendimientos de nebulización mayores en la introducción de biopartículas intactas utilizando flujos de muestra en el rango de μL min^{-1} [174,175]. Uno de los sistemas comerciales, desarrollado por Perkin Elmer bajo el nombre de Asperon™ (Figura 2.1) [174] está formado por un nebulizador de baja presión, que garantiza que las células sobrevivan intactas al proceso de nebulización, y una cámara de nebulización lineal. Esta cámara de nebulización usa un gas complementario (*make-up*) para crear un flujo tangencial a las paredes de la cámara, evitando que las células colisionen con las paredes y se adhieran a ellas, y permitiendo su entrada al plasma. Además, el tubo interior está formado por microcanales, a los que se desvía parte del gas *make-up*, con la finalidad de evitar la deposición del líquido dentro del recorrido del flujo. Por otro lado, se ha incorporado un flujo de gas laminar para garantizar el máximo transporte de las células [174]. Con este sistema de introducción, en un estudio de absorción y distribución de nanopartículas de oro en algas unicelulares de 20 - 30 μm se obtuvieron rendimientos de nebulización de aproximadamente el 30% para nanopartículas de oro y microesferas de poliestireno de 2,5 μm dopadas con lantánidos [174,176].

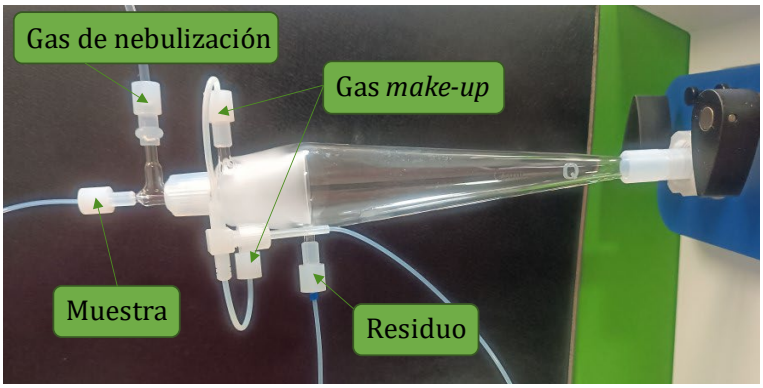


Figura 2.1. *Sistemas de introducción de muestra Asperon™ para el análisis de detección de células individuales desarrollado por Perkin Elmer.*

Otro sistema de introducción similar ha sido diseñado por Glass Expansion bajo el nombre de sistema de introducción de muestra de células individuales de alto rendimiento (Figura 2.2) [175]. Este sistema está formado por un nebulizador concéntrico que proporciona rendimientos de nebulización altos a caudales de muestra bajos (15 - 45 μL min^{-1}) y usa un caudal de argón bajo para minimizar los daños en las membranas o paredes de las células. El canal de muestreo minimiza las obstrucciones por acumulación de muestra que suelen producirse con muestras biológicas. La cámara de nebulización utiliza un flujo de gas complementario alto para evitar la deposición de las células. Con este sistema, Gomez-Gomez *et al.* obtuvieron rendimientos de nebulización en torno al 74 - 85 % en el análisis de distintas bacterias [177]. En otros estudios en los que se han analizado diferentes tipos de células, algas y levaduras, los rendimientos de nebulización fueron en torno al 8 - 15 % [178,179]. A pesar de que existen estos sistemas de introducción de muestra comerciales, a lo largo de estos años se han desarrollado otras alternativas. Una de ellas, es conocida como HECIS (*High Efficiency Cell Introduction System*) y fue diseñada por Groombridge *et al*. en 2013 y mejorada posteriormente para mejorar el rendimiento de nebulización [180,181]. Este sistema está compuesto por un nebulizador concéntrico de alto rendimiento y una cámara de nebulización lineal, de bajo caudal y consumo total, donde se usa un flujo de gas para favorecer el transporte del aerosol al plasma minimizando la deposición de células tras impactar en las paredes internas de la cámara. Los autores obtuvieron rendimientos de nebulización del 86 - 100 % en el caso de algas y otros microrganismos de 2 - 3 μm [180]. Otros autores que han utilizado este sistema para el análisis de selenio en levaduras o en células de líneas humanas han obtenido rendimientos de nebulización del 69 y 55 %, respectivamente [182,183].

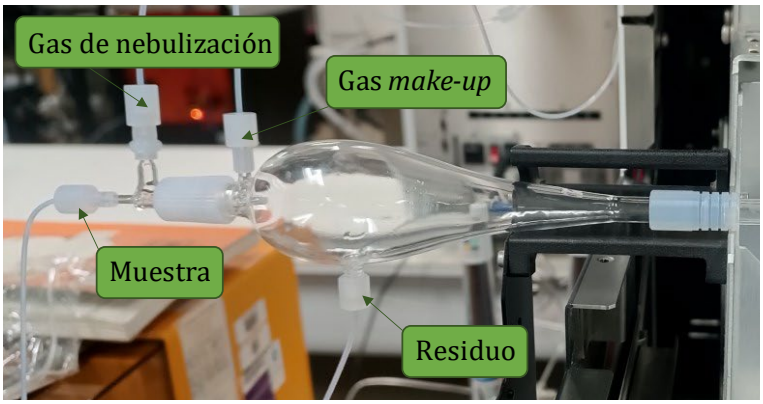


Figura 2.2. *Sistemas de introducción de muestra para el análisis de detección de células individuales desarrollado por Glass Expansion.*

Respecto a la sensibilidad, las células normalmente son sistemas más grandes que las nanopartículas; sin embargo, al contrario que en el caso de las nanopartículas, el elemento de interés no es el componente principal de la estructura. Además de factores relacionados con el analito, como la abundancia isotópica, el potencial de ionización o la existencia de interferencias espectrales, el parámetro limitante para decidir si la señal es detectada o no está relacionado con el número de átomos del analito presente en cada célula. Todos estos factores determinarán los límites de detección de SC-ICP-MS, los cuales suelen estar en el rango de los femtogramos por célula [81].

Los instrumentos ICP-MS de cuadrupolo están equipados con celdas de colisión/reacción que permiten eliminar o minimizar las interferencias espectrales. Estas celdas consisten en un multipolo situado antes del analizador de cuadrupolo, presurizado con un gas en el que las interferencias poliatómicas colisionan con un gas inerte (He) seguido de una discriminación de energía cinética (KED), o con un gas de reacción (H_2, O_2, CH_4, NH_3, CH_3F) que reacciona con el analito (modo *mass-shift*) o con la interferencia (modo *on-mass*) [184]. Sin embargo, el uso de estos métodos normalmente empeora los parámetros analíticos y produce un aumento de los límites de detección [118] y un ensanchamiento de las señales, siendo este último efecto más significativo con gases más pesados y reactivos (O_2 o NH_3) que con gases ligeros (H_2 o He) [184].

En función del instrumento ICP-MS utilizado, la detección de células individuales puede realizarse mediante la monitorización de un elemento o de varios. Hasta la fecha, la mayoría de los instrumentos ICP-MS de cuadrupolo que trabajan en modo de detección de células individuales, solamente monitorizan un elemento. Sin embargo, en la práctica, es usual medir diferentes elementos o isótopos en lotes secuenciales [185]. A pesar de ello, la información elemental o isotópica obtenida no puede ser comparada con las mismas células. Con el objetivo de superar esta limitación, estudios recientes han propuesto un novedoso método con ICP-MS de cuadrupolo para detectar dos elementos o isótopos en partículas/células individuales mediante el barrido alternativo de dos relaciones *m/z* a una frecuencia extremadamente pequeña [185,186]. Sin embargo, el problema de este método es que los eventos de partículas/células se dividen en períodos del tiempo de lectura separados para diferentes *m/z*, lo que da lugar a eventos incompletos para cada elemento o isótopo [185]. Otra técnica emergente en los últimos años en términos de análisis de células individuales está basada en el uso de espectrómetros de tiempo de vuelo (TOF-ICP-MS). La técnica de TOF-ICP-MS permite la detección multielemental y simultánea de la práctica totalidad de elementos de la tabla periódica [186–188]. El interés en obtener información de dos elementos simultáneamente se debe a dos razones. La primera es que la determinación de la estequiometría elemental entre elementos exógenos y endógenos permitiría explicar la interacción entre las nanopartículas y las células [186,188,189]. Además, permitiría diferenciar la naturaleza de los eventos de partículas y células presentes en la muestra. La segunda razón es que se podrían evaluar los efectos biológicos que tienen los elementos exógenos en los contenidos de elementos endógenos, lo que afecta a su vez, a los procesos biológicos y viabilidad de las células [188,189]. Sin embargo, la desventaja de los instrumentos de TOF es que su sensibilidad actual es de uno o dos órdenes de magnitud menor respecto a los ICP-MS de cuadrupolo [168] y que la frecuencia de adquisición de datos de los equipos comerciales es del orden de 1000 Hz.

Los continuos avances de la técnica de detección de células individuales a lo largo de estos años han permitido aplicarla en diferentes campos científicos. Las aplicaciones más frecuentes son la determinación de la distribución de elementos endógenos en las células (Cu, Fe, K, Na, Zn, P, S) y la evaluación de la absorción y distribución de elementos exógenos en las mismas. Las células pueden exponerse a metales en el contexto de diferentes aplicaciones, como estudios de metalofármacos, exposición a nanopartículas o el uso de etiquetas metálicas [81,190]. Cabe destacar que la mayoría de los estudios que se recogen en la bibliografía [81] están basados

en el análisis de células, algas o levaduras, siendo muy limitados los realizados con bacterias.

Groombridge *et al.* analizaron levaduras, algas y cianobacterias mediante SC-ICP-MS y detectaron elementos relevantes biológicamente como C, Mg, Al, P, S, K, Ca, Cr, Mn, Fe, y Zn [180]. Existen numerosos estudios relacionados con la determinación unielemental y cuantificación de elementos endógenos en distintas líneas celulares, algas y levaduras en modo de detección de células individuales [178,181,191–196]. Estos estudios demostraron la variación de la distribución de elementos endógenos en función de la línea celular estudiada. Otros estudios habituales son aquellos en los que distintos tipos de células son expuestas a elementos exógenos o incubadas en medios ricos en elementos exógenos. Con el objetivo de evaluar la absorción de elementos exógenos, Ho *et al.* estudiaron la absorción de bismuto en bacterias y demostraron que SC-ICP-MS permitía detectar y monitorizar rápidamente los cambios en el contenido de bismuto en las bacterias [197]. Asimismo, Shi *et al.* monitorizaron la absorción de mercurio en protozoos a distintas concentraciones, demostrando su acumulación en estos microorganismos [198]. Otros microorganismos como algas y células humanas también se usaron para evaluar la absorción de arsenato y los efectos tóxicos asociados a su presencia [199,200]. La presencia de elementos como el cromo o el cobre tras su exposición en distintas células, algas y levaduras también ha sido estudiada mediante SC-ICP-MS [192,201–203], así como la exposición de nanopartículas de teluro, plata, oro, selenio y ZnO en bacterias, algas y células [173,177,182,186,204–207], así como de otros nanomateriales como *quantum dots* [208]. Como se ha comentado previamente, el uso de SC-TOF-ICP-MS permite el análisis multielemental y la identificación de los microorganismos por medio del análisis de elementos endógenos característicos de los mismos. Von der Au *et al.* diferenciaron varias especies de algas mediante el análisis de sus elementos endógenos por SC-TOF-ICP-MS [187], mientras que Lum *et al.* demostraron la interacción entre nanopartículas de plata y algas debido a que se detectó tanto la plata como los elementos endógenos de las algas simultáneamente [186]. Estos autores también demostraron los efectos que tiene la absorción de elementos exógenos en el contenido de elementos endógenos, ya que observaron que elementos endógenos como el Mn, Cu y Zn aumentaron tras la exposición de nanopartículas de plata, mientras que el contenido de Mg disminuyó [186].

Respecto a la aplicación relacionada con la absorción de metalofármacos, Turiel *et al.* estudiaron la absorción de nanopartículas de óxido de hierro, las cuales estaban conjugadas con cisplatino, en células cancerosas con el objetivo de desarrollar una estrategia de administración de fármacos nueva y eficaz para proporcionar cisplatino a células tumorales [209]. Zhen *et al.* determinaron el contenido

intracelular de un agente antitumoral constituido por gadolinio en células tumorales y no tumorales tras estudiar diferentes concentraciones y tiempos de exposición [210]. Otros fármacos estudiados estaban basados en arsénico y fueron objeto de estudio para evaluar la absorción y citotoxicidad en el tratamiento de células de leucemia [211,212]. Por su parte, Sun *et al.* estudiaron la absorción y eliminación de un compuesto antitumoral compuesto por cobalto y curcumina con el objetivo de monitorizar el cobalto en células para intentar explicar los procesos de metabolismo y el transporte del fármaco en células cancerosas [172].

El objetivo principal de este capítulo se centra en el desarrollo de una metodología analítica basada en la técnica de detección de células individuales mediante SC-ICP-MS para el análisis de cultivos de bacterias *E. coli* previamente incubados con plata (I) y nanopartículas de plata. Los objetivos específicos de este apartado son:

- Estudiar y evaluar dos sistemas de introducción de muestra para determinar las condiciones óptimas de trabajo para la detección de plata mediante SC-ICP-MS.

- Aplicar estos sistemas de introducción al análisis de plata en muestras de bacterias incubadas con plata (I) y nanopartículas de plata de 10 nm y evaluar la información obtenida mediante SC-ICP-MS.

- Identificar elementos endógenos útiles para ser utilizados como marcadores de bacterias en SC-ICP-MS.

- Evaluar el uso de marcadores endógenos en estudios con bacterias mediante SC-ICP-MS.

2.2. EXPERIMENTAL

2.2.1. Instrumentación

Para la determinación de los contenidos totales de plata en las muestras se empleó un espectrómetro de masas con plasma de acoplamiento inductivo como fuente de ionización (ICP-MS) Agilent 8900 (Agilent Technologies, Tokio, Japón), equipado con una cámara refrigerada de tipo Scott (2^0C) y un nebulizador concéntrico de vidrio MicroMist (Glass Expansion, Melbourne, Australia). La adquisición de datos se realizó para tiempos de integración de 0,3 s, con 100 barridos por réplica, un total de 20 réplicas por medida y 3 puntos por pico. El isótopo monitorizado fue ^{107}Ag.

El análisis semicuantitativo de las muestras se realizó con un equipo ICP-MS Agilent 8800 Triple Quad (Agilent Technologies, Tokio, Japón) en modo convencional. Los análisis se realizaron usando helio como gas de colisión en la celda. Los parámetros fijados se detallan en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. *Parámetros instrumentales para el ICP-MS Agilent 8800.*

Parámetros instrumentales	
Potencia RF	1550 W
Flujo de gas de nebulización (argón)	1,2 L min^{-1}
Flujo de gas Helio	4,5 mL min^{-1}
Entrada de la celda	-40 a -50 V
Salida de la celda	-60 a -70 V
Deflector	1 - 3 V
Plate bias	-60 V
OctQ bias	-18 V
Energía de discriminación	3 mV

El análisis mediante la técnica de detección de células individuales se realizó con dos espectrómetros ICP-MS diferentes. El primer instrumento era un ICP-MS Perkin Elmer NexION 2000B (Perkin Elmer, Toronto, Canadá). Para los análisis se utilizó un sistema de introducción de muestra basado en una cámara de flujo lineal Asperon™ (Perkin Elmer) equipada con un micronebulizador concéntrico de vidrio de alta eficiencia (Meinhard). Las suspensiones se midieron mediante SC-ICP-MS usando el *software* Syngistix™ Single Cell-Application versión 2.5 (Perkin Elmer Inc.) y se procesaron aplicando un criterio 5σ. El segundo instrumento era el ICP-MS/MS Agilent 8900 utilizado en modo de detección de partículas individuales. Para los análisis se utilizó un sistema de introducción de muestra de células individuales de alto rendimiento basado en una cámara de nebulización de flujo lineal y un micronebulizador de vidrio de alto rendimiento (Glass Expansion, Melbourne, Australia). Las suspensiones se midieron usando el *software* MassHunter 4.3 (versión G72dC C.01.03) (Agilent Technologies). Los barridos de tiempo registrados se exportaron y procesaron con el *software* de acceso abierto SPCal versión 0.7.1 [163] usando la opción de filtro de Poisson.

También se utilizaron hojas de cálculo Excel (Microsoft, Redmond, EE.UU.) y el *software* de análisis de datos OriginPro 2019b (OriginLab Corporation,

Northampton, EE.UU.). Los parámetros instrumentales y de adquisición en modo de detección de células individuales se muestran en la Tabla 2.2 para ambos instrumentos.

Tabla 2.2. *Parámetros instrumentales y de adquisición de datos para SC-ICP-MS.*

ICP-MS	Perkin Elmer NexION 2000B	Agilent 8900
Parámetros instrumentales		
Potencia RF	1600 W	1550 W
Flujo de gas argón		
Plasma	15 L min^{-1}	15 L min^{-1}
Auxiliar	1,2 L min^{-1}	0,9 L min^{-1}
Nebulizador	0,3 L min^{-1}	0,3 L min^{-1}
Make-up	0,9 L min^{-1}	0,9 L min^{-1}
Caudal de introducción de muestra	12 - 15 µL min^{-1}	15 - 18 µL min^{-1}
Parámetros de adquisición de datos		
Tiempo de lectura	100 µs	100 µs
Lecturas por réplica	600.000	600.000
Tiempo total de adquisición	60 s	60 s
Isótopos monitorizados	^{107}Ag, ^{197}Au	^{107}Ag, ^{151}Eu, ^{66}Zn

2.2.1. Estándares y reactivos

Las suspensiones de nanopartículas de plata utilizadas para el desarrollo metodológico de SC-ICP-MS se prepararon a partir de estándares comerciales de nanoComposix (nanoComposix, St. Diego, EE.UU.) estabilizadas con citrato y polietilenglicol (PEG). Los diámetros nominales de las nanopartículas de plata estabilizadas con citrato eran de 60 ± 7 nm, mientras que las nanopartículas de plata estabilizadas con PEG eran de 51 ± 4 nm. La suspensión de microesferas de europio (Eu) se preparó a partir de estándares comerciales de Bang Laboratories (Indiana, EE.UU.) y tenían un diámetro nominal de 2,36 ± 0,22 µm. Las suspensiones de nanopartículas de plata utilizadas para preparar las muestras de bacterias con plata (Apartado 2.2.4) se prepararon a partir de estándares comerciales de nanoComposix (nanoComposix, St. Diego, EE.UU.) estabilizadas con citrato y con un diámetro nominal de 10,3 ± 2,1 nm.

Los rendimientos de nebulización se determinaron con estándares de nanopartículas monodispersas de oro y de plata estabilizadas con PEG, procedentes de nanoComposix, y con un diámetro nominal de 47,8 ± 1,8 nm y 51 ± 4 nm, respectivamente.

Las suspensiones de nanopartículas se prepararon a partir de alícuotas de las suspensiones concentradas, por pesada en una balanza analítica GH-200 (A&D, California, EE.UU.) con una precisión de ± 0,1 mg, y tras 1 minuto de sonicación en un baño de ultrasonidos (Ultrasons, J.P. Selecta, Barcelona, España), o en una balanza Denver Si-234. Se evitaron mayores tiempos de sonicación para evitar un calentamiento excesivo de las suspensiones.

Las disoluciones acuosas de oro, plata, zinc y multielementales (VHG-SM68-1, VHG-SM68-2 y VHG-SM68-3) se prepararon a partir de una disolución de estándar de 100 - 1000 mg L^{-1} para cada elemento (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU. y Romil, Cambridge, Reino Unido) y se diluyeron en HNO_3 al 1% o al 25% (*v/v*) (Romil, Cambridge, Reino Unido) o agua ultrapura, obtenida a partir de un equipo de purificación Milli-Q (Millipore Co., Bedford, EE. UU.) o Elga (Marlow, Reino Unido). Las disoluciones se prepararon de la misma manera que las suspensiones de nanopartículas sin sonicación previa.

Además, se utilizó HNO_3 (67-69% *v/v*) (Romil, Cambridge, Reino Unido) y H_2O_2 (30% *v/v*) (Romil, Cambridge, Reino Unido). Para los cultivos microbiológicos se utilizaron disoluciones de suero fisiológico estéril (SFE) (Panreac, Barcelona, España), tampón fosfato salino (PBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.), caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI) (Difco, Detroit, EE.UU.), caldo de Mueller-Hinton (MH), agar Mueller-Hinton (Scharlau, Scharlab. S.L., Barcelona, España), glicerol (Panreac, Barcelona, España) y paraformaldehído (Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, Walthman, EE.UU.). Las disoluciones y los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave 437-P (J. P. Selecta, Barcelona, España) durante 20 minutos a 121^{0}C y 1 atmósfera.

2.2.3. Cepas bacterianas

Las cepas de bacterias Gram-negativas utilizadas fueron *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* cepa JM109 (Promega, Madrid, España). Las cepas se cultivaron en agar Mueller-Hinton a 37^{0}C durante 24 h, y se guardaron a -80^{0}C en leche desnatada estéril.

2.2.4. Muestras de cultivos bacterianos con plata

Las muestras estudiadas son distintas cepas de bacterias *Escherichia coli* incubadas previamente con Ag(I) o nanopartículas de plata de 10 nm estabilizadas con citrato, en medio de cultivo BHI o MH + 2% Tween 80. Sobre la optimización de estos medios de cultivo se discutirá con más detalle en capítulos posteriores (Capítulo 3.1).

Las distintas muestras utilizadas a lo largo de este estudio fueron:

- Bacterias *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* JM109 incubadas con 0,5 mg L^{-1} de Ag(I) en medio BHI.

- Bacterias *E. coli* ATCC 25922 incubadas con 1 mg L^{-1} de Ag(I) en medio MH + 2% Tween 80.

- Bacterias *E. coli* ATCC 25922 incubadas con 2 mg L^{-1} de nanopartículas de plata de 10 nm estabilizadas con citrato en medio MH + 2% Tween 80.

Asimismo, se contó con cultivos bacterianos de control en medio BHI y MH + 2% Tween 80, en los que no se añadió plata en ninguna de sus formas, y controles de los medios de incubación. Además, para comprobar la eficacia de los lavados, se prepararon unos controles de medio de cultivo BHI a los que se les añadieron 0,5 mg L^{-1} de Ag(I) o 0,5 mg L^{-1} nanopartículas de plata de 60 nm estabilizadas con citrato, y un control de medio MH + 2% Tween 80 al que se le añadió 2 mg L^{-1} nanopartículas de plata de 10 nm estabilizadas con citrato.

2.2.5. Procedimientos

2.2.5.1. Preparación de muestras

Las cepas de bacterias *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* JM109 se sembraron en placas de Petri con agar MH y se incubaron durante 24 horas a 37^0C. Con un asa de platino, previamente flameado, se cogieron varias colonias procedentes de estos cultivos, y se suspendieron en 25 mL de medio BHI o MH + 2% Tween 80. Tras esto, las bacterias fueron expuestas a las concentraciones señaladas anteriormente de Ag(I) y nanopartículas de plata durante 24 horas a 37^0C y 100 rpm. Los controles de bacterias (sin exposición a plata) y los controles de medio de cultivo se sometieron al mismo proceso.

Tras el tiempo de exposición, las suspensiones de bacterias se centrifugaron a 5300 rpm durante 15 min (centrífuga Digicen 20). El sobrenadante de cada muestra se eliminó y el residuo, el cual contenía las bacterias, se lavó dos o tres veces con PBS

a las mismas condiciones. Tras el último lavado, el residuo resultante se resuspendió en 5 mL de PBS. Las muestras se guardaron a 4^0C hasta su uso.

Una parte de las muestras de bacterias se sometieron a un proceso de liofilización y fijación con paraformaldehído [213]. Estos procesos se realizaron con el objetivo de preservar en el tiempo la estructura y la composición de las bacterias desde su incubación con plata hasta el momento de análisis, ya que proporciona rigidez mecánica y previene la descomposición celular y la autolisis [168,214]. Las muestras de bacterias *E. coli* ATCC 25922 incubadas con Ag(I) y nanopartículas de plata de 10 nm en medio MH + 2% Tween 80 se centrifugaron a 6000 g durante 3 minutos para eliminar el sobrenadante de PBS. Se añadió una disolución de glicerol al 5% (*m/v*) en PBS a los residuos resultantes y se dejó actuar durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 6000 g durante 3 minutos y se eliminó el sobrenadante. Los residuos resultantes se congelaron a -80^0C durante toda la noche y tras ese tiempo, se liofilizaron durante 24 horas a -48^0C y 4,34x10^{-6} atm en un equipo liofilizador (Telstar Lioalfa-6). Una vez liofilizadas, las muestras se guardaron a 4^0C. Tras el proceso de liofilización, cada muestra se sometió a un proceso de fijación. Para ello, el residuo liofilizado se resuspendió en 1 mL de PBS estéril y se centrifugó a 5000 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante se desechó y se añadió al residuo 1 mL de paraformaldehído al 4% en PBS. Se dejó actuar durante 15 minutos y seguidamente se centrifugó a 5000 rpm durante 3 minutos. De nuevo, se desechó el sobrenadante y el residuo resultante se resuspendió en 1 mL de agua ultrapura. Los controles se sometieron al mismo proceso.

2.2.5.2. Determinación de los contenidos totales de plata mediante digestión ácida

Se llevó a cabo una digestión ácida para la determinación del contenido total de plata presente en las muestras liofilizadas y fijadas de cultivos bacterianos con plata (Apartado 2.2.5.1). Para ello, se cogieron 100 µL de cada muestra y se añadieron 500 µL de HNO_3 (67 - 69 % *m/v*) y 100 µL de H_2O_2 (30% *v/v*). Las suspensiones se dejaron digerir durante 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las muestras se diluyeron hasta 10 mL con una disolución de HNO_3 1% (*v/v*) y se midieron mediante ICP-MS. Se prepararon 5 réplicas de cada una de las muestras a analizar. El control de bacterias se sometió al mismo proceso.

2.2.5.3. Análisis semicuantitativo de los elementos endógenos en bacterias mediante digestión con microondas

Se llevó a cabo una digestión con microondas para la determinación semicuantitativa de los elementos presentes en las muestras liofilizadas y fijadas de cultivos bacterianos con plata (Apartado 2.2.5.1). Para ello, se añadieron 500 µL de cada muestra en vasos de teflón con tapa y 2,5 mL de HNO_3 (67 - 69 % *m/v*) y se sometieron a una digestión en un sistema microondas Milestone Ethos UP (Analytix, Reino Unido). Se aplicó un programa consistente en una primera fase de incremento de temperatura de 10 minutos hasta alcanzar 180^0C, una segunda fase de temperatura constante a 180^0C durante 30 minutos, y finalmente una etapa de enfriamiento a temperatura ambiente. Las muestras digeridas se trasvasaron a tubos de 15 mL de polietileno y se diluyeron hasta 10 mL con agua ultrapura para su posterior análisis. Se prepararon tres blancos de ataque. El control de bacterias se sometió al mismo proceso.

2.2.5.4. Detección, caracterización y cuantificación de especies de plata y zinc en bacterias mediante SC-ICP-MS

Las muestras de cultivos bacterianos con plata (Apartado 2.2.4) se midieron mediante la técnica de SC-ICP-MS para detectar la presencia de plata y zinc en las bacterias (Apartado 2.3.2.1 y 2.3.3.2).

Respecto a las muestras analizadas con el instrumento ICP-MS Perkin Elmer NexION 2000B, se cogieron 100 µL de cada muestra y se diluyeron en 2 mL de agua ultrapura. Antes del análisis, las suspensiones se volvieron a diluir con agua ultrapura para alcanzar una concentración aproximada de 10^7 - 10^8 biopartículas L^{-1}. Los controles del medio de cultivo y de las bacterias se sometieron al mismo proceso.

El rendimiento de nebulización del analito se calculó de acuerdo con los métodos de frecuencia y tamaño desarrollados por Pace *et al.* [88], usando el estándar de nanopartículas de oro de 50 nm descrito anteriormente. Se obtuvieron resultados similares para el método de la frecuencia y el método del tamaño (46,2 ± 0,6 % y 48,1 ± 0,2 %, respectivamente, n = 3). Los caudales de muestra se midieron gravimétricamente por triplicado.

Respecto a las muestras analizadas con el instrumento ICP-MS Agilent 8900, se cogieron 10 µL de cada muestra y se diluyeron en 10 mL de agua ultrapura. Antes del análisis, las suspensiones se volvieron a diluir con agua ultrapura para alcanzar una

concentración $5x10^7$ biopartículas L^{-1}. Los controles de bacterias se sometieron al mismo proceso.

El rendimiento de nebulización del analito se calculó de acuerdo con el método de frecuencia desarrollado por Pace *et al.* [88], usando el estándar de nanopartículas de plata de 50 nm descrito anteriormente. Se obtuvieron valores de rendimiento de nebulización de 32,6 ± 1,6 % (n = 3). Previamente, se utilizó el método *Dynamic mass Flow* (DMF), basado en la medición dinámica de los flujos de masa y el cual no emplea un material de referencia para el cálculo del rendimiento de nebulización [95], para la caracterización en número de partícula de este nanomaterial de plata. Los caudales de muestra se midieron gravimétricamente por triplicado.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Evaluación de los sistemas de introducción de muestra en SC-ICP-MS

Se llevó a cabo la evaluación de dos sistemas de introducción de muestra con el fin de determinar y comparar las condiciones óptimas de trabajo de cada uno de ellos en SC-ICP-MS. Tal y como se ha descrito anteriormente, por un lado, se empleó una cámara de nebulización de flujo lineal Asperon™ equipada con un micronebulizador concéntrico de alta eficiencia. Por otra parte, se empleó una cámara de nebulización de flujo lineal Glass Expansion y un micronebulizador concéntrico de vidrio. El comportamiento de los dos sistemas se evaluó inicialmente con nanopartículas de plata, con el objetivo final de su aplicación al análisis de bacterias por SC-ICP-MS.

Como se ha comentado previamente, las dos cámaras estudiadas usan un gas complementario (*make-up*) para crear un flujo tangencial a las paredes de la cámara y así, evitar la pérdida de células o bacterias (o partículas) por colisión con las paredes de la misma. Además, el gas *make-up* permite controlar el tiempo de residencia de las células dentro del plasma, y, por tanto, los distintos procesos que sufren las células y el analito independientemente del gas de nebulización. Por otra parte, el flujo laminar dentro de la cámara de nebulización garantiza el máximo transporte del aerosol.

La Figura 2.3 muestra el efecto del flujo de gas de nebulización, a diferentes flujos de gas *make-up*, en el número de partículas detectadas y en su intensidad promedio, para una suspensión de nanopartículas de plata estabilizadas con citrato de 60 nm, utilizando el sistema de introducción de la cámara Asperon™ y el micronebulizador concéntrico de alta eficiencia (Meinhard). Mientras que el número de partículas detectadas depende del rendimiento de nebulización, la intensidad

observada depende de la eficiencia de atomización de las partículas y de ionización del analito. El flujo de gas de nebulización máximo que permite seleccionar el instrumento es 0,95 L min^{-1}, mientras que el flujo total máximo permitido está en torno a 1,6 L min^{-1}.

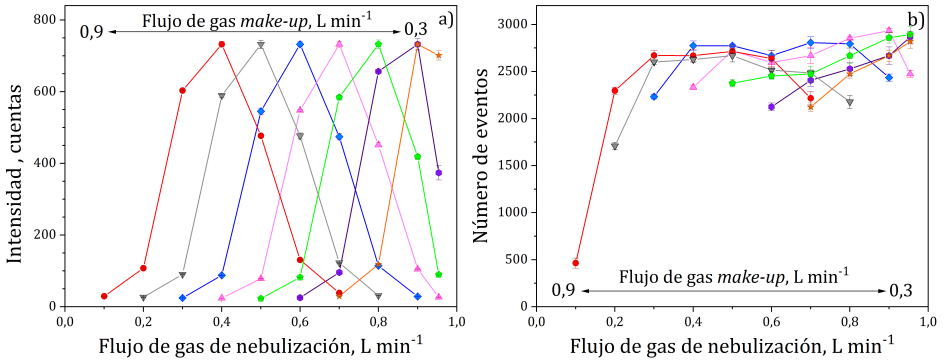


***Figura 2.3**. Efecto del gas de nebulización, a diferentes flujos de gas* make-up*, en a) la intensidad promedio y b) el número de eventos de partículas detectados. Sistema de introducción: cámara Asperon™ y micronebulizador concéntrico (Meinhard). AgNPs-citrato de 60 nm. Flujos de* make-up *(L min^{-1}): (●) 0,9; (▽) 0,8; (◆) 0,7; (△) 0,6; (⬟) 0,5; (⬢) 0,4; (★) 0,3.*

Como puede verse en la Figura 2.3.a se observaron comportamientos similares para las diferentes combinaciones del gas de nebulización y *make-up* en relación con la intensidad de los eventos, obteniendo, en todos los casos estudiados, un máximo de intensidad por partícula para un flujo total de gases (flujo de gas de nebulización + *make-up*) de 1,2 - 1,3 L min^{-1}. Además, para un flujo total de gases fijo, la intensidad se mantenía constante en las curvas estudiadas (por ejemplo, para un flujo total de gases de 1,2 L min^{-1} (combinación de gas de nebulización y *make-up* de 0,6 + 0,6, 0,5 + 0,7, 0,4 + 0,8 y 0,3 + 0,9 L min^{-1}, respectivamente), la intensidad de los eventos era en torno a 550 - 600 cuentas).

Respecto al número de partículas detectadas, se observó que para aquellas situaciones en las que se obtenía la máxima intensidad de los eventos (flujo total de gases de 1,2 - 1,3 L min^{-1}), se detectaba un número de partículas similar, que variaba entre 2500 - 2800 eventos, obteniéndose rendimientos de nebulización del analito en torno a un 55 - 61 %. Esto indicaba que, para un flujo total de gases fijo, el rendimiento de nebulización se mantenía constante en todas las curvas estudiadas.

En vista de los resultados obtenidos, se determinó que las mejores condiciones para las cuales se obtenía la mayor intensidad de eventos y el mayor número de eventos detectados eran aquellas en las que el flujo total de gases (gas de nebulización + *make-up*) era 1,2 - 1,3 L min^{-1}. Generalmente, en la bibliografía, el flujo del gas de nebulización usado está entre 0,3 y 0,5 L min^{-1}, mientras que el flujo del gas *make-up* es 0,7 L min^{-1}, para muestras de células [80,176,215–217]. Estas combinaciones de flujos de nebulización bajos y *make-up* altos permiten que las bacterias se introduzcan intactas en el plasma. Aunque podrían usarse otras combinaciones de flujo de gases, con el objetivo de garantizar que las bacterias se introdujeran intactas en el plasma, se eligió una combinación con un flujo de *make-up* de 0,9 L min^{-1}. Aunque la máxima intensidad de los eventos se obtenía para un flujo total de gases de 1,3 L min^{-1}, y, por tanto, para un flujo de 0,4 L min^{-1} del gas de nebulización, las diferencias entre los rendimientos de nebulización obtenidos para un flujo de gas de nebulización de 0,3 y 0,4 L min^{-1} eran menores del 1 %. Debido a esto, con el mismo fin de garantizar la viabilidad de las bacterias, se eligió la combinación con el menor caudal de nebulización, siendo la combinación elegida como óptima la de un caudal de 0,3 L min^{-1} del gas de nebulización y 0,9 L min^{-1} del gas de *make-up*.

Por otro lado, el sistema de introducción estudiado anteriormente se comparó con el sistema análogo para el equipo ICP-MS Agilent 8900 mediante el estudio del comportamiento de unas nanopartículas de plata de 50 nm estabilizadas con PEG. En la Figura 2.4 se muestra el comportamiento observado para este último sistema de introducción de muestra. Al igual que en el sistema análogo del ICP-MS Perkin Elmer, la máxima intensidad de los eventos se obtuvo en todas las curvas estudiadas para un flujo total de gases (gas de nebulización + *make-up*) de 1,2 L min^{-1}. Además, para un flujo total de gases fijo, la intensidad se mantenía constante en todas las curvas estudiadas (por ejemplo, para un flujo total de gases de 1,2 L min^{-1} (combinación de gas de nebulización y *make-up* de 0,2 + 1, 0,3 + 0,9, 0,4 + 0,8 y 0,5 + 0,7 L min^{-1}, respectivamente), la intensidad de los eventos se situó en torno a 520 - 550 cuentas).

Respecto al número de partículas detectadas, se observó que el máximo número de eventos se obtenía para un flujo de gas de nebulización de 0,4 L min^{-1} para todos los flujos de *make-up* estudiados. Esto indicaba que el número de eventos detectados dependía únicamente del gas de nebulización, y era independiente del gas *make-up*. El rendimiento de nebulización obtenido para un caudal de gas de nebulización de 0,4 L min^{-1} fue 32,5 ± 1,0%.

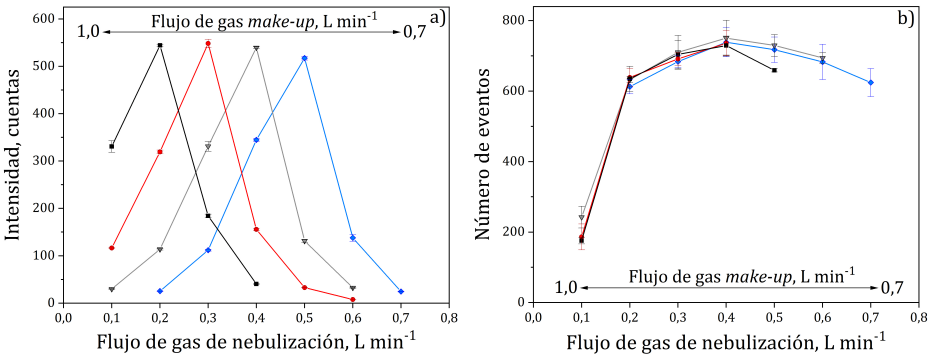


***Figura 2.4**. Efecto del gas de nebulización, a diferentes flujos de gas* make-up*, en a) la intensidad promedio y b) el número de eventos de partículas detectados. Sistema de introducción de muestra en el ICP-MS Agilent 8900. AgNPs-PEG de 50 nm. Flujos de* make-up *(L min^{-1}): (■)1,0; (●) 0,9; (▽) 0,8; (◆) 0,7.*

Por tanto, en el sistema de introducción de muestras en el ICP-MS Agilent 8900, las mejores condiciones de intensidad y número de eventos de partícula se obtendrían para un flujo total de gases de 1,2 L min^{-1}, siendo la mejor combinación aquella con 0,4 L min^{-1} del gas de nebulización, y, por tanto, con 0,8 L min^{-1} del gas *make-up*.

A pesar de que ambos sistemas presentaban la máxima intensidad de los eventos para un flujo total de gases de 1,2 - 1,3 L min^{-1} a la vez que éste se mantenía constante para un flujo total de gases fijo, se observó que los dos sistemas no tenían comportamientos similares. En el caso del sistema de introducción para el ICP-MS Perkin Elmer NexION 2000B (Cámara Asperon™ y micronebulizador concéntrico Meinhard), el rendimiento de nebulización se mantenía constante para un flujo total de gases fijo, mientras que en el caso del sistema de introducción para el ICP-MS Agilent 8900, se mantenía constante para un flujo de gas de nebulización fijo. Las condiciones de introducción de muestra elegidas en ambos sistemas fueron las mismas (0,3 L min^{-1} del gas de nebulización y 0,9 L min^{-1} del gas de *make-up*).

En la Tabla 2.3 se recogen los límites de detección de concentración en número para ambos sistemas de introducción de muestra en SC-ICP-MS con las condiciones elegidas de 0,3 L min^{-1} del gas de nebulización y 0,9 L min^{-1} del gas de *make-up*, calculados a partir de la ecuación (32) del Capítulo 1.1. Estos LOD están en el rango de 300 - 600 partículas mL^{-1}, lo que concuerda con los datos obtenidos mediante SP-ICP-MS en el Capítulo 1.1 (Apartado 1.1.3.2.4) para distintos sistemas comerciales de introducción de muestra, entre los que se incluye el compuesto por la cámara

Asperon™ y el micronebulizador concéntrico. Como se comentó en dicho capítulo, estos LOD podrían mejorarse al aumentar el tiempo total de adquisición.

Tabla 2.3. *LOD de concentración en número para los dos sistemas de introducción. Caudales de introducción de muestra: 0,3 L min^{-1} de gas de nebulización y 0,9 L min^{-1} de gas* make-up*. Tiempo total de adquisición: 60 s. Tiempo de lectura: 100 µs.*

Sistema de introducción de muestra	**η_{neb} %**	**$Q_{muestra}$ mL min^{-1}**	**$LOD_{número}$ L^{-1}**
Cámara Asperon™ + micronebulizador concéntrico (Meinhard)	58,4 ± 1,2	0,015 ± 0,001	3,4x10^5
Cámara de flujo lineal + micronebulizador concéntrico (Glass Expansion)	30,8 ± 0,6	0,016 ± 0,001	6,1x10^5

2.3.2. Aplicación de los sistemas de introducción en el análisis de biopartículas

Como se ha comentado previamente, un problema asociado con SC-ICP-MS está relacionado con la introducción de muestra y el tipo de analito introducido en el ICP-MS. La estabilidad de las nanopartículas y las células es distinta y depende del tipo de células, siendo las bacterias uno de los tipos más robustos, por lo que es posible trabajar con ellas en soluciones acuosas sencillas, sin que se produzca la lisis celular [81]. Por otro lado, otro factor importante es la diferencia de tamaños entre las nanopartículas y las células. En el caso de las células, tamaños por encima de los 5 - 10 µm podrían afectar a la atomización y nebulización de las partículas en comparación con las nanopartículas y las especies disueltas.

Las bacterias *E. coli* utilizadas a lo largo de esta Tesis Doctoral tenían una longitud promedio de 1,94 ± 0,43 µm (datos experimentales según imágenes de TEM mostradas en el Capítulo 3.2). Con el fin de evaluar si la diferencia en la escala de tamaños de estas bacterias con las nanopartículas podía afectar a la introducción de la muestra, y suponiendo que las bacterias se comportan de manera similar a microesferas de poliestireno etiquetadas con europio, se midieron suspensiones de estas microesferas, las cuales tenían un tamaño de 2,36 µm, y se determinó el rendimiento de nebulización. El rendimiento de nebulización obtenido con el método de la frecuencia para las micropartículas con Eu fue 30,3 ± 1,0 %. Este valor se comparó con el rendimiento obtenido para unas nanopartículas de plata estabilizadas con PEG de 50 nm, que fue de 32,6 ± 1,6 %. Aplicando un test t con un nivel de confianza del 95% se puede afirmar que ambos resultados están en

concordancia, y, por tanto, se puede confirmar que las microesferas de 2,36 µm y las nanopartículas de 50 nm tenían un comportamiento análogo. Debido a esto, el rendimiento de nebulización para la caracterización de bacterias individuales que contienen plata se puede calcular con estándares de nanopartículas. A su vez, este comportamiento concuerda con el determinado por Laborda *et al.*, quienes demostraron que las micropartículas de poliestireno con tamaños de hasta 2 - 3 µm se nebulizan igual que las especies disueltas; así como la dependencia del rendimiento de nebulización con respecto al tamaño para micropartículas de más de 3 - 5 µm [218].

2.3.2.1. Detección de plata en bacterias por SC-ICP-MS

Tras optimizar los sistemas de introducción de muestra, se llevó a cabo el análisis de muestras de bacterias incubadas previamente con plata mediante SC-ICP-MS. Adicionalmente, con el objetivo de comprobar si eran eficientes los lavados realizados con PBS durante la preparación de las muestras para eliminar la plata sobrenadante que no había interaccionado con las bacterias, se analizaron unos controles del medio de cultivo expuesto a plata. El medio de cultivo BHI se expuso a Ag(I) y nanopartículas de plata de 60 nm estabilizadas con citrato y ambos controles se sometieron a dos procesos de lavado. Se aplicaron los conceptos de valores críticos discutidos en el Capítulo 1.1 relacionados con la discriminación de los eventos de línea base de los de partículas mediante el criterio 5σ y la determinación del valor crítico, $Y_{C,N}$, para la detección de partículas a partir de la ecuación (30) del Apartado 1.1.3.2.2. En la Figura 2.5 se muestran los barridos de estos controles, y en todos ellos, se observaron eventos por encima del valor crítico Y_C establecido para la discriminación de eventos de línea base y de partículas, el cual tenían un valor de 2 cuentas. En el control del medio de cultivo (Figura 2.5.a), se obtuvo un número de eventos mayor que el valor crítico para la detección de partículas $Y_{C,N}$, calculado a partir de un blanco de agua ultrapura, y cuyo valor fue de 6 eventos, lo que confirmaba la presencia de plata. Estos eventos detectados podrían ser consecuencia de la presencia de trazas de plata en el medio de cultivo, las cuales podrían estar formando precipitados de plata por la presencia de NaCl en la composición del medio. Por otro lado, esta suspensión contenía PBS ya que era el medio en el que se encontraba originalmente la muestra y no se eliminó antes de la medida de SC-ICP-MS, el cual también podía contener trazas de plata y contribuir a la presencia de eventos.

En el caso de las muestras de medio de cultivo expuesto a Ag(I) y nanopartículas de 60 nm, para la determinación del valor crítico para la detección de partículas se tomó como blanco de matriz el control del medio de cultivo BHI (sin exposición a bacterias ni plata) y el valor obtenido de $Y_{C,N}$ estuvo en torno a 200 eventos. En el caso de la exposición a Ag(I) (Figura 2.5.b), se obtuvo un número de eventos menor que $Y_{C,N}$, lo que confirmaba la ausencia de partículas en la muestra, a la vez que no se detectó plata disuelta. Esto indicaba que los lavados permitían eliminar la plata sobrenadante que no había interaccionado con las bacterias. Por el contrario, en el caso de la exposición a nanopartículas de plata de 60 nm (Figura 2.5.c) se observó un elevado número de eventos, mayor que $Y_{C,N}$, correspondientes a nanopartículas de plata, lo que indicaba que dos procesos de lavados no conseguían eliminar las nanopartículas eficazmente. Debido a esto, en los siguientes experimentos se aumentó a tres el número de lavados tras el proceso de incubación.

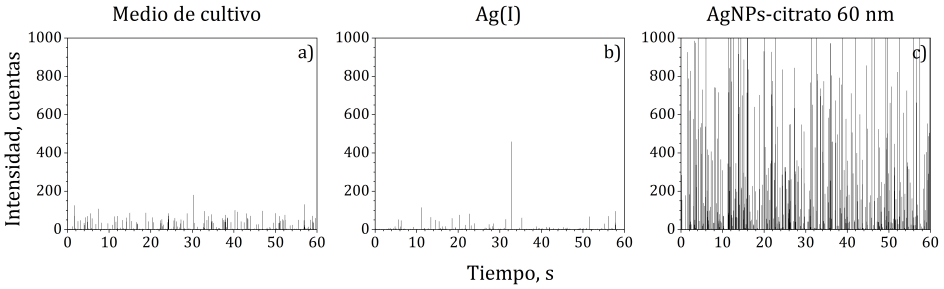


***Figura 2.5**. Barridos de tiempo para las muestras del medio de cultivo BHI: a) control, b) expuesto a Ag(I), c) expuesto a AgNPs de 60 nm.*

Debido a la presencia del elevado número de partículas detectadas en el medio de cultivo BHI sin plata y tras llevar a cabo una optimización de los medios de cultivo, la cual se discutirá con detalle en el Capítulo 3.1, el estudio de la eficacia de tres lavados durante la preparación de la muestra se realizó utilizando un medio de cultivo MH + 2% Tween 80.

El medio MH + 2% Tween 80 se expuso a nanopartículas de plata de 10 nm estabilizadas con citrato y se sometió a tres procesos de lavado. En la Figura 2.6 se muestran los barridos de estos controles, en los que se observaron eventos por encima del valor crítico Y_C (Y_C = 2 cuentas). En el control del medio de cultivo (Figura 2.6.a), se obtuvo un número de eventos mayor que el valor crítico para la detección de partículas ($Y_{C,N}$ = 6 eventos), calculado a partir de un blanco de agua ultrapura, lo

que confirmaba la presencia de plata. Estos eventos podrían ser consecuencia de la presencia de trazas de plata en el medio de cultivo.

En el caso de las muestras de medio de cultivo expuesto a nanopartículas de 10 nm (Figura 2.6.b), se tomó como blanco de matriz el control del medio MH + 2% Tween 80 y el valor obtenido de $Y_{C,N}$ estuvo en torno a 35 eventos. Se obtuvo un número de eventos menor que $Y_{C,N}$, lo que confirmaba la ausencia de partículas en la muestra. En estas condiciones de medida, el valor crítico en tamaño, $X_C^{tamaño}$, tenía un valor de 14,3 nm, lo que indicaba que parte de la distribución de las nanopartículas de 10 nm no se detectaría, aunque las nanopartículas no se hubieran eliminado. Al comparar este barrido con el obtenido para unas nanopartículas de 10 nm suspendidas en el medio de cultivo (sin proceso de incubación) (Figura 2.6.c), se observó un número de eventos mayor que $Y_{C,N}$, correspondientes a las nanopartículas mayores de 14,3 nm. Esta diferencia entre los dos barridos corroboraba que los tres lavados permitían eliminar las nanopartículas sobrenadantes que no habían interaccionado con las bacterias.

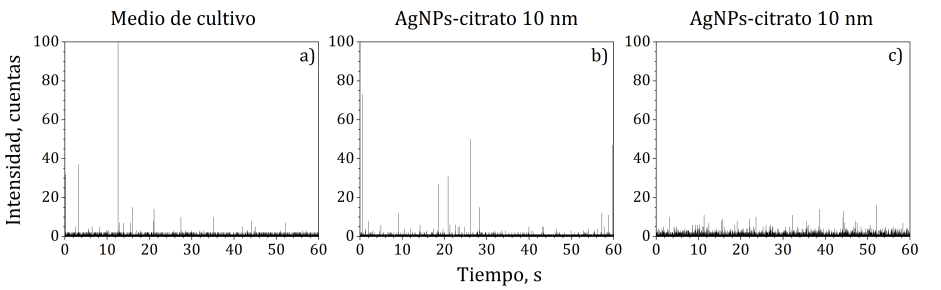


Figura 2.6*. Barridos de tiempo para las muestras en medio MH + 2% Tween 80: a) control del medio, b) medio de cultivo expuesto AgNPs de 10 nm (tres lavados) y c) AgNPs de 10 nm en medio de cultivo (sin incubación).*

Una vez el número de etapas necesarias para el lavado durante la preparación de las muestras, se llevó a cabo el análisis de bacterias *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* JM109 incubadas previamente con Ag(I) o nanopartículas de plata de 60 nm. Para ello se empleó el sistema de introducción compuesto por la cámara Asperon™ y el micronebulizador concéntrico de alta eficiencia. En la Figura 2.7 se recogen los barridos de tiempo para las muestras de *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* JM109, en los que se observaron eventos por encima del valor crítico Y_C (Y_C = 2 cuentas). En el caso de los controles de bacterias (Figura 2.7.a y Figura 2.7.c), para la determinación de

$Y_{C,N}$ se tomó como blanco de matriz el control del medio de cultivo BHI (Figura 2.5.a). En el control de *E. coli* ATCC 25922 se obtuvo un número de eventos mayor que $Y_{C,N}$ ($Y_{C,N}$ = 200 eventos), lo que confirmaba la presencia de plata como consecuencia de trazas de plata en las bacterias. En el control de *E. coli* JM109 se obtuvo un número de eventos menor que $Y_{C,N}$, confirmando la ausencia de plata.

En la Figura 2.7.b y Figura 2.7.d se muestran los barridos de tiempo para las muestras de ambas bacterias incubadas previamente con Ag(I). Aplicando los criterios de discriminación de los eventos de línea base y de partículas (Y_C = 2 cuentas) y considerando los controles de bacterias como blanco de matriz, se determinaron los valores de $Y_{C,N}$. En las muestras de bacterias *E. coli* ATCC y JM109 incubadas con Ag(I), el número de eventos era mayor que el valor crítico para la detección de partículas, siendo $Y_{C,N}$ = 600 y 200 eventos para bacterias *E. coli* ATCC y JM109, respectivamente. Esto confirmaba la presencia de biopartículas que contenían plata. En el capítulo 3 se discutirán de forma más extensa y detallada los mecanismos de acción e internalización de la plata en las bacterias. Los eventos detectados en los controles de bacterias podrían deberse a la presencia de trazas de plata en las propias bacterias y en el medio de cultivo.

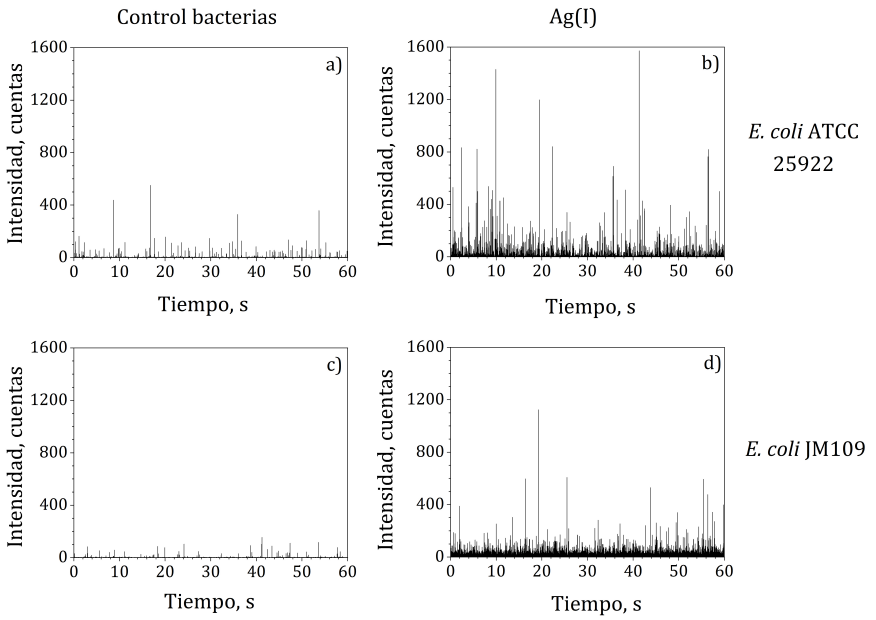


Figura 2.7*. Barridos de tiempo para las muestras de bacterias* E. coli *ATCC 25922 (a - b) y* E. coli *JM109 (c - d): control de bacterias y expuestas a Ag(I), respectivamente. Medio de cultivo: BHI.*

De la misma manera, se analizaron muestras de bacterias incubadas previamente con plata mediante el segundo sistema de introducción compuesto por la cámara de nebulización de flujo lineal y el micronebulizador de vidrio de Glass Expansion. En este caso, las bacterias incubadas fueron la cepa *E. coli* ATCC 25922 con Ag(I) o nanopartículas de plata de 10 nm estabilizadas con citrato. En la Figura 2.8 se muestran los barridos de tiempo para las tres muestras estudiadas. En estas condiciones de medida, el valor crítico Y_C para la discriminación de eventos de línea base y de partículas fue de 2 cuentas. En el control de bacterias sin exposición a plata (Figura 2.8.a), se obtuvo un número de eventos igual que el valor crítico para la detección de partículas $Y_{C,N}$, calculado a partir de un blanco de agua ultrapura, y cuyo valor fue de 6 eventos, lo que confirmaba la ausencia de biopartículas que contuvieran trazas de plata en el control de bacterias. Estos controles de bacterias de *E. coli* ATCC 25922 no se pueden comparar con los obtenidos previamente en la Figura 2.7.a debido a que las bacterias se incubaron en distinto medio de cultivo y se sometieron a distintos procedimientos de preparación como centrifugación para eliminar el medio de PBS, liofilización y fijación.

En el caso de ambas muestras de bacterias expuestas a Ag(I) y nanopartículas de plata (Figura 2.8.b y c, respectivamente), se obtuvo un número de eventos mayor que $Y_{C,N}$, calculado considerando la muestra de control de bacterias como blanco de matriz, y cuyo valor fue de 12 eventos. Esto confirmó la presencia de biopartículas que contenían plata en ambas muestras.

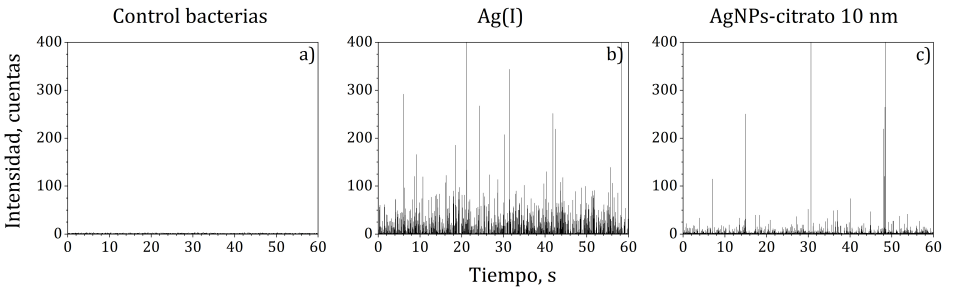


Figura 2.8*. Barridos de tiempo para las muestras de bacterias* E. coli *ATCC 25922: a) Control de bacterias, b) Bacterias expuestas a Ag(I), c) Bacterias expuestas a AgNPs de 10 nm. Medio de cultivo: MH + 2% Tween 80.*

Por tanto, tras los análisis de las muestras de bacterias incubadas previamente con plata (I) y nanopartículas de plata, se puede concluir que, ambos sistemas de introducción permiten introducir eficazmente las muestras de bacterias en el ICP-MS, así como detectar y confirmar la presencia de biopartículas que contienen plata.

2.3.2.2. Validez de la información obtenida mediante SC-ICP-MS

En el Capítulo 1.3 se ha desarrollado una estrategia para evaluar la validez de la información obtenida mediante SP-ICP-MS, la cual puede ser aplicada de forma análoga a la información obtenida mediante SC-ICP-MS. Como se ha comentado, la información sobre la masa del elemento por partícula o la concentración de biopartículas dependerán de las características de la población de partículas en la muestra y de la capacidad del instrumento de registrar las distribuciones completas de estas partículas. Si las partículas tienen una masa mayor que el valor crítico en masa, se podrá obtener información cuantitativa sobre la distribución de masa del elemento por partícula y la concentración en número de las partículas. De lo contrario, solo se podrá obtener información parcial, restringiéndose a las partículas que superen el valor crítico en masa.

Siguiendo el procedimiento descrito en el Apartado 1.3.3.2 del Capítulo 1.3 para evaluar la validez de la información, en primer lugar, se mide un blanco instrumental para obtener la intensidad promedio de la línea base del blanco; y a continuación, se miden las muestras diluidas a niveles del blanco, con el fin de obtener el mejor valor crítico en masa. Una vez que se ha determinado el valor crítico, si el extremo inferior de la distribución de masa del elemento por partícula es mayor que el valor crítico, la suspensión puede diluirse para hacer una segunda medida de confirmación; mientras que, si está cerca del valor crítico, los valores críticos en masa no podrían mejorarse por dilución, y, por tanto, no se podría realizar ninguna acción adicional.

En el caso de las muestras de bacterias *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* JM109 incubadas previamente con Ag(I), las distribuciones de masa de plata por bacteria se recogen en la Figura 2.9. En el caso de las bacterias *E. coli* ATCC 25922 incubadas con Ag(I) (Figura 2.9.a), se observó una distribución de masa de plata mayor que en el control de bacterias, en el rango de 10 - 1000 ag de plata. En estas condiciones de medida, el valor crítico en masa, X_C^{masa}, calculado a partir de la ecuación (24) del Apartado 1.1.3.2.1 (Capítulo 1.1), fue de 11 ag, el cual coincidía con el extremo inferior de la distribución de masa de plata por bacteria obtenida. Debido a que el nivel de la línea base en la suspensión medida era cercano a la línea base del blanco, los resultados no pudieron confirmarse, indicando que, probablemente, parte de la

distribución original podría estar sesgada y la información se debería tratar de manera semicuantitativa.

Respecto a las bacterias *E. coli* JM109 incubadas con Ag(I) (Figura 2.9.b) se obtuvo una distribución de masa muy intensa en el rango de, aproximadamente, 10 - 600 ag de plata lo que indicaba que muchas bacterias habían interaccionado con la plata. De la misma forma que en el caso de las bacterias *E. coli* ATCC, el valor crítico en masa fue 11 ag, coincidiendo con el extremo inferior de la distribución obtenida, por lo que la información obtenida debía ser tratada como semicuantitativa, debido a que el nivel de la línea base en la suspensión medida era cercano a la línea base del blanco.

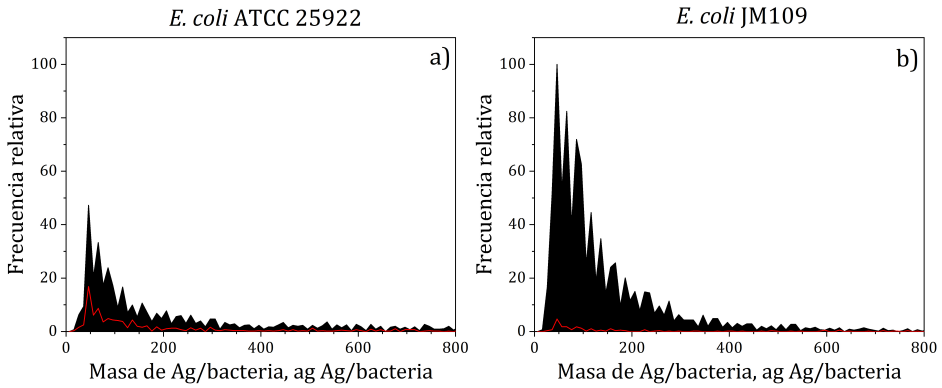


***Figura 2.9**. Distribuciones de masa de plata para las muestras de bacterias a)* E. coli *ATCC 25922 y b)* E. coli *JM109. Bacterias control (rojo) e incubadas con Ag(I) (negro). Medio de cultivo: BHI.*

Al comparar las distintas distribuciones obtenidas en ambas cepas, se observó que SC-ICP-MS permite detectar los distintos comportamientos entre las distintas cepas de bacterias. Respecto a las diferencias de intensidad de las distribuciones de masa de las bacterias incubadas con Ag(I) en ambas cepas, éstas podrían justificarse debido a que la cepa bacteriana *E. coli* JM109 es una cepa preparada en el laboratorio para permitir la introducción de vectores de ADN y transformarla eficazmente, por lo que se podría favorecer la introducción de la plata en las bacterias. Debido a que las propiedades modificadas de esta cepa podrían afectar a los mecanismos habituales de interacción de la plata con las bacterias, en los estudios posteriores se dejó de usar la cepa *E. coli* JM109. Por el contrario, la cepa *E. coli* ATCC 25922 es una

cepa de referencia certificada usada para el control de calidad en microbiología y, por tanto, es la que se va a utilizar a lo largo de la Tesis Doctoral.

En el caso de las muestras de bacterias *E. coli* ATCC 25922 incubadas previamente con Ag(I) o nanopartículas de plata de 10 nm estabilizadas con citrato, las distribuciones de masa de plata por bacteria se recogen en la Figura 2.10. En el caso de las bacterias incubadas con Ag(I) se obtuvo una distribución de masa más ancha que en el caso de las incubadas con nanopartículas de plata. En el primer caso, el rango de la distribución era aproximadamente, 5 - 350 ag de plata, mientras que, en el segundo, el rango iba de 5 - 100 ag, lo que indicaba que las bacterias interaccionaban en mayor proporción con la plata iónica que con las nanopartículas. En estas condiciones de medida, el valor crítico en masa X_C^{masa} fue de 3,4 ag de plata para ambas muestras. En estas suspensiones medidas, la intensidad de la línea base era cercana al nivel del blanco, por lo que se diluyeron 1:2 para reducir la línea base al nivel del blanco, y con esto, el valor crítico en masa se redujo hasta 2,9 ag de plata.

En la Tabla 2.4 se recogen los resultados de concentración en número de las dos diluciones seriadas. Al comparar estos datos se obtuvieron recuperaciones cuantitativas entre ambas diluciones en la muestra de bacterias incubadas con Ag(I) y con nanopartículas de plata (93 ± 4 % y 92 ± 2 %, respectivamente). Esto confirma que las distribuciones de masa de plata por bacteria obtenidas en la Figura 2.10 serían completas y la información obtenida se consideraría cuantitativa.

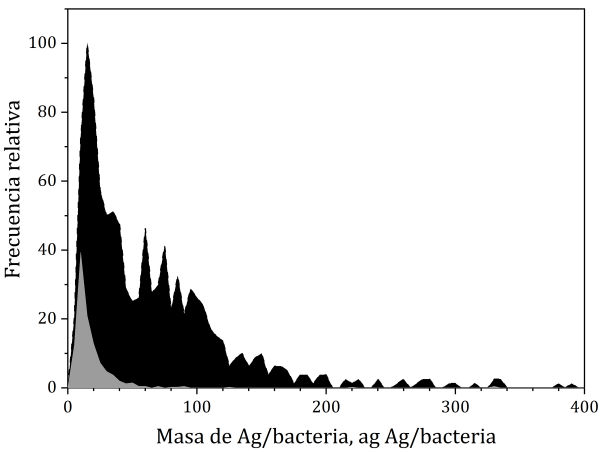


***Figura 2.10**. Distribuciones de masa de plata para las muestras de bacterias* E. coli *ATCC 25922 incubadas con Ag(I) (negro) y con AgNPs de 10 nm (gris). Medio de cultivo: MH + 2% Tween 80.*

Tabla 2.4. *Masa promedio y concentración en número de biopartículas, valores críticos de masa (X_C^{masa}) para las muestras de bacterias* E. coli *ATCC 25922 analizadas. Tiempo de lectura: 100 µs. Tiempo de adquisición: 60s. Media ± desviación estándar (n=5).*

Muestra	Dilución	Intensidad promedio de la línea base cuentas	X_C^{masa} ag	Masa promedio ag	Rango de masas ag	Número de eventos	Concentración en número L^{-1}
Bacterias + Ag(I)	1:100	0,027 ± 0,002	3,4	66,6 ± 2,4	5 - 350	839 ± 7	(1,56 ± 0,04)x10^{13}
	1:200	0,016 ± 0,002	2,9	67,7 ± 4,4	4 - 350	368 ± 16	(1,51 ± 0,07)x10^{13}
Bacterias + AgNPs 10 nm	1:100	0,029 ± 0,002	3,4	18,6 ± 3,0	5 - 100	384 ± 32	(1,58 ± 0,10)x10^{12}
	1:200	0,018 ± 0,001	2,9	16,5 ± 1,1	4 - 100	175 ± 8	(1,45 ± 0,04) x10^{12}

Tras evaluar la validez de la información obtenida mediante SC-ICP-MS de las muestras de bacterias incubadas previamente con plata (I) y nanopartículas de plata, se ha demostrado que dependiendo de las características de la población de partículas/bacterias en la muestra y de otros factores como el medio de cultivo, la información obtenida puede considerarse cuantitativa o semicuantitativa. En el caso de las muestras en las que la información ha sido considerada semicuantitativa, la técnica de SC-ICP-MS ha permitido detectar y confirmar la presencia de biopartículas que contienen plata con masas mayores de 11 ag de plata.

Adicionalmente, mediante SC-ICP-MS se puede determinar la concentración de plata total captada por las bacterias durante el proceso de incubación. En la Tabla 2.5 se muestran las cantidades de plata total determinadas mediante SC-ICP-MS para las muestras de bacterias *E. coli* ATCC 25922 incubadas previamente con Ag(I) o nanopartículas de plata de 10 nm. Estos resultados se compararon con los obtenidos mediante ICP-MS tras un ataque ácido de las mismas muestras. Los resultados obtenidos permiten corroborar la validez de la información obtenida mediante SC-ICP-MS. Las desviaciones estándar relativas obtenidas fueron relativamente elevadas (> 10%) debido a la heterogeneidad de las muestras, ya que la cantidad de plata que capta cada bacteria presenta una elevada variabilidad.

Tabla 2.5. *Concentración de plata tras el análisis directo mediante SC-ICP-MS y tras el ataque ácido de las muestras de bacterias* E. coli *ATCC 25922 incubadas con plata. Media ± desviación estándar (n=5).*

Muestras	Concentración de plata µg L^{-1}	
	Análisis directo SC-ICP-MS	Digestión ácida ICP-MS
Control bacterias *E. coli* ATCC	9,4 ± 0,2	11,3 ± 0,4
Bacterias + Ag(I)	921,7 ± 51,7	898,2 ± 31,7
Bacterias + AgNPs-citrato 10nm	30,8 ± 3,5	30,1 ± 2,3

El límite de cuantificación obtenido del análisis directo de SC-ICP-MS (calculado como 10 veces la desviación estándar del blanco) fue 0,2 ng L^{-1}. Teniendo en cuenta la dilución de las muestras, los límites de cuantificación obtenidos referidos a las suspensiones fueron 20 ng L^{-1}. El límite de cuantificación obtenido de la digestión ácida (calculado como 10 veces la desviación estándar del blanco) fue 2,6 ng L^{-1}. Teniendo en cuenta la dilución de las muestras, los límites de cuantificación obtenidos referidos a las suspensiones fueron 260 ng L^{-1}.

La precisión del método permite evaluar los errores aleatorios. La precisión instrumental del análisis directo de SC-ICP-MS se evaluó como la desviación estándar relativa obtenida al medir 5 veces el estándar de nanopartículas de plata de 50 nm estabilizadas con PEG y se obtuvo un valor del 3,8%.

Aplicando un test t con un nivel de confianza del 95% se puede afirmar que el procedimiento de análisis directo mediante SC-ICP-MS da similares resultados a los obtenidos mediante un ataque ácido de las muestras biológicas. No se encontraron diferencias significativas entre ambos métodos, excepto en los controles de bacterias, lo que indicaba que la información obtenida de estas muestras mediante SC-ICP-MS se pudo considerar cuantitativa.

2.3.3. Selección de elementos endógenos en bacterias como marcadores en SC-ICP-MS

Como se ha comentado en secciones anteriores, SC-ICP-MS no es capaz de diferenciar la naturaleza de los eventos detectados en los barridos, por lo que no se puede determinar directamente si los eventos corresponden a la asociación de bacterias con nanopartículas o a la presencia de nanopartículas suspendidas en la

muestra. La detección simultánea de elementos endógenos y exógenos, en este caso, la plata, podría ayudar a resolver estas limitaciones de la técnica. Por tanto, con el objetivo de identificar y confirmar la naturaleza de los eventos de partículas detectados en los barridos de tiempo de SC-ICP-MS, se llevó a cabo un estudio preliminar de identificación de elementos presentes en bacterias que puedan ser utilizados como marcadores de las propias biopartículas en medidas de SC-ICP-MS. En cualquier caso, la aplicación de estas estrategias implica el uso de instrumentos de ICP-MS que permitan la medida simultánea de varios isótopos, como sucede con los ICP-TOF-MS. Alternativamente podrían aplicarse a instrumentos de cuadrupolo, utilizando frecuencias de adquisición suficientemente altas como para poder medir al menos dos isótopos a lo largo de la duración de un evento de biopartículas. Esta última posibilidad no está todavía disponible en los actuales instrumentos comerciales.

2.3.3.1. Identificación de elementos endógenos en bacterias

Se llevó a cabo un análisis semicuantitativo con el objetivo de identificar los elementos endógenos más abundantes presentes en bacterias. Las muestras estudiadas fueron bacterias *E. coli* ATCC 25922 incubadas previamente con Ag(I) o nanopartículas de plata de 10 nm. Además de estas muestras y los correspondientes controles, se analizaron los sobrenadantes resultantes del proceso de fijación.

Los resultados de los análisis semicuantitativos de las muestras de bacterias *E. coli* ATCC 25922 incubadas con Ag(I) y nanopartículas de plata de 10 nm y las bacterias control (Tabla 2.6) mostraron que los elementos endógenos más abundantes fueron el sodio, magnesio, fósforo, potasio, hierro, cobre y zinc en las tres muestras, además de la plata en el caso de las bacterias incubadas previamente con este elemento. Estos resultados son concordantes con los obtenidos en otros estudios en los que se determinó la variación y distribución de elementos endógenos en bacterias, células o algas mediante SC-ICP-MS o TOF-ICP-MS [178,180,181,187,195,197,219–221]. Los elementos endógenos como el Mn, Mg, Fe, Co, Cu, Zn, K, P o S son constituyentes esenciales en células que están involucrados en funciones catalíticas, estructurales y reguladoras. Concretamente, Mn, Fe, Co, Cu y Zn actúan como cofactores o reguladores en numerosas proteínas que están sujetas a una regulación compleja en los sistemas celulares. El fósforo y el azufre son los principales elementos de todas las células que desempeñan funciones en la producción de energía celular, en la actividad metabólica, en los aminoácidos y la composición de las proteínas [178,195]. Por otro lado, elementos como Fe, P, Si, Mg o Zn se identifican como elementos de huella dactilar en algas [219,222]. En estudios

previos con bacterias, el elemento endógeno elegido para monitorizar metales en bacterias individuales ha sido el Mg, debido a ser el catión divalente más abundante en células vivas [197].

En el presente estudio, la presencia de altas concentraciones de sodio, magnesio, fósforo y potasio en las muestras podría deberse principalmente al proceso de fijación en el que se usan disoluciones de PBS, mientras que la presencia de hierro, cobre y zinc podría asociarse inequívocamente a su presencia endógena en las bacterias. Estos resultados son concordantes con los obtenidos de los sobrenadantes resultantes del proceso de fijación, donde se obtuvieron concentraciones más altas de sodio, magnesio, fósforo y potasio, mientras que el hierro, cobre y zinc se presentaban en concentraciones muy bajas, en comparación con las muestras de bacterias. Esto confirmaba que las disoluciones de la fijación contribuían a la presencia de los primeros elementos en las muestras, pudiendo sesgar la identificación de las biopartículas.

Tabla 2.6. *Contenido de los elementos más abundantes obtenidos tras el análisis semicuantitativo mediante ICP-MS de las muestras de bacterias* E. coli *ATCC 25922 y sobrenadantes resultantes del proceso de fijación.*

Muestra	**Concentración**							
	^{23}Na	**^{24}Mg**	**^{31}P**	**^{39}K**	**^{56}Fe**	**^{65}Cu**	**^{66}Zn**	**^{107}Ag**
	mg L^{-1}	**µg L^{-1}**	**mg L^{-1}**	**mg L^{-1}**	**µg L^{-1}**	**µg L^{-1}**	**µg L^{-1}**	**µg L^{-1}**
Control bacterias	327,6	608,8	48,6	2,4	423,1	59,9	367,2	0,6
Bacterias + Ag(I)	195,6	773,6	51,1	1,5	485,8	83,9	462,4	884,5
Bacterias + AgNPs	162,4	415,0	38,6	1,2	400,8	18,8	323,5	31,3
Sobrenadante control bacterias	5625,0	3267,3	219,1	83,2	92,5	13,5	45,3	0,2
Sobrenadante bacterias + Ag(I)	5260,4	3054,4	203,7	78,5	58,4	10,5	34,7	86,7
Sobrenadante bacterias + AgNPs	5675,0	2963,7	215,6	77,1	100,1	3,6	34,0	8,1
LOQ	2,7	3,6	1,9	0,5	44,6	2,0	8,8	0,1

Aunque en la bibliografía los elementos endógenos analizados más frecuentemente sean el magnesio o el potasio, su utilización en este estudio se descartó por el uso de PBS durante la fijación, el cual produjo un aumento en las

concentraciones de estos elementos. Por otro lado, debido a que uno de los elementos con mayor concentración presente en las muestras fue el zinc, se eligió este elemento como marcador de bacterias para los estudios posteriores.

2.3.3.2. Detección de zinc en bacterias por SC-ICP-MS

Una vez seleccionado el zinc como elemento endógeno marcador de bacterias, se optimizaron los parámetros instrumentales para su detección en SC-ICP-MS. El equipo y el sistema de introducción utilizado fue el ICP Agilent 8900 y el sistema de introducción de muestra de células individuales de alto rendimiento. Esta optimización se recoge en el Anexo A2.1.

Se aplicó el método optimizado para la detección de Zn a muestras de bacterias incubadas previamente con plata mediante SC-ICP-MS. En la Figura 2.11 se muestran los barridos de tiempo para las muestras estudiadas. Se aplicaron los valores críticos discutidos en el Capítulo 1.1 relacionados con la discriminación de los eventos de línea base de los de partículas y la determinación del valor crítico para la detección de partículas $Y_{C,N}$ (ecuación (30) del Apartado 1.1.3.2.2). En los barridos de tiempo se muestra una línea horizontal roja correspondiente con el valor crítico determinado utilizando el criterio 5σ para la diferenciación de la señal de fondo de los eventos de bacterias que contienen Zn, siendo Y_C igual a 10 cuentas. En las tres muestras de bacterias se obtuvo un número de eventos mayor que el valor crítico para la detección de partículas ($Y_{C,N}$ = 50 eventos), calculado a partir de un blanco de agua ultrapura. Esto confirmó la presencia de biopartículas que contenían zinc, en este caso, correspondientes a bacterias.

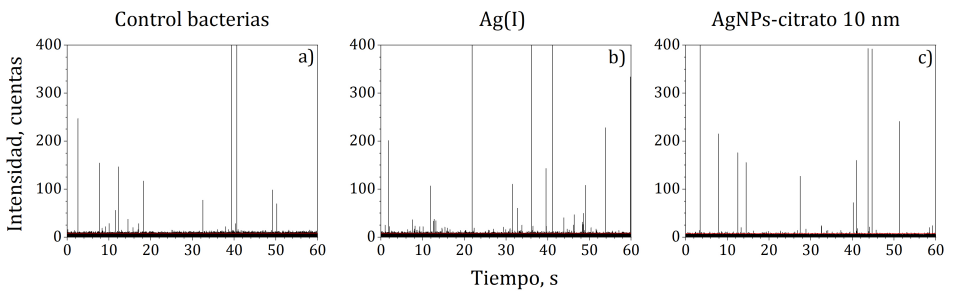


***Figura 2.11**. Barridos de tiempo para las muestras* E. coli *ATCC 25922: a) Control de bacterias, b) Bacterias expuestas a Ag(I), c) Bacterias expuestas a AgNPs de 10 nm. Isótopo monitorizado: ^{66}Zn.*

La Figura 2.12 muestra la distribución de masa de zinc obtenida para el control de bacterias *E. coli* ATCC 25922. Las distribuciones de las muestras de bacterias incubadas con plata fueron similares a la del control, ya que como se observó en los análisis semicuantitativos (Tabla 2.6), la concentración de zinc era similar en las tres muestras de bacterias. Las distribuciones de masa de zinc tenían valores entre 15 - 100 ag de zinc.

Siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 1.3 (Apartado 1.3.3.2) para evaluar la validez de la información obtenida mediante SP-ICP-MS, se midió en primer lugar un blanco instrumental de agua ultrapura para obtener la intensidad promedio de la línea base del blanco y, a continuación, las muestras diluidas con el fin de obtener el mejor valor crítico en masa. En estas condiciones de medida, el valor crítico en masa, X_C^{masa}, calculado a partir de la ecuación (24) del Apartado 1.1.3.2.1 (Capítulo 1.1), se situaba en torno a 15 ag, el cual coincidía con el extremo inferior de la distribución de masa de zinc por bacteria. En el caso de la determinación de zinc, la intensidad de la línea base era más alta que en el caso de la plata y, por tanto, el valor crítico en masa aumentó. Debido a que el nivel de la línea base en las suspensiones medidas era cercano a la línea base del blanco, los valores críticos en masa no pudieron mejorarse por dilución, y, por tanto, no se pudo realizar ninguna acción adicional. Por lo tanto, estos resultados indicaron que parte de la distribución original podría no haber sido medida y la información se debería tratar de manera semicuantitativa.

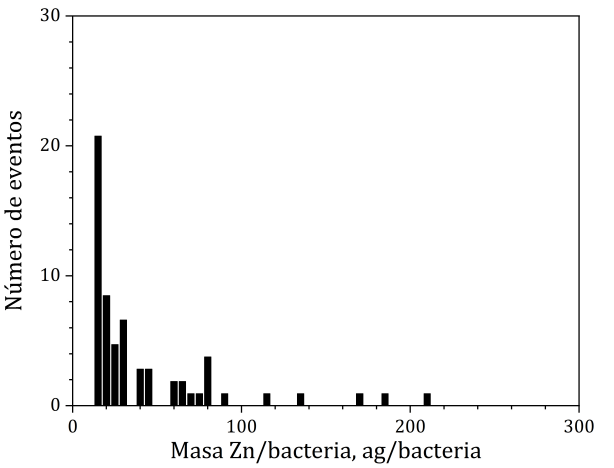


***Figura 2.12**. Distribución de masa de zinc para el control de bacterias* E. coli *ATCC 25922. Isótopo monitorizado: ^{66}Zn.*

Como se ha comentado en secciones previas, las células suelen ser mucho más grandes que las nanopartículas, sin embargo, en lo relativo a sensibilidad, los elementos endógenos no son componentes principales de la estructura. Por esta razón, el número de átomos de dicho analito presentes en cada célula es el parámetro clave que determinará si el evento detectado es correspondiente a una célula o a la línea base [81]. La dificultad de detección de biopartículas con zinc en las muestras de bacterias podría justificarse debido a la menor sensibilidad del método, al aumento de la intensidad de la línea base debida al fondo o a la baja masa de zinc que contienen las bacterias individuales, lo que conduce a un aumento significativo de los límites de detección. Por tanto, esto conlleva a que la información obtenida de la determinación de zinc en bacterias solamente se pueda considerar semicuantitativa. Aunque en la bibliografía se ha utilizado el zinc como marcador en análisis de células, algas o levaduras mediante SC-ICP-MS o TOF-ICP-MS [178,180,186,187,195,197], en este estudio con bacterias, la utilización del zinc endógeno como marcador no puede considerarse como una opción viable, ya que no es posible detectar la distribución completa de bacterias. Tsang *et al.* monitorizaron magnesio como marcador en el análisis de bacterias *Helicobacter pylori* [197]; sin embargo, en este estudio se descartó el uso de ese elemento debido a su alta concentración en los reactivos utilizados en la fijación de las muestras.

Por otro lado, von der Au *et al.* [222] demostraron que la identificación de eventos de células a partir de la señal de fondo basada en un solo elemento conllevaba a una tasa de falsos positivos de 30 - 80 %. Esto se debía a la elevada señal de fondo de ciertos elementos, los cuales podrían formar parte del medio de cultivo o de los reactivos o materiales utilizados durante los experimentos. Para reducir estos errores de identificación de eventos, se deben usar simultáneamente varios elementos endógenos (Fe, P, Si, Mg, Zn) como indicadores biológicos mediante análisis multielementales como SC-ICP-TOF-MS. Así, si se detecta un evento en el que se observan simultáneamente dos elementos endógenos puede concluirse que se trata de una biopartícula (células, algas o bacterias), mientras que, si en un evento solamente se detecta un elemento endógeno, la señal podría clasificarse como un evento aleatorio no correspondiente con dichas biopartículas [222]. En relación con estos análisis multielementales mediante SC-ICP-TOF-MS y a pesar de que los instrumentos ICP-TOF-MS tienen una sensibilidad de uno o dos órdenes de magnitud menor que los instrumentos de ICP-MS de cuadrupolo [180], otros autores han demostrado correlaciones entre varios elementos endógenos medidos simultáneamente en muestras de hongos y células, ya que en el mismo evento de partícula se detectaban ambos elementos, lo que confirmaba la presencia de

biopartículas. Estas correlaciones se han encontrado entre fósforo y zinc [180,223], fósforo y magnesio [180], y magnesio y zinc [180].

2.4. CONCLUSIONES

Se han estudiado dos sistemas de introducción de muestra con el fin de determinar y comparar las condiciones óptimas de trabajo de cada uno de ellos en SC-ICP-MS. Un sistema estaba formado por una cámara de nebulización de flujo lineal Asperon™ equipada con un micronebulizador concéntrico de alta eficiencia; y el segundo sistema, por una cámara de nebulización de flujo lineal Glass Expansion y un micronebulizador concéntrico de vidrio. En ambos sistemas la máxima intensidad se ha obtenido para un flujo total de gases de 1,2 - 1,3 L min^{-1} para las combinaciones estudiadas de flujo de gas de nebulización + flujo de gas *make-up*; a la vez que, el valor de la intensidad de los eventos se mantenía constante para un flujo total de gases fijo. Respecto al rendimiento de nebulización se observaron comportamientos diferentes. Las condiciones de introducción de muestra elegidas para ambos sistemas fueron la combinación de 0,3 L min^{-1} del gas de nebulización y 0,9 L min^{-1} del gas de *make-up*, manteniendo así, un flujo total de gases de 1,2 L min^{-1}. Estos sistemas de introducción se han aplicado al análisis de bacterias que fueron incubadas previamente con plata (Ag(I) y distintas nanopartículas de plata). Tras aplicar distintos criterios de detectabilidad, la técnica de SC-ICP-MS ha permitido detectar y confirmar la presencia de biopartículas que contenían plata, demostrando que los sistemas de introducción permiten introducir eficazmente las muestras de bacterias en el ICP-MS. Adicionalmente, se ha evaluado la validez de la información obtenida mediante SC-ICP-MS mediante la aplicación de una estrategia análoga a la aplicada en SP-ICP-MS.

Con el objetivo de identificar los eventos correspondientes a biopartículas en SC-ICP-MS, se ha llevado a cabo un estudio para seleccionar posibles elementos endógenos como marcadores de bacterias. En este caso, y tras un análisis semicuantitativo, se ha elegido el zinc como marcador debido a su mayor concentración en las muestras Tras la optimización y aplicación de un método para la detección de zinc en muestras de bacterias a través de SC-ICP-MS, la información obtenida solamente ha podido ser considerada semicuantitativa, debido a las propias características de las muestras y a la sensibilidad del instrumento utilizado. Por este motivo, se ha concluido que el zinc no es un elemento adecuado para ser utilizado como marcador endógeno en este tipo de bacterias, a pesar de su amplia utilización en la bibliografía como marcador de células, levaduras o algas.

3. PLATAFORMA ANALÍTICA BASADA EN ICP-MS PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO BACTERICIDA DE LAS ESPECIES DE PLATA Y ANTIBIÓTICOS

3.1. EFECTO BACTERICIDA DE LAS ESPECIES DE PLATA

3.1.1. INTRODUCCIÓN

La plata ha sido utilizada por la humanidad desde hace unos 7000 años. Su uso en monedas y cubertería se debe a la resistencia a la corrosión del metal noble, pero también a sus propiedades antibacterianas. Debido a estas propiedades, los persas utilizaban contenedores de plata para el transporte del agua y griegos, romanos y egipcios la usaban para la conservación del agua y de los alimentos [224]. También ha sido utilizada desde hace mucho tiempo para dolores de estómago o para la cicatrización de heridas [225,226]. En la primera mitad del siglo XX, hasta la introducción de los antibióticos, la plata metálica fue muy utilizada en forma de suspensión coloidal para prevenir infecciones; aunque en algunos casos, una exposición prolongada producía argiria, una enfermedad que se caracteriza por el cambio de color permanente a azul-grisáceo de la piel y algunos órganos y tejidos debido a la acumulación de plata metálica [224]. También se recogen casos de desórdenes gastrointestinales, espasmos y hasta la muerte, relacionados con la absorción de grandes cantidades de plata [224]. En el siglo XX, el nitrato de plata era comúnmente empleado en la terapia de infecciones oculares y en la prevención de conjuntivitis en niños recién nacidos (profilaxis de Credé). Sin embargo, el uso de grandes cantidades de nitrato de plata podía producir daños en la córnea [227]. En la actualidad, la plata es usada en sistemas de tratamiento de aguas, como en los circuitos de agua caliente de hospitales, piscinas o sistemas de suministro de agua potable; así como en otras aplicaciones médicas como odontología, catéteres y tratamiento de quemaduras [228–230]. Asimismo, los iones plata se han propuesto como un eficaz antimicrobiano alternativo a los antibióticos debido a su baja citotoxicidad [231,232]. Recientemente, una serie de iniciativas destinadas a combatir las bacterias multirresistentes han optado por estrategias que combinan plata con antibióticos para potenciar la eficacia de fármacos [233]. Las nanopartículas de plata se presentan como potentes agentes antimicrobianos para combatir la resistencia a los antibióticos, debido al cambio en sus propiedades fisicoquímicas y a su elevada relación superficie-volumen, las cuales producen un aumento de la reactividad. De esta forma, los efectos antibacterianos de la plata pueden aumentarse mediante la manipulación del tamaño de las partículas de plata metálica a nivel nano. Las nanopartículas de plata son efectivas frente a un amplio espectro de bacterias, incluyendo bacterias resistentes [234]; actúan rápidamente como fungicida frente a hongos comunes como *Aspergillu*s, *Candida* y *Saccharomyces* [235] y como antivirales. Además, las nanopartículas de plata también se usan en otros productos de consumo como tiritas, cepillos de dientes, cosméticos, textiles,

aditivos alimentarios, recipientes de alimentos; así como en aplicaciones médicas como batas, catéteres venosos y urinarios, bisturíes, agujas… [38,82]. Las nanopartículas de plata pueden sintetizarse por métodos sencillos, económicos y respetuosos con el medioambiente, tanto por métodos químicos como por biosíntesis [59]. Sin embargo, a pesar de su amplio uso, los mecanismos de la actividad bactericida de la plata todavía no se conocen completamente.

Las propiedades bactericidas de la plata (I) y de las nanopartículas de plata metálica están fuertemente influenciadas por la estructura y composición de la pared celular de las bacterias [28]. Las bacterias han desarrollado una compleja pared celular cuya función esencial es servir de barrera, la cual presenta una permeabilidad selectiva, protegiendo a las bacterias de agentes nocivos, como detergentes, fármacos, toxinas y enzimas degradativas y dejando penetrar los nutrientes para mantener el crecimiento bacteriano. Esta pared se sitúa por fuera de la membrana citoplasmática y está compuesta principalmente por una proteína llamada peptidoglucano. El esqueleto del peptidoglucano está constituido por largas cadenas de glúcidos, formadas por la repetición de moléculas de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. A su vez, el ácido murámico fija cadenas de tetrapéptidos que se unen entre sí y forman una malla [236,237].

En las bacterias Gram-positivas, el peptidoglucano está formando varias capas, existiendo entrecruzamiento entre cadenas adyacentes y entre cadenas de otras capas. El resultado es una red tridimensional gruesa compacta denominada pared celular (20 - 80 nm), inmersa en una matriz formada principalmente por ácidos teicoicos [238–240]. Por el contrario, la pared celular de las bacterias Gram-negativas es más compleja. Poseen una membrana externa asimétrica formada por una doble capa que contiene fosfolípidos, lipopolisacáridos y lipoproteínas, que limita la difusión a moléculas pequeñas y dota a la bacteria de carga externa negativa. A continuación de esta membrana se halla el espacio periplásmico, en el que se encuentra inmerso el peptidoglucano formando una única capa (2 - 4 nm) con grandes poros en ella. Finalmente, seguida del espacio periplásmico se halla la membrana citoplasmática [239,240]. La mayoría de los iones plata y nanopartículas de plata muestran una actividad bactericida menor frente a bacterias Gram-positivas que frente a bacterias Gram-negativas, probablemente debido a la capa de peptidoglucano más gruesa [235,241–243]. Además, en el caso de las bacterias Gram-negativas, la carga negativa de los lipopolisacáridos favorece la captura y adsorción de los iones plata y de aquellas nanopartículas con carga positiva [244]. En la Figura 3.1.1 se observa la composición de la pared celular en función del tipo de bacterias.

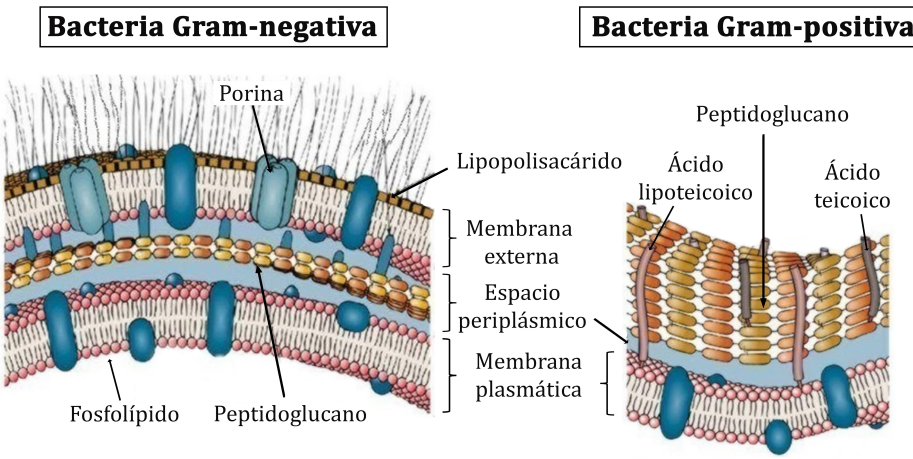


Figura 3.1.1. *Pared celular de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (adaptado de la referencia* [245]*).*

Los mecanismos de acción asociados a la actividad bactericida de la plata (I) (Figura 3.1.2), los cuales se han estudiado ampliamente a lo largo de los años, son [38,228,231,238,246–249]:

- Alteración de la pared y membrana celular

La interacción de la plata (I) y las bacterias comienza con la adhesión de los iones a la pared celular y a la membrana debido a la atracción electrostática entre la superficie de las bacterias y la carga positiva de los iones plata. Esta interacción de carga puede generar un cambio en el potencial zeta de la superficie celular y provocar un incremento de la permeabilidad de la membrana, así como su despolarización, una disminución del potencial respiratorio y la contracción del citoplasma. Esta alteración de la membrana puede conllevar un daño celular irreversible, y con ello, la muerte celular. Además, la plata (I) reacciona fácilmente con los grupos sulfhidrilo (grupos tiol) de la membrana celular bacteriana mediante el intercambio del átomo terminal de hidrógeno, generando un enlace estable S-Ag y bloqueando la cadena respiratoria, la transferencia de electrones, la secreción de proteínas y la biosíntesis de lípidos. Otro mecanismo que afecta a estos procesos biológicos es la interacción de la plata con la ubiquinona o coenzima Q presente en las membranas, causando el desacoplamiento del transporte iónico de sodio y potasio y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Estos cambios en las propiedades estructurales de la pared celular se han demostrado mediante técnicas de microscopía. Jung *et al*. observaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) que el citoplasma de bacterias *E. coli*

y *Staphylococcus aureus* se contraía y se separaba de la pared celular tras exponer a las bacterias con nitrato de plata [241]. Morones *et al*. observaron una desestabilización y un aumento de permeabilidad de la membrana celular, lo que resultó en un aumento de generación de ROS; así como cambios estructurales y morfológicos en la pared celular de bacterias *E. coli* [231].

- Alteración del ADN y de proteínas intracelulares

Los iones plata son capaces de unirse fuertemente y formar complejos con los grupos tiol del ADN bacteriano provocando la desnaturalización del ADN y la pérdida total de la transcripción del ARN mensajero y la replicación del ADN, al interaccionar con las bases del ADN, especialmente con la guanina y adenina. Mediante un análisis microscópico, se observaron regiones densas de electrones debido al ADN condensado en el centro de las células, lo que apoya la hipótesis de que la plata puede modificar o inhibir la replicación del ADN [250].

Otra diana de las especies de plata son los ribosomas de las bacterias, lo que produce la alteración de la síntesis de proteínas, por ejemplo, para la producción de adenosín trifosfato (ATP), que provoca la inanición celular, y con ello, la muerte celular. Los iones plata también reaccionan con los grupos sulfhidrilo de las proteínas, en concreto aquellas que contienen el *cluster* Fe-S, produciendo un enlace S-Ag. En bacterias *E. coli* tratadas con plata se observaron gránulos densos citosólicos formados por agregados de proteínas mal plegadas [231].

- Estrés oxidativo causado por la generación de ROS

El mecanismo más aceptado para la toxicidad de las especies de plata es el de la generación de ROS y radicales libres (H_2O_2, $^{\cdot}O_2$, •OH y HClO) que producen un incremento en los niveles de estrés oxidativo. Estas especies de estado de oxidación intermedio se generan por la reducción incompleta de las moléculas de oxígeno. Las ROS generadas por las especies de plata pueden interaccionar con las proteínas de membrana y oxidar los ácidos grasos insaturados, interfiriendo en la estabilidad de la membrana y causando su ruptura; así como causar disfunción de la cadena de transporte de electrones y la fuerza motriz de los protones debido a la inactivación de las enzimas unidas a la membrana. El daño a la cadena de transporte de electrones tiene un último impacto en la síntesis del ATP, afectando así a funciones celulares vitales.

Durante el funcionamiento normal de las bacterias, los niveles de ROS están muy controlados y el exceso es eliminado por el sistema de defensa antioxidante intracelular. Sin embargo, cuando se altera el balance entre la producción de ROS y las defensas antioxidantes, la concentración de ROS aumenta y causa daños severos

en los componentes celulares como el ADN, proteínas y otras biomoléculas. Los daños en ADN incluyen deleciones, inserciones, mutaciones puntuales, roturas de una hebra o de dos hebras, fragmentación y formación de aductos. Además, los iones plata también podrían alterar los *clusters* intracelulares Fe-S, causando la liberación intracelular del Fe^{2+} en el citoplasma, los cuales aumentan la formación de radicales •OH como producto de la reacción de Fenton.

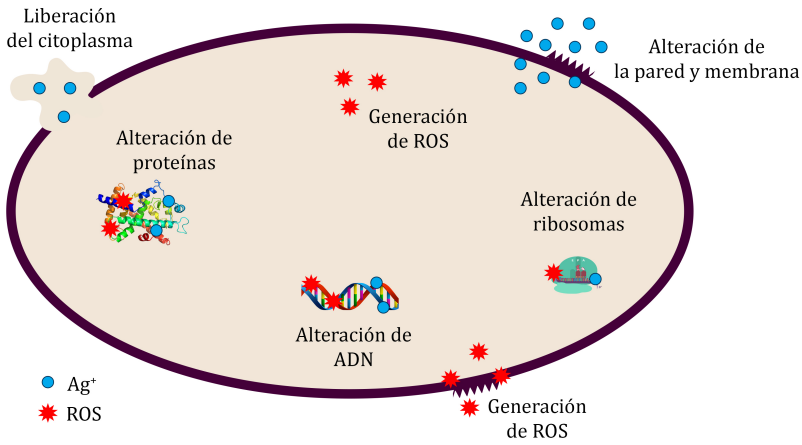


Figura 3.1.2. *Esquema de los mecanismos de acción antibacteriana de la plata (I).*

Por otra parte, las nanopartículas de plata también han sido ampliamente investigadas debido a su gran potencial para eliminar bacterias. La mayoría de estos estudios solamente evalúan la toxicidad de las nanopartículas de plata frente a distintas cepas bacterianas mediante ensayos de difusión o métodos de dilución [251]; y las posibles alteraciones de la membrana, la formación de poros o la acumulación de nanopartículas de plata en el interior de la bacteria mediante estudios de microscopía electrónica de transmisión y de barrido [252–257]. Sin embargo, solamente unas decenas de estudios se han centrado en sacar conclusiones sobre la contribución que los iones plata liberados a partir de las nanopartículas [238] y las propias partículas juegan en el mecanismo de la actividad antimicrobiana. Los tres posibles mecanismos envueltos en la actividad bactericida de las nanopartículas de plata son [11,30,39,258–261]:

- Las nanopartículas de plata son un simple reservorio pasivo de iones plata y estos iones son los responsables de cualquier actividad bactericida.

- La actividad viene regida solamente por efectos de las partículas. A su vez, las nanopartículas siguen los mismos mecanismos de acción que los iones plata, ya que éstas se unen a la pared y membrana celular causando alteraciones y cambios en la permeabilidad, reaccionando con los grupos tiol y sulfuro y bloqueando la cadena respiratoria y la producción de energía. Además, las nanopartículas de plata son capaces de alterar el ADN y con ello su replicación, por la unión con las bases del ADN; así como de alterar las proteínas, los ribosomas y las enzimas, inhibiendo la síntesis de proteínas y otros procesos biológicos esenciales. Asimismo, las ROS generadas por las nanopartículas de plata incrementan el estrés oxidativo y a su vez, reaccionan con las biomoléculas afectando a las funciones celulares vitales.

- La combinación de ambos mecanismos que pueda llevar asociada la aparición de efectos sinérgicos entre los iones liberados y la acción de las nanopartículas, por ejemplo, la existencia de vías de transporte pasivo únicas en la célula bacteriana (porinas de la membrana externa o alteración de la permeabilidad de la membrana) accesibles a partículas de tamaño muy pequeño que facilitan la entrada de iones de plata. Este fenómeno se conoce como mecanismo de caballo de Troya.

Los efectos bactericidas de las nanopartículas de plata se han demostrado en numerosos estudios. Stabryla *et al*. indicaron que de los estudios que evalúan estos mecanismos, el 39% de ellos concluyen que la actividad bactericida sólo depende del mecanismo de los iones; el 16% solamente depende del mecanismo de las partículas; y el 45% de la combinación de ambos mecanismos [258]. Algunos de los estudios corroboran que las nanopartículas se adsorben en la pared bacteriana; mientras que otros han demostrado, mediante TEM y microscopía de fuerza atómica (AFM), anormalidades estructurales, la formación de poros en la membrana o la desestabilización de la membrana [262]. Por otro lado, Vishnupriya *et al*. demostraron que el ADN bacteriano se degradaba tras exponer nanopartículas de plata a bacterias *E. coli* debido a la interacción de las nanopartículas con proteínas y el ADN [263]. Por otra parte, Soo-Hwuan *et al*. demostraron que las nanopartículas de plata generaban ROS que, a su vez, producían roturas de proteínas debido al aumento de permeabilidad de la membrana, y la inactivación de la enzima lactato deshidrogenasa, la cual permite la obtención de energía en bacterias *E. coli* y *Staphylococcus aureus* [243].

Las propiedades bactericidas de las nanopartículas de plata están fuertemente influenciadas por sus propiedades fisicoquímicas como el tamaño, la forma, la

superficie química, la composición química, la concentración o el recubrimiento [28,235,247]. El cambio en la reactividad y las propiedades de las nanopartículas se atribuye al tamaño pequeño de las nanopartículas, lo cual proporciona una mayor relación área superficial-volumen y, por tanto, influye en las propiedades bactericidas. Las nanopartículas más pequeñas tienen una mayor área superficial, lo que permite una mayor interacción con la superficie de las bacterias y, por tanto, favorece la acción bactericida. Esta dependencia del tamaño con la actividad bactericida ha sido demostrada en distintos estudios [54,264–269]. Además, el tamaño y el área superficial también afectan a la liberación de iones plata. En nanopartículas pequeñas, con un área superficial mayor, se observó una mayor concentración de iones plata liberados, lo que resultó en propiedades bactericidas mayores [270,271]. En relación con los mecanismos envueltos en la actividad bactericida de las nanopartículas, algunos autores han propuesto que en aquellas nanopartículas con tamaños igual o menores de 10 nm domina la contribución de las partículas o la combinada ion-partícula. En este rango de tamaños, la contribución de las partículas podría deberse a un mayor contacto con las bacterias, lo que favorece la entrada de las partículas al interior de la bacteria, ya sea a través de porinas en la pared celular o por la alteración de la permeabilidad de la membrana [264]. Las porinas de las bacterias tienen tamaños entre 30 - 50 kDa, lo que corresponde a 1 - 3 nm, por lo que solamente partículas muy pequeñas serían capaces de entrar por esta vía. El mecanismo ion-partícula para estos tamaños de partículas podría deberse a una mayor disolución localizada en la interfase nanopartícula-célula, o una disolución intracelular a través del mecanismo de tipo caballo de Troya [258]. Por el contrario, en nanopartículas mayores de 10 nm, la contribución predominante es la de los iones como consecuencia de la liberación de iones de la superficie de las nanopartículas, siendo la contribución de las partículas despreciable [258,272–274].

A su vez, las propiedades bactericidas también están influenciadas por la forma de las nanopartículas [58,264,267,275,276]. Pal *et al*. demostraron que nanopartículas de plata triangulares tenían un mayor efecto bactericida frente a bacterias *E. coli*, en comparación con nanopartículas esféricas y en forma de varilla [277]. El recubrimiento y la carga superficial también son factores cruciales. Kujda *et al*. sugirieron que el tratamiento de reducción con ácido gálico o tánico facilitaría la adsorción de las nanopartículas de plata a la superficie de las bacterias [278]. Abbaszadegan *et al*. demostraron que las nanopartículas de plata cargadas positivamente tenían un mayor efecto bactericida que las nanopartículas neutras o cargadas negativamente [267]. Asimismo, nanopartículas sin recubrir (potencial zeta: -22 mV) y estabilizadas con PVP (potencial zeta: -10 mV) presentaron mayores

efectos bactericidas que nanopartículas estabilizadas con citrato (potencial zeta: -37 mV), debido a la disminución de las fuerzas de repulsión entre las bacterias y las nanopartículas, ambas cargadas negativamente [279]. Por otro lado, el grado de oxidación superficial de las nanopartículas y la liberación de iones desde su superficie también está influenciado por las condiciones del cultivo (pH, fuerza iónica, presencia de materia orgánica…), la concentración de oxígeno disuelto, el tiempo de incubación o la composición del medio de cultivo [280,281]. Sotiriou *et al*. sugirieron que la liberación de iones plata desde la superficie de la nanopartícula en suspensiones acuosas corresponde a la disolución de una o dos monocapas de Ag_2O de su superficie, dependiendo del tamaño de las nanopartículas [280]. Por otro lado, Molleman *et al*. sugirieron que la liberación de iones plata se produce como resultado de la presencia de una capa protectora de óxido de plata que impide cinéticamente la oxidación completa de las nanopartículas [281].

Respecto a la influencia que tiene las condiciones del medio de cultivo en el comportamiento de las nanopartículas, se ha demostrado que las nanopartículas tienden a agregarse en soluciones con alto contenido en electrolitos, lo que reduce la capacidad antimicrobiana de las nanopartículas [282]. Los iones divalentes como el Ca^{2+} y Mg^{2+} pueden causar la agregación/aglomeración de nanopartículas de plata estabilizadas con citrato [283]. Sin embargo, esta agregación puede inhibirse en presencia de albúmina [284]. Millour *et al*. también demostraron estos comportamientos en presencia de sales como NaCl, $CaCl_2$ o $MgCl_2$, y en presencia de materia orgánica como triptona y extracto de levadura [285]. Asimismo, otros estudios han demostrado que la presencia de surfactantes puede prevenir la agregación de las nanopartículas, concluyendo que los surfactantes no iónicos son los más efectivos [286–288]. Además, la actividad bactericida de las nanopartículas de plata frente a *E. coli* no se modificó en presencia de surfactantes como el SDS o Tween 80 en agua, mientras que la presencia de PVP redujo estas propiedades [289].

Respecto a los mecanismos de acción envueltos en la actividad bactericida de los antimicrobianos es necesario seguir investigando, ya que como se ha comentado anteriormente, todavía no se conocen con exactitud. Para ello, además de las técnicas microscópicas como SEM, TEM o AFM, las cuales permiten observar las alteraciones de la pared y membrana celular, los cambios estructurales, la formación de poros o incluso, la liberación de los componentes citoplasmáticos [59,254–256,290], es necesario conocer la biodistribución y las distintas especies que están involucradas en dicha actividad bactericida. Las técnicas microscópicas permiten obtener información acerca de la biodistribución de las partículas, pudiéndose determinar la posible adsorción de las nanopartículas en la pared bacteriana, en las membranas o acumuladas en el citoplasma [177,291]. Sin embargo, estas técnicas se ven limitadas

a la hora de obtener información cuantitativa respecto a las interacciones celulares con las nanopartículas. Long *et al*. determinaron la distribución de la plata en bacterias *E. coli* incubadas con nanopartículas de plata, tras producir la lisis de las bacterias mediante un procedimiento de sonicación intermitente en hielo y su posterior cuantificación mediante ICP-MS [292].

Los análisis basados en la detección de células individuales como la citometría de masas o SC-ICP-MS, permiten cuantificar las cantidades de analito asociadas a las bacterias [81,168,177,293,294]. Estas técnicas se han utilizado principalmente en estudios con células (epiteliales, de carcinoma de pulmón humano, de mama, de leucemia o de HeLa), así como con algas y hongos. El objetivo de estos estudios es la determinación de metales endógenos como hierro, magnesio o zinc, así como la detección y cuantificación de la absorción de metales como el oro o la plata [81]. Por el contrario, existe un número muy limitado de estudios con bacterias. En el caso de la citometría de masas, Guo *et al*. desarrollaron un método para detectar y cuantificar plata en bacterias individuales, así como para discriminar bacterias vivas y muertas, y estudiar la relación entre la cantidad de plata absorbida por las bacterias y el estado de dichas bacterias [293]. Gomez-Gomez *et al*. cuantificaron mediante SC-ICP-MS la acumulación de nanopartículas de teluro de 125 nm tras su exposición con bacterias *E. coli* y *Staphylococcus aureus*, y observaron daño en la superficie celular mediante TEM. Asimismo, observaron la interacción de las nanopartículas con la superficie de las bacterias, aunque no pudieron determinar si las nanopartículas se encontraban adsorbidas en la superficie o en el interior de las bacterias [177]. Una limitación de las técnicas de detección de células individuales es que no permiten la diferenciación entre formas disueltas y particuladas de un elemento. En este sentido, el uso de otras técnicas complementarias, como SP-ICP-MS o cromatografía hidrodinámica acoplada a ICP-MS, junto con distintos tratamientos previos, permitirían determinar las especies de plata involucradas en la actividad bactericida de dichos antimicrobianos, lo que ayudaría a explicar los mecanismos de acción bactericida.

El objetivo principal de este capítulo se centra en el desarrollo y aplicación de una plataforma analítica que permita la detección y cuantificación directa de especies de plata en cultivos de bacterias *E. coli* previamente incubados con plata (I) y nanopartículas de plata. Este objetivo principal pretende aportar la información química necesaria para contribuir a dilucidar los posibles mecanismos de acción de estos antimicrobianos y se apoya en los siguientes objetivos específicos:

- Optimización de la composición de los medios de cultivo mediante el uso de surfactantes con el fin de prevenir la agregación de las nanopartículas durante el proceso de incubación.

- Determinación de las especies de plata presentes en los medios de cultivo durante el proceso de incubación de los antimicrobianos de plata.

- Evaluación de la actividad bactericida de la plata (I) y de las nanopartículas de plata sobre cepas de *E. coli*.

- Determinación de la plata total (adsorbida o internalizada) en bacterias incubadas con plata (I) y con nanopartículas de plata, así como su distribución por bacteria.

- Determinación de las especies de plata presentes en las bacterias incubadas con plata (I) y con nanopartículas de plata.

- Relación de las especies de plata detectadas en medios de cultivo y bacterias con los posibles mecanismos de acción de las nanopartículas de plata.

3.1.2. EXPERIMENTAL

3.1.2.1. Instrumentación

Para la determinación de los contenidos totales de plata en las muestras se empleó un espectrómetro de masas con plasma de acoplamiento inductivo como fuente de ionización (ICP-MS) Perkin Elmer NexION 2000B (Perkin Elmer, Toronto, Canadá) equipado con una cámara de nebulización ciclónica y un nebulizador concéntrico de vidrio (Meinhard). La adquisición de datos se realizó utilizando un tiempo de estancia de 50 ms, con 20 barridos por réplica, y un total de 10 réplicas por medida. El isótopo monitorizado fue ^{107}Ag.

Este mismo equipo se empleó en modo de detección de partículas individuales (SP-ICP-MS) y de detección de células individuales (SC-ICP-MS). Se emplearon dos tipos de sistemas de introducción de muestra: una cámara de nebulización ciclónica con nebulizador concéntrico de vidrio (Meinhard) para la detección de partículas individuales (SP-ICP-MS), y una cámara de flujo lineal Asperon™ (Perkin Elmer) equipada con un micronebulizador concéntrico de vidrio de alta eficiencia (Meinhard) para la detección de células individuales (SC-ICP-MS). Los parámetros instrumentales y de adquisición de datos se muestran en la Tabla 3.1.1. Las suspensiones se midieron mediante SP-ICP-MS usando el *software* Syngistix™ Nano-Application versión 2.5 (Perkin Elmer Inc.) y mediante SC-ICP-MS usando Syngistix™ Single Cell-Application versión 2.5 (Perkin Elmer Inc.), y se procesaron aplicando un criterio 5σ. También se utilizaron hojas de cálculo Excel (Microsoft, Redmond, EE.UU.) y el *software* de análisis de datos OriginPro 2019b (OriginLab Corporation, Northampton, EE.UU.).

Tabla 3.1.1. *Parámetros instrumentales y de adquisición de datos para SP-ICP-MS y SC-ICP-MS en función de la cámara de nebulización.*

Parámetros instrumentales	Ciclónica	Lineal
Potencia RF	1600 W	1600 W
Flujo de gas argón		
Plasma	15 L min^{-1}	15 L min^{-1}
Auxiliar	1,2 L min^{-1}	1,2 L min^{-1}
Nebulizador	1,14 L min^{-1}	0,3 L min^{-1}
Make-up	-	0,9 L min^{-1}
Caudal de muestra	330 - 360 µL min^{-1}	12 - 15 µL min^{-1}
Parámetros de adquisición de datos		
Tiempo de lectura	100 µs	100 µs
Lecturas por réplica	600.000	600.000
Tiempo total de adquisición	60 s	60 s
Isótopos monitorizados	^{107}Ag, ^{197}Au	^{107}Ag, ^{197}Au

Para la caracterización del tamao de las nanopartículas de plata mediante dispersión de luz dinámica (DLS) se utilizó un detector DLS Zetasizer Nano ZS, ZEN3600 (Malvern, Worcestershire, Reino Unido) midiendo en un ángulo de detección de 173^0 con respecto a la dirección del haz incidente. Las muestras diluidas se introdujeron en cubetas de plástico. Para todas las medidas la temperatura se fijó a $25,0^0$C.

La separación de nanopartículas de plata y de plata disuelta se llevó a cabo mediante cromatografía hidrodinámica (HDC). Para ello se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alto rendimiento Waters 2796 Bioseparations Module (Waters Corporation, Milford, EE.UU.). La separación de las especies se llevó a cabo utilizando una columna PL-PSDA Tipo 1 (Agilent Technologies, Alemania) con un rango de separación nominal de 5 - 300 nm, una longitud de 80 cm y un diámetro interno de 7,5 mm. La salida de la columna se conectó a un detector UV-visible de diodos Waters 996 Photodiode Array Detector (Waters Corporation, Milford, EE.UU.) y a un espectrómetro ICP-MS Elan DRC-e (Perkin Elmer, Massachusetts, EE.UU.) colocado en línea y equipado con una cámara ciclónica con nebulizador concéntrico de vidrio *Slurry* (Glass Expansion, Melbourne, Australia). Para el procesamiento de los cromatogramas se usó OriginPro 2019b (OriginLab, Northampton, EE.UU.). Los parámetros instrumentales y de adquisición de datos se recogen en la Tabla 3.1.2.

Tabla 3.1.2. *Parámetros instrumentales y de adquisición de datos para HDC-ICP-MS.*

ICP-MS	
Potencia RF	1200 W
Flujo de gas argón	
Plasma	15 L min^{-1}
Auxiliar	1,2 L min^{-1}
Nebulizador	1,0 L min^{-1}
Tiempo de lectura	50 ms
Barridos por réplica	1
Isótopos monitorizados	^{107}Ag
HDC	
Columna	PL-PSDA Tipo 1
Caudal	1,6 mL min^{-1}
Volumen de inyección	50 µL

3.1.2.2. Estándares y reactivos

Las suspensiones de nanopartículas de plata utilizadas para preparar las muestras (Apartado 3.1.2.4) y para el estudio de optimización de las condiciones de los medios de cultivo (Apartado 3.1.3.1) se prepararon a partir de estándares comerciales de nanoComposix (nanoComposix, St. Diego, EE.UU.) estabilizadas con citrato y con un diámetro nominal de 10,3 ± 2,1 y 60 ± 7 nm.

Las disoluciones acuosas de oro y plata se prepararon a partir de disoluciones patrón de 1000 mg L^{-1} (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.).

Los rendimientos de nebulización se determinaron con un estándar de nanopartículas monodispersas de oro estabilizadas con polietilenglicol (PEG), procedente de nanoComposix y con un diámetro nominal de 47,8 ± 1,8 nm.

Además, se utilizó HNO_3 (69,0-70,0 %) (Baker Instra Analyzed for Trace Metals Analysis, J.T. Baker, Holanda), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (30% *v/v*) (Scharlau, Scharlab. S.L., Barcelona, España), hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) (Alfa Aesar - 25% *m/m* aq. soln., electronic grade, Karlsruhe, Alemania), cloruro de calcio ($CaCl_2$) (Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, Walthman, EE.UU.), L-cisteína (Aldrich, St. Louis, EE.UU.) y Triton™ X-100 (Aldrich, St. Louis, EE.UU.).

Las suspensiones de nanopartículas se prepararon por pesada en una balanza analítica GH-200 (A&D, California, EE.UU.) con una precisión de ± 0,1 mg a partir de alícuotas de las suspensiones concentradas, y tras 1 minuto de sonicación en un baño de ultrasonidos (Ultrasons, J.P. Selecta, Barcelona, España). Se evitaron mayores tiempos de sonicación para evitar un calentamiento excesivo de las suspensiones. El resto de las disoluciones se prepararon de la misma manera, sin sonicación previa.

Para los cultivos microbiológicos, se utilizaron disoluciones de suero fisiológico (SFE) (NaCl 0,9%) (Panreac, Barcelona, España), tampón fosfato salino (PBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.), infusión de cerebro y corazón (BHI) (Difco, Detroit, EE.UU.), caldo Mueller-Hinton (MH) (Scharlau, Scharlab S.L., Barcelona España), caldo Luria-Bertani (LB) (Labkem, Labbox.com), agar Mueller-Hinton y agar MacConkey (Bio-Rad, La Coquette, Francia). Las disoluciones de SFE y PBS y los medios de cultivo líquidos y en agar se esterilizaron en autoclave 437-P (J. P. Selecta, Barcelona, España) durante 20 minutos a 121^0C y 1 atmósfera. Los surfactantes utilizados fueron Tween 80, Triton X-100, dodecilsulfato sódico (SDS) y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.). Además, se utilizó un estándar comercial turbidimétrico McFarland como referencia para la concentración de las suspensiones de bacterias por comparación de la turbidez (Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, Walthman, EE.UU.).

3.1.2.3. Cepas bacterianas

Se emplearon dos tipos de cepas de bacterias *Escherichia coli* Gram-negativas: *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* K12 cepa J62 (F^-, pro, his, trp, lac, Nal^r). Las cepas se cultivaron en agar Mueller-Hinton a 37^0C durante 24 h y se guardaron a -80^0C en leche desnatada estéril.

3.1.2.4. Muestras de cultivos bacterianos con plata

Las muestras objeto de estudio consistieron en bacterias de distintas cepas *E. coli* (*E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* J62) sometidas a dos tipos de ensayo: cultivo con plata (I) y cultivo con nanopartículas de plata de distintos tamaños, a distintas dosis en ambos casos. El medio de cultivo empleado fue MH con 2% Tween 80.

Las concentraciones de Ag(I) y de las nanopartículas añadidas a los cultivos bacterianos se eligieron en función de la concentración inhibitoria mínima y la concentración bactericida mínima que se determinaron experimentalmente (Apartado 3.1.3.2). Estas concentraciones fueron concentraciones menores de la CIM

y CBM con el fin de que las bacterias internalizasen o adsorbieran los antimicrobianos sin que estas cantidades produjeran la muerte de las mismas.

Los ensayos desarrollados con ambas cepas de bacterias se corresponden con:

- Bacterias *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* J62 incubadas con 0,5 mg L^{-1} de Ag(I).

- Bacterias *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* J62 incubadas con 0,5 mg L^{-1} de nanopartículas de plata de 60 nm estabilizadas con citrato.

- Bacterias *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* J62 incubadas con 4 y 2 mg L^{-1} de nanopartículas de plata de 10 nm estabilizadas con citrato, respectivamente.

Asimismo, se contó con cultivos bacterianos como control, en los que no se añadió plata en ninguna de sus formas, y un control del medio de incubación.

A modo de aclaración, en la Tabla 3.1.3 se recogen las concentraciones de Ag(I) y de nanopartículas añadidas en cada uno de los cultivos bacterianos.

Tabla 3.1.3. *Concentraciones de plata (I) y de las distintas nanopartículas añadidas en los cultivos bacterianos.*

Cepa *E. coli*	**Ag(I) mg L^{-1}**	**Nanopartículas de plata mg L^{-1}**	
		Citrato 10 nm	**Citrato 60 nm**
ATCC 25922	0,5	4	0,5
J62	0,5	2	0,5

3.1.2.5. Procedimientos

3.1.2.5.1. Preparación de las muestras

Las cepas de bacterias *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* J62 se sembraron en placas Petri con agar MH y se incubaron durante 24 horas a 37^0C. Con un asa de platino, previamente flameado, se cogieron varias colonias procedentes de estos cultivos, y se suspendieron en 25 mL de medio MH + 2% Tween 80. A continuación, las bacterias fueron expuestas a las concentraciones señaladas anteriormente de Ag(I) y nanopartículas de plata durante 24 horas a 37^0C con agitación de 100 rpm. Los controles de bacterias (sin exposición a antimicrobianos) y los controles de medio se trataron de la misma manera.

Tras el tiempo de exposición, las suspensiones de bacterias se centrifugaron a 5300 rpm durante 15 minutos (centrífuga Digicen 20). El sobrenadante de cada muestra se eliminó y el residuo, el cual contenía las bacterias, se lavó tres veces con PBS en las mismas condiciones. Tras el último lavado, el residuo resultante se resuspendió en 5 mL de PBS. Las muestras se guardaron a 4^0C hasta su uso.

Para estimar la concentración de bacterias de las muestras, se midió la densidad óptica de las suspensiones mediante un espectrofotómetro de absorción molecular ultravioleta-visible (UV-2004 Lan Optics) a una longitud de onda de 600 nm. Para ello, fue necesario preparar una recta de calibrado para cada una de las cepas de bacterias en medio PBS. Para la preparación del inóculo de bacterias se cogieron, con un asa de platino previamente flameado, varias colonias procedentes de un cultivo sembrado el día anterior en placas Petri con agar MH y se suspendieron en 5 mL de PBS. La turbidez de este inóculo se preparó por comparación con el estándar 0,5 de la escala McFarland, un estándar turbidimétrico que corresponde a $1{,}5x10^8$ UFC mL^{-1}. A partir de este inóculo, se prepararon disoluciones seriadas 1/10. Se midió la densidad óptica de estas suspensiones. Para conocer la concentración de bacterias asociada a cada absorbancia, las suspensiones se sembraron en placas Petri con agar MH, se incubaron durante 24 horas a 37^0C, y tras la incubación, se llevó a cabo el recuento manual de las unidades formadores de colonias (UFC) que habían crecido por el método de siembra en superficie.

3.1.2.5.2. Preparación de los medios de cultivo

Los medios de cultivo líquidos BHI, MH y LB se prepararon por pesada en una balanza analítica GH-200 (A&D, California, EE.UU.) con una precisión de ± 0,1 mg y se disolvieron en agua ultrapura hasta una concentración de 37, 21 y 25 g L^{-1}, respectivamente. En las situaciones señaladas a lo largo del estudio, a estos medios de cultivo se les añadieron diferentes surfactantes (Tween 80, Triton X-100, SDS y CTAB) a varias concentraciones (0 - 0,1 - 0,5 - 1 - 1,5 - 2%). Los medios de cultivo y las combinaciones medio de cultivo/surfactante se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 121^0C y 1 atmósfera. Se guardaron a 4^0C hasta su uso.

Las placas Petri con agar MH y agar MacConkey se prepararon añadiendo el medio de cultivo correspondiente en estado líquido y estéril directamente sobre las placas. Posteriormente, se dejaron solidificar en una campana extractora Bio-II A/G (Telstar, Barcelona, España). Tanto el agar MH como el MacConkey son medios de cultivo utilizados para bacterias *E. coli*. En este capítulo, el medio MacConkey se utilizó en los ensayos de viabilidad; y el medio MH para los cultivos de bacterias a

partir de los cuales se partía para preparar los inóculos, así como en la determinación de la CBM.

3.1.2.5.3. Ensayos cualitativos de viabilidad

El inóculo de las bacterias se preparó suspendiendo bacterias en SFE hasta una turbidez del 0,5 de la escala McFarland. Una alícuota de 10 µL del inóculo se añadió a 90 µL del medio de cultivo en una placa microtituladora de 96 pocillos (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) y se incubó durante 24 horas a 37^0C. Tras este período, 10 µL de cada combinación de medio de cultivo/surfactante se sembraron en una placa Petri con agar MacConkey durante 24 horas a 37^0C.

Para aquellas combinaciones de medio de cultivo/surfactante en las que se observaron diferencias en el crecimiento en relación con el medio de cultivo sin surfactantes, se preparó una dilución 1:1000 y 10 µL de cada combinación fueron sembrados en una placa Petri con agar MacConkey con un asa de Digralsky. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37^0C. Tras este tiempo, se llevó a cabo el recuento manual de las unidades formadores de colonias que habían crecido por el método de siembra en superficie. Los recuentos se consideraron el número de bacterias supervivientes. Los análisis se realizaron por triplicado.

3.1.2.5.4. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando SPSS 26,0 (SPSS Corp., Armonk, NY USA). Las variables se describieron como media, desviación estándar y coeficiente de variación (CV= desviación estándar/media). La prueba de Shapiro-Wilk se usó para verificar que las distribuciones eran normales. El análisis de la varianza (ANOVA) de un factor se utilizó para la comparación entre los métodos de detección usados para cada medio de cultivo; si las distribuciones no eran homocedásticas, se llevó a cabo la corrección de Welch. Las comparaciones por pares se realizaron con la corrección de Sidak si las distribuciones eran homocedásticas (test de Levene, $p>0,05$) y la de Games-Howel si las distribuciones no eran homocedásticas. Finalmente, la prueba t de Student se utilizó para comprobar si había diferencias significativas entre los dos mejores resultados obtenidos. El nivel de significación requerido en todos los análisis realizados fue >0,05.

3.1.2.5.5. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y de la concentración bactericida mínima (CBM)

La determinación de la CIM y de la CBM se llevó a cabo mediante el método de dilución, siguiendo la metodología del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) y de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [33,35,36]. Para la determinación de la CIM, se prepararon diluciones seriadas a la mitad a partir de una dilución madre de Ag(I) y de las nanopartículas de plata en medio MH + 2% Tween 80. En una placa microtituladora de 96 pocillos, se añadieron 80 µL de la dilución de antimicrobiano correspondiente en cada pocillo. Se preparó el inóculo de bacterias con una turbidez correspondiente al estándar 0,5 de la escala McFarland. Para ello, se cogieron con un asa de platino, previamente flameado, varias colonias procedentes de un cultivo sembrado el día anterior en placas Petri con agar MH, y se suspendieron en un tubo que contenía 5 mL de SFE. En cada pocillo, se añadieron 20 µL de esta suspensión de bacterias. Además, se realizó un control positivo, que contenía la suspensión de bacterias en el medio sin antimicrobiano; y un control negativo del medio y el antimicrobiano. Finalmente, la placa se incubó durante 24 horas a 37^0C. Tras la incubación, se procedió a la lectura de los resultados de la CIM observando visualmente la turbidez de los pocillos. La CIM es aquella concentración correspondiente con la ausencia de turbidez en los pocillos.

El rango de concentraciones de antimicrobianos estudiadas frente a *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* J62 en la determinación de la CIM fueron:

- Ag(I): 1 - 256 mg L^{-1}
- Nanopartículas de plata de 10 y 60 nm estabilizadas con citrato: 0,0625 - 16 mg L^{-1}

Para la determinación de la CBM, se sembraron en placas Petri con agar MH las suspensiones preparadas para la determinación de la CIM. De aquellos pocillos en los que se observó turbidez, se plaquearon 10 µL; mientras que de aquellos en los que no se observó turbidez, se plaquearon 100 µL. Se incubaron las placas durante 24 horas a 37^0C. Tras la incubación, se procedió a la lectura de los resultados de la CBM observando el crecimiento cualitativo bacteriano en las placas. Los ensayos se realizaron por triplicado. La CBM es aquella concentración correspondiente con la ausencia de crecimiento bacteriano en las placas.

3.1.2.5.6. Caracterización de las nanopartículas de plata en los medios de cultivo mediante dispersión de luz dinámica (DLS)

La suspensión comercial de nanopartículas de plata de 60 nm estabilizadas con citrato se diluyó en los diferentes medios de cultivo estériles o en agua ultrapura (18 MΩ cm de resistividad), obtenida a partir de un equipo de purificación Milli-Q (Millipore Co., Bedford, EE. UU.), para obtener una concentración final de 2 mg L^{-1}. Las suspensiones diluidas se sonicaron durante 1 minuto en un baño de ultrasonidos (Ultrasons, J.P. Selecta, Barcelona, España) y a continuación, las suspensiones se midieron mediante DLS. Los análisis se realizaron por triplicado.

3.1.2.5.7. Digestión ácida

Se llevó a cabo una digestión ácida para la determinación del contenido total de plata presente en las muestras de cultivos bacterianos con plata (Apartado 3.1.2.4). Para ello, se centrifugaron 100 µL de cada muestra a 10.000 g durante 20 minutos para eliminar el medio de PBS (centrífuga refrigerada Heraeus Multifuge X1R equipada con un rotor de ángulo fijo para tubos Eppendorf). El residuo se resuspendió en 500 µL de HNO_3 (69 - 70 % *m/v*) y 100 µL de H_2O_2 (30% *v/v*). Las suspensiones se agitaron en un vórtex durante 1 minuto y posteriormente, se dejaron digerir durante 24 horas con una agitación orbital de 124 rpm. Transcurrido este tiempo, las muestras se diluyeron hasta 10 mL con una disolución de HNO_3 1% (*v/v*) y se midieron mediante ICP-MS. Se prepararon 5 réplicas de cada una de las muestras a analizar. Los controles de bacterias y de medios de incubación se sometieron al mismo proceso.

3.1.2.5.8. Digestión alcalina con TMAH

Se llevó a cabo una serie de experimentos para optimizar el procedimiento de digestión alcalina con TMAH. Por una parte, se empleó una mezcla de $CaCl_2$ y TMAH, mientras que por otra el TMAH estaba en presencia de cisteína y Triton X-100.

En el caso de la digestión con TMAH, cisteína y Triton X-100, se añadieron 200 µL de cisteína (0,5% *m/m*) y 1 mL de TMAH (25% *m/m*) en un Eppendorf que contenía 100 µL de nanopartículas de plata de 60 nm estabilizadas con citrato (0,5 mg L^{-1}) o 50 µL de Ag(I) (1 mg L^{-1}). Las suspensiones se agitaron en un vórtex durante 1 minuto y posteriormente, se dejaron digerir en agitación durante 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las muestras se diluyeron hasta 10 mL con una disolución de cisteína 0,1% (*m/m*) y Triton X-100 0,5% (*m/m*), y se

midieron mediante ICP-MS. El medio final en el que se encontraban las muestras era TMAH 2,5%, cisteína 0,1% y Triton X-100 0,5%.

Este mismo procedimiento se repitió para las mismas muestras de nanopartículas de plata y Ag(I), pero añadiendo 400 µL de $CaCl_2$ 25 mM y 1,6 mL de TMAH (25% *m/m*). Las muestras digeridas se diluyeron hasta 10 mL con agua ultrapura y el medio final en el que se encontraban las muestras era TMAH 4% y $CaCl_2$ 1mM.

Para la digestión alcalina de las muestras de cultivos bacterianos con plata (Apartado 3.1.2.4) con TMAH y $CaCl_2$, 100 µL de cada muestra se centrifugaron a 10.000 g durante 20 minutos para eliminar el medio de PBS (centrífuga refrigerada Heraeus Multifuge X1R equipada con un rotor de ángulo fijo para tubos Eppendorf). El residuo se resuspendió en 400 µL de $CaCl_2$ 25 mM y 1,6 mL de TMAH (25% *m/m*). Las suspensiones se agitaron en un vórtex durante 1 minuto y posteriormente, se dejaron digerir durante 24 horas a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad. Transcurrido este tiempo, las muestras se diluyeron hasta 10 mL con agua ultrapura. El medio final en el que se encontraban las muestras era TMAH 4% y $CaCl_2$ 1mM. Se prepararon 5 réplicas de cada una de las muestras a analizar. Los controles de bacterias y de medios de incubación se sometieron al mismo proceso.

3.1.2.5.9. Detección de partículas individuales mediante ICP-MS

La determinación de las especies de plata tras someter a las nanopartículas a un proceso de incubación (Apartado 3.1.3.2) se llevó a cabo mediante la técnica de SP-ICP-MS. Las nanopartículas de plata de 10 y 60 nm estabilizadas con citrato se incubaron en medio MH + 2% Tween 80 durante 24 horas a 37^0C y con una agitación orbital de 130 rpm en una cámara incubadora (OPAQ I10-OE, Ovan). Las concentraciones de las nanopartículas incubadas de 10 y 60 nm fueron 2 y 0,5 mg L^{-1}, respectivamente, en función de las concentraciones añadidas en las muestras del Apartado 3.1.2.4. Antes del análisis, las suspensiones se diluyeron con agua ultrapura para alcanzar una concentración aproximada de $2x10^8$ partículas L^{-1}.

Las muestras digeridas con TMAH y $CaCl_2$ del Apartado 3.1.2.5.8 se midieron mediante SP-ICP-MS (Apartado 3.1.3.5.2). Antes del análisis, las muestras se diluyeron con agua ultrapura para alcanzar una concentración aproximada de $2x10^8$ partículas L^{-1}.

El rendimiento de nebulización se calculó de acuerdo con los métodos desarrollados por Pace *et al*. [88], usando los estándares de nanopartículas de oro de

50 nm descritos anteriormente, diluidos en agua o en los medios de digestión, en función de los ensayos. En el estudio de la estabilidad de las nanopartículas de plata y la determinación de las especies de plata tras el proceso de incubación en el medio óptimo el rendimiento de nebulización (método del tamaño) fue 5,90 ± 0,03 % (n = 3); mientras que en el análisis de las muestras digeridas con TMAH y $CaCl_2$ fue 5,72 ± 0,02 %, (n = 6). Los caudales de muestra se midieron gravimétricamente por triplicado.

3.1.2.5.10. Separación y detección de nanopartículas de plata y plata disuelta mediante HDC-ICP-MS

La determinación de las especies de plata tras someter a las nanopartículas de plata y Ag(I) a un proceso de incubación (Apartado 3.1.3.2) se llevó a cabo mediante HDC-ICP-MS. La plata (I) y las nanopartículas de plata de 10 y 60 nm estabilizadas con citrato se incubaron en medio MH + 2% Tween 80 durante 24 horas a 37^0C y con una agitación orbital de 130 rpm en una cámara incubadora (OPAQ I10-OE, Ovan). La concentración de Ag(I) fue 0,5 mg L^{-1} y las de las nanopartículas incubadas de 10 y 60 nm recubiertas de citrato fueron 2 y 0,5 mg L^{-1}, respectivamente. Antes del análisis, las suspensiones se diluyeron con agua ultrapura hasta 100 µg L^{-1}.

Las muestras digeridas con TMAH y $CaCl_2$ del Apartado 3.1.2.5.8 se midieron mediante HDC-ICP-MS para determinar la forma química de la plata internalizada o adsorbida en las bacterias (Apartado 3.1.3.5.3). Antes del análisis, las muestras se diluyeron con agua ultrapura hasta 100 µg L^{-1}.

Se inyectaron directamente volúmenes de 50 µL de cada una de las suspensiones anteriores en la columna del cromatógrafo. La composición de la fase móvil era 0,45 mM de SDS y 1mM de penicilamina, la cual fue optimizada en otros estudios llevados a cabo por el grupo de investigación [295]. La fase móvil se filtró previamente a través de un filtro de 0,22 µm (Millipore, Billerica, EE.UU.) y se desgasificó mediante un desgasificador a vacío colocado en línea.

3.1.2.5.11. Detección, caracterización y cuantificación de plata en bacterias mediante SC-ICP-MS

Las muestras de cultivos bacterianos con plata (Apartado 3.1.2.4) se midieron mediante la técnica de SC-ICP-MS para detectar, caracterizar y cuantificar la plata presente en las bacterias (Apartado 3.1.3.5.1). Para ello, se centrifugaron 100 µL de cada muestra a 10.000 g durante 20 minutos para eliminar el medio de PBS. El

residuo resultante, que contenía las bacterias, se resuspendió en 2 mL de agua ultrapura. Antes del análisis, las suspensiones se volvieron a diluir con agua ultrapura para alcanzar una concentración aproximada de $4x10^8$ partículas L^{-1}. Los controles de bacterias y de medios de incubación se sometieron al mismo proceso.

El rendimiento de nebulización se calculó de acuerdo con los métodos desarrollados por Pace *et al*. [88], usando los estándares de nanopartículas de oro de 50 nm descritos anteriormente. Se obtuvieron resultados similares para el método de la frecuencia y el método del tamaño (60,4 ± 0,3 % y 57,6 ± 0,6 %, respectivamente, n = 6). Los caudales de muestra se midieron gravimétricamente por triplicado.

3.1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.3.1. Optimización de la composición de los medios de cultivo

La actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata, como se ha comentado anteriormente, está influenciada por su tamaño y otras propiedades específicas como la forma, la carga superficial o el recubrimiento [235]. Además, las nanopartículas de plata en contacto con los medios biológicos pueden sufrir procesos de agregación o de disolución [296], afectando a su vez al tamaño de las partículas, y con ello, a su actividad bactericida. El tamaño de la nanopartícula es un factor determinante en los procesos de interacción entre nanopartículas y bacterias. La posible agregación/aglomeración de las nanopartículas al añadirlas al medio de incubación puede dificultar su internalización en las bacterias. Con el fin de conocer cómo afectaba el medio de incubación a la integridad de las partículas se midieron mediante DLS nanopartículas de plata de 60 nm recubiertas de citrato suspendidas en medio BHI y en agua ultrapura como control.

La técnica de DLS permite estimar el diámetro hidrodinámico promedio, así como la distribución de tamaños de las partículas presentes en una suspensión a partir de la luz dispersada por las mismas. El diámetro hidrodinámico está relacionado con la difusión de la partícula, por lo que el diámetro que se obtiene mediante DLS es el equivalente a una esfera con el mismo coeficiente de difusión que la partícula real. Este diámetro difiere de los tamaños calculados a partir de la masa por partícula medida, como en el caso de SP-ICP-MS, o del obtenido mediante TEM [2], especialmente cuando las partículas están suspendidas en medios de cultivo complejos ya que, en presencia de materia orgánica, el diámetro hidrodinámico aumenta debido a la formación de coronas proteicas [297]. El diámetro hidrodinámico obtenido para las nanopartículas suspendidas en agua fue 68,5 ± 3,2

nm, lo que concordaba con el diámetro hidrodinámico certificado por el proveedor que era 64 nm. Por el contrario, las nanopartículas suspendidas en medio BHI presentaron un diámetro de 104,2 ± 10,8 nm, lo que indicó que las nanopartículas en contacto con el medio de incubación podrían sufrir procesos de agregación/aglomeración, lo cual podría afectar a la internalización de las nanopartículas en las bacterias. A la vista de estos resultados se realizaron algunas modificaciones en la composición de los medios de cultivo, con el objetivo de seleccionar un medio de cultivo óptimo que permitiera que las nanopartículas de plata mantuvieran su tamaño original durante su incubación con bacterias.

3.1.3.1.1. Influencia de la composición del medio de cultivo en el tamaño de las nanopartículas: uso de surfactantes

Los surfactantes son sustancias ampliamente estudiadas por su capacidad de estabilizar a las nanopartículas en medios acuosos [286–289]. Cada molécula de surfactante tiene una cola hidrofóbica y una cabeza hidrofílica, la cual contiene carga eléctrica positiva (surfactantes catiónicos), carga negativa (surfactantes aniónicos) o carga neutral (surfactantes no iónicos). Generalmente, la adsorción de los surfactantes en la superficie de la nanopartícula influye en las interacciones electrostáticas y estéricas entre las nanopartículas [298]. Según la teoría DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek) que describe la interacción de las fuerzas que existen entre superficies cargadas a través de un medio líquido, la energía total de interacción entre las partículas cargadas es una suma de los efectos de atracción de Van der Waals y la repulsión electrostática debido a la presencia de una doble capa eléctrica [299,300]. Mientras que la fuerza atractiva de Van der Waals es significativa a una distancia muy pequeña, el efecto de la fuerza de repulsión de la doble capa eléctrica es generalmente más fuerte y en un rango más amplio [301]. La agregación se previene cuando la fuerza de repulsión entre las partículas es dominante frente a la fuerza de atracción de Van der Waals [288].

En este estudio se seleccionaron surfactantes no iónicos (Triton X-100 y Tween 80), aniónicos (SDS) y catiónicos (CTAB). Por otro lado, se utilizaron los medios de cultivo más habituales para el crecimiento de enterobacterias: Mueller-Hinton (MH) [44,54,302], Luria-Bertani (LB) [231,267,275,303] y BHI [304–306]. Por tanto, se realizó un diseño experimental que incluía los cuatro surfactantes, a seis concentraciones (0 - 2 %) en los tres medios de cultivo, evaluándose la capacidad de cada uno de ellos para prevenir la agregación de nanopartículas de plata de 60 nm (citrato) mediante DLS.

Para obtener el tamaño hidrodinámico de las nanopartículas mediante DLS es necesario determinar, previamente, la densidad y la viscosidad de los diferentes medios de cultivo. En el Anexo A3.1 se describe cómo se determinaron estos parámetros. La Tabla A3.1.1 muestra los valores experimentales de densidad, viscosidad cinemática y viscosidad dinámica obtenidos para cada uno de los medios de cultivo. En la Tabla 3.1.4 se recogen los tamaños hidrodinámicos medidos para las nanopartículas de plata suspendidas en los tres medios de cultivo con los distintos tipos y concentraciones de surfactantes. Las mismas nanopartículas de plata suspendidas en agua ultrapura fueron usadas como muestra control. El tamaño hidrodinámico de las nanopartículas de plata de 60 nm recubiertas de citrato diluidas en agua ultrapura fue 68,5 ± 3,2 nm, lo que concordaba con el tamaño hidrodinámico certificado por el proveedor que era 64 nm.

Tabla 3.1.4. *Diámetros hidrodinámicos medios de AgNPs de 60 nm en distintos medios de cultivo con diferentes surfactantes a distintas concentraciones (media ± desviación estándar, n=9). *Corrección de Welch.*

Medio de cultivo	**Concentración de surfactante %**	**Tamaño hidrodinámico nm**			
		Triton X-100	Tween 80	SDS	CTAB
Mueller-Hinton	0	127,7 ± 6,0	127,7 ± 6,0	127,7 ± 6,0	127,7 ± 6,0
	0,1	119,5 ± 8,1	120,8 ± 9,0	116,9 ± 10,0	149,3 ± 7,3
	0,5	107,5 ± 8,7	112,3 ± 7,3	109,8 ± 9,4	141,4 ± 7,8
	1	71,4 ± 7,8	116,0 ± 7,4	113,4 ± 6,8	139,4 ± 8,6
	1,5	101,5 ± 7,6	106,8 ± 7,2	110,7 ± 7,2	135,1 ± 4,1
	2	91,6 ± 6,7	74,9 ± 6,5	95,9 ± 8,8	114,4 ± 3,7
ANOVA (valor p)		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Luria-Bertani	0	139,2 ± 8,3	139,2 ± 8,3	139,2 ± 8,3	139,2 ± 8,3
	0,1	118,5 ± 14,2	117,6 ± 10,4	112,0 ± 7,3	237,8 ± 24,7
	0,5	98,0 ± 8,3	109,6 ± 6,7	112,2 ± 3,9	144,6 ± 12,8
	1	87,6 ± 12,0	109,3 ± 7,6	108,9 ± 5,3	142,5 ± 0,9
	1,5	89,2 ± 11,9	94,6 ± 13,7	105,8 ± 4,4	135,4 ± 6,6
	2	81,7 ± 7,6	89,4 ± 6,8	95,9 ± 4,4	138,6 ± 7,4
ANOVA (valor p)		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001*
BHI	0	104,2 ± 10,8	104,2 ± 10,8	104,2 ± 10,8	104,2 ± 10,8
	0,1	109,8 ± 20,2	127,4 ± 21,6	102,7 ± 10,0	225,4 ± 48,7
	0,5	82,4 ± 7,4	114,7 ± 8,7	103,9 ± 31,1	285,3 ± 58,2
	1	96,6 ± 20,9	110,6 ± 11,9	119,5 ± 21,4	181,0 ± 38,5
	1,5	88,8 ± 12,8	97,8 ± 9,1	83,8 ± 6,6	179,9 ± 66,6
	2	84,3 ± 14,4	89,9 ± 9,8	86,5 ± 10,1	146,4 ± 9,7
ANOVA (valor p)		=0,006*	<0,001	<0,001*	<0,001*

Como puede verse en la Tabla 3.1.4, en todos los medios sin surfactante, las nanopartículas se agregaron. En relación con los diferentes surfactantes en el mismo medio, varias concentraciones de Triton X-100, Tween 80 y SDS contribuyeron a prevenir la agregación, ya que los diámetros hidrodinámicos medidos en presencia de estos surfactantes fueron menores que en su ausencia. Por el contrario, el surfactante CTAB no previno la agregación, y en la mayoría de los casos, se obtuvieron tamaños menores en ausencia de éste, lo que indicó que el surfactante CTAB no era adecuado para prevenir la agregación de las nanopartículas.

La adición de SDS, surfactante aniónico, disminuyó el tamaño de las nanopartículas de plata en comparación con la ausencia de SDS, en los tres medios estudiados, como puede observarse en la Tabla 3.1.4. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas para todas las concentraciones ($p<0,005$), excepto para las concentraciones de 0,1% de SDS en el medio MH y para las concentraciones más bajas (0,1 - 1 %) de SDS en el medio BHI. Debido a que las nanopartículas de plata están cargadas negativamente (potencial zeta: -46 mV) se produce una repulsión electrostática entre ellas y las moléculas del surfactante aniónico, lo que aumenta la estabilidad de las partículas coloidales dispersas en SDS y la posibilidad de que se produzca la agregación de las nanopartículas es relativamente baja. Este hecho se observó en otros estudios con partículas cargadas negativamente (AgNPs, SiO_2-NPs, ZnO-NPs, ZrO_2-NPs) y surfactantes aniónicos (SDS, SDBS) [286,288,289].

Por otro lado, la adición de CTAB, surfactante catiónico, dio lugar a diámetros hidrodinámicos mayores para casi todas las concentraciones de surfactante en comparación con la ausencia de éste en todos los medios estudiados. En los medios MH y BHI, los tamaños de las nanopartículas fueron significativamente más pequeños en ausencia del surfactante que a cualquier concentración de CTAB ($p<0,001$), excepto para la concentración de 1,5% en medio BHI y para 0,1%, 0,5% y 2% en medio MH, donde no se encontraron diferencias significativas. En el medio LB tampoco se encontraron diferencias significativas para ninguna concentración de CTAB, excepto para la concentración de 0,1% donde los diámetros hidrodinámicos fueron significativamente mayores que en ausencia de CTAB. La atracción electrostática entre el surfactante catiónico y las nanopartículas cargadas negativamente puede generar una estructura multicapa de moléculas de surfactante en la superficie de las nanopartículas y aumentar el diámetro hidrodinámico [288,307].

El último tipo de surfactantes estudiado fueron los surfactantes no iónicos. Como puede verse en la Tabla 3.1.4, se observó una disminución estadísticamente significativa de los diámetros hidrodinámicos ($p<0,005$) en presencia de Triton X-

100 y Tween 80 en el medio LB y MH, excepto para la concentración de 0,1% de ambos surfactantes en medio MH. Por otro lado, en el medio BHI, aunque la adición de Triton X-100 y Tween 80 disminuyó los tamaños de las nanopartículas para casi todas las concentraciones, no se observaron diferencias significativas en comparación con su ausencia. La suspensión de nanopartículas en presencia de surfactantes no iónicos fue muy estable debido al equilibrio entre las fuerzas atractivas y repulsivas, ya que no hay interacción entre el surfactante no iónico y la superficie cargada de las nanopartículas [286,289].

A partir de estos resultados, se determinó que los surfactantes no iónicos poseen una mayor capacidad de estabilización y previenen la agregación de las nanopartículas en comparación con los surfactantes aniónicos en los medios de cultivo, y especialmente, con los catiónicos. Por lo tanto, los surfactantes Triton X-100 y Tween 80 fueron los dos surfactantes que proporcionaban los mejores resultados, en concordancia con resultados previamente publicados donde determinaron que los mejores surfactantes para estabilizar nanopartículas de plata fueron Tween 80, y Triton X-100 para nanopartículas de TiO_2, ZrO_2, ZnO, Al_2O_3 y SiO_2 [286,289].

En relación con las diferentes concentraciones de surfactantes, se observó que al aumentar la concentración de surfactante, los diámetros hidrodinámicos disminuían ($p<0,05$). En el caso de las concentraciones más bajas de SDS (0,1 - 1 %) en medio BHI y la concentración de 0,1% de SDS, Triton X-100 y Tween 80 en medio MH, el diámetro hidrodinámico no difirió significativamente en comparación con su ausencia ($p>0,05$). Por tanto, se eligieron concentraciones altas de surfactantes para prevenir la agregación de las nanopartículas. Estos resultados difieren de los publicados previamente en la bibliografía, en los que al aumentar la concentración de los surfactantes, el tamaño de las nanopartículas aumentaba [288]. Estas diferencias podrían explicarse por el hecho de que en estos estudios publicados, los surfactantes se suspendieron en agua, mientras que en este estudio, los surfactantes estaban suspendidos en medios de cultivo, lo que podría afectar a su comportamiento.

Al comparar los diferentes medios de cultivo, el medio BHI fue el menos estable de los tres, con mayores coeficientes de variación que los otros medios, principalmente con la adición de CTAB y altas concentraciones de surfactante. Además, como se ha mencionado anteriormente, la adición de Triton X-100 y Tween 80 en medio BHI no produjo diferencias significativas en comparación con su ausencia, mientras que la adición de estos surfactantes en medio MH y LB permitió obtener tamaños significativamente menores. Por tanto, se determinó que el medio

BHI era el medio menos adecuado para prevenir la agregación de las nanopartículas en comparación con el medio MH y LB. Por otro lado, al comparar los medios MH y LB en presencia de surfactantes, se observó que para la concentración más baja (0,1%) de Triton X-100, Tween 80 y SDS en medio LB, se obtuvieron tamaños significativamente menores que en su ausencia; mientras que la misma concentración de estos surfactantes en medio MH, no se observaron diferencias significativas en comparación con su ausencia. Esto indicó que el medio LB era más adecuado para bajas concentraciones de surfactantes que el medio MH.

En estudios previamente publicados por otros autores, se observó que la presencia de sales como NaCl favoreció la agregación de nanopartículas ya que el grosor de la doble capa eléctrica alrededor de las nanopartículas de plata disminuye conforme aumenta la fuerza iónica, lo que permite su acercamiento. Además, aniones como Cl^-, pueden precipitar con iones plata alrededor de las nanopartículas de plata y crear un nuevo recubrimiento que aumenta el tamaño de las nanopartículas [285,308]. El cloruro de sodio está presente en la composición de los medios LB y BHI, mientras que no está presente en el medio MH. Esto podría ser un factor importante para elegir el medio óptimo, pero en este estudio no se observaron diferencias entre los medios debido a la presencia de NaCl. Esto podría explicarse por la presencia de sustancias orgánicas en el medio de cultivo como triptona y extracto de levadura, las cuales podrían afectar a la agregación de las nanopartículas de plata, aumentando la concentración crítica de coagulación, por lo que concentración de NaCl presente en el medio podría ser inferior a la necesaria para producir la agregación de las nanopartículas [285]. Por lo tanto, la agregación observada en estos medios sin surfactantes podría no ser producida por la presencia de NaCl. En cualquier caso, considerando los resultados obtenidos, los medios MH y LB con concentraciones altas de surfactantes fueron elegidos como medios de cultivo para futuros estudios.

Como conclusión, las condiciones de medios de cultivo óptimas para prevenir la agregación de las nanopartículas fueron:

- Medio LB con 1 - 2% Triton X-100.
- Medio MH con 1% Triton X-100.
- Medio MH y LB con 2% Tween 80 o SDS.
- Medio BHI con 1,5% SDS.

En cualquier caso, los medios MH con 2% Tween 80 o 1% Triton X-100, proporcionaron los resultados más próximos al tamaño de las nanopartículas en

agua ultrapura, siendo por tanto las mejores condiciones obtenidas para llevar a cabo los cultivos.

3.1.3.1.2. Efecto de la composición del medio de cultivo en la viabilidad bacteriana

Tras comprobar la influencia del surfactante y el medio de cultivo en el estado de agregación de las nanopartículas, es importante tener en cuenta que las altas concentraciones de surfactante en el medio de cultivo podrían afectar a la viabilidad de las bacterias. Para estudiar el efecto del surfactante sobre la viabilidad de las bacterias se seleccionaron los siguientes medios de cultivo y concentraciones de surfactantes: MH y LB con 1% y 2% Triton X-100 y 2% Tween 80 y BHI con 1,5% SDS. Asimismo, se dispuso de controles de los tres tipos de medio de cultivo (MH, LB y BHI) sin surfactante.

En los controles de los medios, se observó un crecimiento significativo de bacterias para las cepas *E. coli* ATCC y *E. coli* J62. Para la cepa *E. coli* ATCC no se observaron diferencias significativas en el crecimiento en ninguno de los medios estudiados, excepto en el caso del medio BHI + 1,5% SDS. Para la cepa *E. coli* J62, solamente se observaron diferencias significativas en el medio LB + 2% Triton X-100, donde hubo una reducción de crecimiento de varios órdenes de magnitud.

Para cuantificar estas reducciones en el crecimiento de las bacterias, se realizaron diluciones 1:1000 de los dos medios en los que se observaron diferencias y de los controles de los medios, para ambas bacterias, y se sembraron en placas Petri. Tras 24 horas de incubación, se contaron las unidades formadoras de colonias de cada combinación de medios y se compararon entre sí. Para la cepa *E. coli* ATCC, como se observó previamente, el crecimiento bacteriano en el medio LB sin surfactante fue del mismo orden que el medio LB + 2% Triton X-100, obteniendo un crecimiento de $(5{,}0 \pm 0{,}6)\text{x}10^5$ UFC mL^{-1} y $(3{,}0 \pm 0{,}4)\text{x}10^5$ UFC mL^{-1}, respectivamente. Por el contrario, $(4{,}0 \pm 0{,}5)\text{x}10^5$ UFC mL^{-1} crecieron en el medio BHI, mientras que no hubo crecimiento en el medio BHI + 1,5% SDS, lo que confirmó que el SDS a esta concentración afectaba a la viabilidad de las bacterias. El crecimiento masivo de la cepa *E. coli* J62 en las placas Petri no permitió contar las colonias. Cuando se añadió 2% de Triton X-100 al medio LB, también crecieron innumerables bacterias, pero se observó una reducción cualitativa y un menor tamaño de las colonias, lo que sugería que el surfactante afectaba a su desarrollo.

Como resultado de estos estudios de viabilidad, los medios LB + 2% Triton X-100 y BHI + 1,5% SDS fueron rechazados para futuros experimentos. Finalmente,

debido a que la viabilidad de las bacterias no estaba afectada por los surfactantes, y el tamaño de las nanopartículas en estos medios era similar al obtenido para las mismas nanopartículas en agua, se determinó que los dos medios más adecuados eran MH + 2% Tween 80 y MH + 1% Triton X-100. Entre ambos medios no se observaron diferencias significativas, por lo que cualquiera de los dos medios podría ser elegido como óptimo. Debido a que el Tween (Tween 80 y Tween 20) es un surfactante que se ha utilizado en varios estudios con nanopartículas de plata [289,307] y se ha observado que el Tween 80 proporciona una considerable mejora de la estabilidad de las nanopartículas de plata, el medio elegido como óptimo para investigar las interacciones entre las nanopartículas y las bacterias fue MH + 2% Tween 80.

3.1.3.2. Estudio de las especies de plata durante el proceso de incubación

Una vez optimizada la composición del medio de cultivo, es importante conocer si los materiales de plata sufren transformaciones (disolución/oxidación, agregación…) durante el proceso de incubación, así como las especies de plata que podrían estar presentes durante esta incubación. Para ello, se llevó a cabo un ensayo en el que se sometieron a la plata (I) y a las diferentes nanopartículas de plata (10 y 60 nm estabilizadas con citrato) a un proceso de incubación durante 24 horas en el medio de cultivo (sin bacterias), como se describe en el Apartado 3.1.2.5.9, con el fin de determinar las especies de plata presentes durante este proceso y que serían responsables de la acción bactericida de los nanomateriales.

Tras el proceso de incubación, estas muestras se diluyeron en agua ultrapura y se midieron mediante SP-ICP-MS, junto con unos controles de las mismas nanopartículas, sin incubación, diluidas en agua ultrapura. En la Figura 3.1.3 se recogen las distribuciones de tamaño de las nanopartículas de plata control y de las nanopartículas incubadas en el medio de cultivo. En el caso de las nanopartículas de 60 nm se obtuvieron distribuciones similares con tamaños medios próximos entre sí. El tamaño nominal de las nanopartículas incubadas fue 58,1 ± 0,1 nm, mientras que el de las nanopartículas de plata diluidas en agua fue 59,7 ± 0,4 nm. Estos valores concordaban entre sí y con el tamaño nominal proporcionado por el proveedor de 60 ± 7 nm. Esto indicaba que las nanopartículas mantenían el tamaño original tras la incubación y no sufrían procesos de agregación. Para validar esta información, se calcularon las recuperaciones en número tanto de las nanopartículas incubadas como las del control (Tabla 3.1.5). Las recuperaciones obtenidas fueron del 91 ± 3 % en ambos casos; por lo que mediante esta técnica se demostró que las nanopartículas de 60 nm estabilizadas con citrato se mantienen estables.

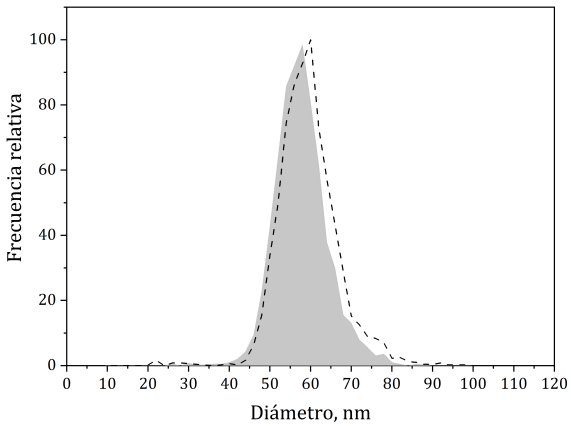


Figura 3.1.3. *Distribuciones de tamaño de las muestras de AgNPs-citrato de 60 nm, medidas mediante SP-ICP-MS. Nanopartículas control (línea discontinua). Nanopartículas sometidas a incubación en medio de cultivo MH + 2% Tween 80 (24 h) (área sombreada).*

Tabla 3.1.5. *Tamaño medio, concentración en número de las partículas y recuperación de las AgNPs-citrato de 60 nm sometidas 24 h a incubación en medio MH + 2% Tween 80. Media ± desviación estándar (n = 4).*

Medio	$X_C^{tamaño}$	Tamaño medio	Concentración en número	Recuperación
	nm	nm	L^{-1}	%
Agua	13,5	59,7 ± 0,4	(1,64 ± 0,05)x10^8	91 ± 3
MH + 2% Tween 80	15,5	58,3 ± 0,1	(1,35 ± 0,04)x10^8	91 ± 3

Adicionalmente, mediante SP-ICP-MS se determinó que las nanopartículas de 60 nm contenían una pequeña fracción de plata (I) en la suspensión original (3,9 ± 0,3 %), mientras que tras su incubación en el medio de cultivo, esta fracción de plata (I) aumentó hasta un 9,2 ± 0,1 %. Esto indicaba que, aunque en la suspensión original las nanopartículas se habían disuelto ligeramente, durante su incubación se producía una mayor disolución de las mismas.

Por otro lado, se midieron mediante SP-ICP-MS las nanopartículas de 10 nm estabilizadas con citrato e incubadas en el medio de cultivo. Debido a que, en las condiciones de medida, el valor crítico en tamaño era 10,7 nm, se detectaron partículas mayores de este tamaño, aunque no se obtuvieron resultados cuantitativos.

Para obtener información adicional sobre las nanopartículas de 10 nm y sobre la posible presencia de una fracción disuelta en las suspensiones originales como consecuencia de la oxidación de las nanopartículas, las muestras y una serie de controles se midieron mediante HDC-ICP-MS. En esta técnica de separación las partículas más grandes son transportadas más rápidamente que las pequeñas [62], por lo que las especies de mayor tamaño se eluyen en primer lugar. En la Figura 3.1.4.a se recogen los cromatogramas de la muestra de Ag(I) y nanopartículas de 10 nm incubadas durante 24 horas. Se observó que en ambos cromatogramas sólo se obtuvo un pico correspondiente a la plata disuelta (distribución roja) y a las nanopartículas de plata de 10 nm (distribución azul), respectivamente. Esto indicaba que, en ambos casos, se mantenía el estado original de las especies de plata que se incubaban, y en el caso de las nanopartículas, éstas no se oxidaban a plata (I). En la Figura 3.1.4.b se muestra el cromatograma correspondiente con la muestra de nanopartículas de 60 nm, donde se observaron dos picos, el primero con un tiempo de retención de 8,15 min, correspondiente a las nanopartículas de 60 nm; y el segundo a 8,50 min, que indicó la presencia de plata disuelta. En el caso de estas nanopartículas se confirmó la oxidación parcial de las mismas a Ag(I) durante el proceso de incubación.

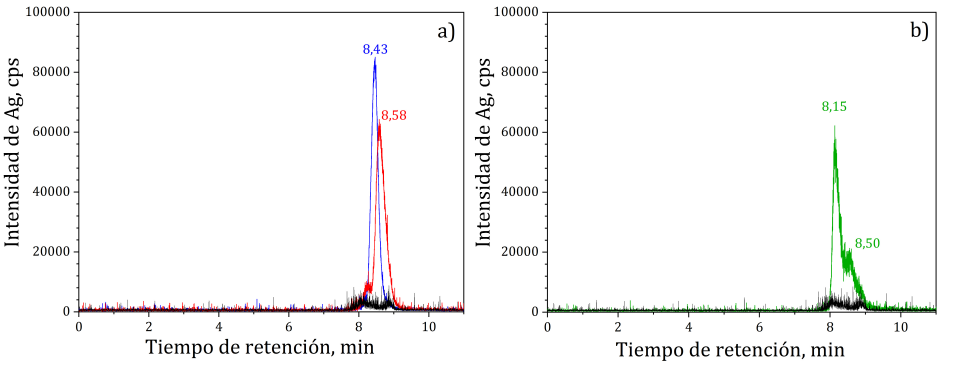


Figura 3.1.4. *Cromatogramas hidrodinámicos de las muestras sometidas a un proceso de incubación: a) Ag(I) (rojo) y AgNPs-citrato de 10 nm (azul) y b) AgNPs-citrato de 60 nm (verde). Control del medio de cultivo (negro).*

Los tiempos de retención obtenidos para los controles diluidos en la fase móvil fueron 8,85 ± 0,01, 8,35 ± 0,01 y 8,05 ± 0,01 min para plata disuelta, nanopartículas de plata de 10 nm y de 60 nm estabilizadas con citrato, respectivamente. Al comparar los controles con las muestras se observó que en el caso de las nanopartículas los

picos se desplazaban a tiempos de retención mayores como consecuencia del efecto matriz de los componentes del medio, desplazándose en la misma proporción. Por el contrario, en el caso de la plata (I) incubada en medio de cultivo, el pico se obtuvo a un tiempo de retención menor que en el control, lo que indicaba que aumentaba el tamaño de las especies de plata. Este hecho puede explicarse como consecuencia de la formación de complejos con proteínas del medio de cultivo, de forma que al estar la plata (I) asociada a especies de mayor tamaño, sus tiempos de elución serían menores. Además, esto está de acuerdo con el segundo pico que se observó tras la incubación de las nanopartículas de 60 nm (8,50 min), que corresponde a la presencia de plata (I) complejada con las proteínas del medio.

Por tanto, tras analizar los resultados obtenidos mediante ambas técnicas se pudo concluir que, en el caso de las nanopartículas de plata de 60 nm estabilizadas con citrato, tras su incubación se observó la presencia de las propias nanopartículas y de una mayor fracción de plata disuelta que en la suspensión original. La presencia de esta plata disuelta sería consecuencia de la oxidación de las nanopartículas en el medio de cultivo y la presencia de la plata (I) en la suspensión original. Por el contrario, en las nanopartículas de plata de 10 nm no se observó la presencia de plata disuelta, lo que indicaba que las nanopartículas no se oxidaban significativamente durante la incubación ni presentaban plata (I) originalmente.

3.1.3.3. Evaluación de la actividad bactericida de la plata (I) y de las nanopartículas de plata

La actividad bactericida de los nanomateriales de plata se estudió utilizando el método de dilución, determinándose la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM). En la Tabla 3.1.6 se recogen los resultados de la CIM y CBM de cada uno de los antimicrobianos empleados (Ag(I) y AgNPs) frente a las dos cepas de *E. coli* estudiadas. Debido a que la determinación de la CIM se realiza utilizando una escala discontinua (concentraciones decrecientes en base 2), los valores reales de la CIM se encontrarán en algún valor situado entre la CIM experimentalmente obtenida y la concentración inmediatamente inferior. Los resultados obtenidos de la CIM y CBM tienen una incertidumbre de ± 1 dilución. Generalmente, la CBM es la misma o como máximo una o dos diluciones mayor que la CIM [36]. Como se observa, los resultados obtenidos mostraron este comportamiento.

Al comparar la actividad bactericida de las nanopartículas de plata y de Ag(I) se observó que esta última tenía una menor CIM y CBM que las nanopartículas frente a

E. coli ATCC, por lo que se concluye que presenta mayores efectos bacteriostáticos y bactericidas. En el caso de *E. coli* J62, la Ag(I) y las nanopartículas de 10 nm tenían el mismo efecto bacteriostático, mientras que la Ag(I) tenía mayor efecto bactericida. Al compararlo con las nanopartículas de 60 nm también se observaron mayores efectos bacteriostáticos y bactericidas de la Ag(I).

Tabla 3.1.6. *Concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM) de distintos antimicrobianos frente a distintas cepas de bacterias E. coli.*

Cepa bacteriana	Antimicrobiano	CIM mg L^{-1}	CBM mg L^{-1}
E. coli ATCC 25922	Ag(I)	8	8
	AgNPs-citrato 10 nm	16	16
	AgNPs-citrato 60 nm	16	> 16
E. coli J62	Ag(I)	8	8
	AgNPs-citrato 10 nm	8	16
	AgNPs-citrato 60 nm	16	16

En la bibliografía se encuentran valores de CIM y CBM de $AgNO_3$ y nanopartículas de plata frente a *E. coli* muy diferentes entre sí, ya que el efecto bactericida de los antimicrobianos depende de factores como el medio de cultivo, el tipo de cepa de bacterias, la concentración del inóculo inicial, así como de la concentración, el tamaño y el recubrimiento de las nanopartículas. Pormohammad *et al*. demostraron la dependencia de la CIM y CBM en función del medio de cultivo para la cepa *E. coli* ATCC 25922, obteniendo una CIM y CBM de $AgNO_3$ de 2,5 y 21 mg L^{-1} en medio MH, y 21 y 42,5 mg L^{-1}, en medio LB, respectivamente [57]. Por tanto, comparando los resultados obtenidos experimentalmente en este estudio con el amplio rango de valores de la bibliografía para la CIM de $AgNO_3$ frente a distintas cepas de *E. coli* en medio MH (1 - 31 mg L^{-1}) [57,302,309,310], se puede concluir que los datos son concordantes entre sí, ya que en este estudio la CIM y CBM para $AgNO_3$ sería 12,6 mg L^{-1} (CIM de Ag(I) = 8 mg L^{-1}).

Respecto a la CIM y CBM de las nanopartículas de plata, Agnihotri *et al*. demostraron la dependencia de estas concentraciones en función del tamaño de las nanopartículas con el mismo recubrimiento (citrato), al obtener valores más pequeños y, por tanto, mayor efecto bactericida, conforme disminuía el tamaño. La CIM de nanopartículas de 10 y 63 nm frente a *E. coli* ATCC 25922 fue 30 y 90 mg L^{-1}, respectivamente [266]. A su vez, Franci *et al*. recogieron distintos valores de CIM de

nanopartículas de distintos tamaños y recubrimientos frente a bacterias *E. coli*, los cuales variaban desde 0,25 - 100 mg L^{-1} [39]. Esta dependencia de la actividad bactericida en relación con el tamaño de las nanopartículas también se observó en los resultados mostrados en la Tabla 3.1.6. En los experimentos realizados en el mismo medio de incubación frente a la misma cepa bacteriana, las nanopartículas de 10 nm poseen mayores efectos bacteriostáticos que las nanopartículas de 60 nm. En cualquier caso, resulta complicado comparar los valores numéricos de los resultados experimentales con los referenciados en la bibliografía debido a la falta de armonización de las condiciones de los experimentos.

3.1.3.4. Determinación de la concentración de plata total en las bacterias mediante digestión alcalina y digestión ácida

En una primera aproximación, para realizar la digestión de las bacterias preservando las nanopartículas de plata, se tomó como punto de partida los procedimientos optimizados dentro del grupo de investigación para la determinación de plata e identificación de nanopartículas de plata en heces de ratones mediante una digestión alcalina con TMAH y cisteína [69], y en medios de cultivo y células mediante digestión con TMAH y Triton X-100 [311]. El TMAH es un reactivo capaz de provocar la ruptura hidrolítica y la metilación de enlaces éster, amida y algunos enlaces éter, solubilizando así la materia orgánica. El TMAH es una base fuerte que va a producir la precipitación de la plata iónica, y para mantener la plata en disolución se utiliza un complejante.

Estos experimentos previos con TMAH, cisteína y Triton X-100 no resultaron adecuados en estos estudios, ya que los ensayos de recuperación no fueron satisfactorios. En el caso del ensayo con Ag(I), solamente se recuperó un 65 ± 4 % de la plata adicionada, aunque en el caso de la adición de las nanopartículas de plata de 60 nm se recuperó un 96 ± 5 %. A la vista de estos resultados, se dedujo que la cisteína no estabilizaba adecuadamente la plata iónica y las pérdidas observadas podrían ser debidas a la precipitación de plata. Estas especies insolubles de plata se observaron mediante SP-ICP-MS tras la detección de eventos de partículas en la muestra en la que se había adicionado Ag(I) (Figura A3.2.1 del Anexo A3.2). Por otro lado, en la muestra de nanopartículas de plata se observaron dos distribuciones de partículas lo que indicaba que las nanopartículas no se mantenían estables durante la digestión alcalina.

Posteriormente, se evaluó un método alternativo de digestión alcalina con TMAH y $CaCl_2$. En este caso, se tomó como punto de partida un procedimiento

optimizado por Clark *et al*. para la identificación y determinación de nanopartículas de plata en hígado de trucha [70]. Se repitieron los mismos ensayos de recuperación que con el procedimiento anterior y en este caso, se obtuvieron recuperaciones del 94 ± 9 % y 105 ± 3 % para las adiciones de plata (I) y nanopartículas de plata, respectivamente. Adicionalmente, se determinaron las especies de plata resultantes tras la digestión alcalina mediante SP-ICP-MS. En la Figura A3.2.2 del Anexo A3.2 se muestran los barridos de tiempo obtenidos. Tomando como blanco de matriz el blanco del proceso de digestión, el valor crítico para la detección de partículas $Y_{C,N}$ era 280 eventos, como consecuencia de que los reactivos utilizados durante la digestión contenían trazas de plata. En el caso de la adición de Ag(I), se detectó un número de eventos por debajo del valor crítico $Y_{C,N}$, lo que confirmaba la ausencia de partículas en la muestra. Esto a su vez, indicaba que la plata se mantenía en disolución y no se habían formado especies insolubles como en la digestión con cisteína y Triton X-100. Por otro lado, en el caso de las nanopartículas digeridas, el número de eventos detectados era mayor que $Y_{C,N}$, y se observó una distribución con un tamaño promedio de 64,6 ± 0,6 nm, lo que indicaba que las nanopartículas mantenían su tamaño original tras la digestión (Figura A3.2.3 del Anexo A3.2). Esta distribución se comparó con un control de nanopartículas de plata suspendidas en el mismo medio de TMAH y $CaCl_2$ y se determinó que eran comparables entre sí ya que en esta última distribución las nanopartículas tenían un tamaño promedio de 63,5 ± 0,2 nm. Por tanto, a la vista de estos resultados, se pudo concluir que este procedimiento de digestión favorecía la estabilización de la plata iónica, así como mantenía estables las nanopartículas durante el proceso de digestión.

Posteriormente, se realizó un ensayo para comprobar si la matriz en la que se encontraban las bacterias afectaba a la recuperación de la plata. Para ello, se adicionó Ag(I) y nanopartículas de plata a un control de bacterias *E. coli* J62 y se sometieron a un proceso de digestión alcalina. Las recuperaciones obtenidas fueron del 91 ± 3 % y 91 ± 8 %, respectivamente, lo que indicaba que la matriz de las muestras biológicas no afectaba a la cuantificación de la plata. Asimismo, en el caso de las nanopartículas de plata adicionadas a las bacterias, la distribución de tamaño presentó el mismo perfil que en el ensayo anterior (Figura A3.2.4 del Anexo A3.2), obteniéndose un tamaño promedio de 61,8 ± 0,2 nm; mientras que el tamaño promedio de las nanopartículas de plata control suspendidas en el mismo medio de TMAH y $CaCl_2$ fue 60,7 ± 0,1 nm, lo que corroboraba que la matriz biológica no afectaba en la caracterización de las nanopartículas.

Tras estos ensayos, se determinó la concentración de plata total en las muestras de cultivos bacterianos con plata. Para ello, se llevó a cabo una digestión alcalina con TMAH y $CaCl_2$ (Apartado 3.1.2.5.8) y la posterior cuantificación de la plata presente

en las bacterias a través de ICP-MS por análisis directo de las suspensiones. Tanto la plata disuelta como las nanopartículas de plata se comportan en el ICP-MS de manera similar [87], por lo que no fue necesario someter las muestras procedentes de la digestión alcalina a una posterior digestión ácida.

Adicionalmente, como método de validación de los resultados de la digestión alcalina, se llevó a cabo la digestión ácida de las mismas muestras de bacterias (Apartado 3.1.2.5.7) y su posterior análisis mediante ICP-MS. En la Tabla 3.1.7 se muestran los resultados obtenidos en la cuantificación de las muestras de bacterias tras la digestión alcalina y la digestión ácida. Los resultados se muestran como el promedio de 5 réplicas. Las desviaciones estándar obtenidas fueron elevadas debido a la heterogeneidad de las muestras, ya que la cantidad de plata por bacteria presenta una elevada variabilidad.

Tabla 3.1.7. *Concentraciones de plata total tras la digestión alcalina y ácida de las muestras de bacterias* E. coli*. Media ± desviación estándar (n=5).*

Muestra	**Concentración de plata µg L^{-1}**	
	Digestión alcalina	**Digestión ácida**
Control bacteria *E. coli* ATCC [a, b]	< 4	< 0,4
Bacterias *E. coli* ATCC + Ag(I) [b]	330,9 ± 53,0	305,1 ± 49,1
Bacterias *E. coli* ATCC + AgNPs-citrato 10 nm [a]	4410,9 ± 950,8	4385,2 ± 152,8
Bacterias *E. coli* ATCC + AgNPs-citrato 60 nm [b]	121,7 ± 10,4	130,1 ± 24,5
Control bacteria *E. coli* J62 [a, b]	< 4	0,9 ± 0,2
Bacterias *E. coli* J62 + Ag(I) [b]	495,0 ± 8,2	492,6 ± 58,9
Bacterias *E. coli* J62 + AgNPs-citrato 10 nm [a]	74,1 ± 12,0	73,3 ± 9,4
Bacterias *E. coli* J62 + AgNPs-citrato 60 nm [b]	494,3 ± 59,1	451,7 ± 93,6

[a] $LOQ_{digestión\ alcalina}$ = 4 µg L^{-1}, $LOQ_{digestión\ ácida}$ = 400 ng L^{-1}

[b] $LOQ_{digestión\ alcalina}$ = 2 µg L^{-1}, $LOQ_{digestión\ ácida}$ = 300 ng L^{-1}

Los límites de cuantificación obtenidos de la digestión alcalina (calculado como 10 veces la desviación estándar del blanco) fueron 20 y 44 ng L^{-1}, para los distintos días de medida. Teniendo en cuenta la dilución de las muestras, los límites de

cuantificación obtenidos referidos a las suspensiones fueron 2 y 4 μg L^{-1}, respectivamente. En el caso de la digestión ácida, los límites de cuantificación fueron 3 y 4 ng L^{-1}, para los distintos días de medida. Teniendo en cuenta la dilución, los límites de cuantificación obtenidos referidos a las suspensiones fueron 300 y 400 ng L^{-1}, respectivamente.

Aplicando un test t con un nivel de confianza del 95% no se obtuvieron diferencias significativas, por lo que se puede confirmar que el procedimiento de digestión con TMAH y $CaCl_2$ permite obtener resultados similares a los obtenidos mediante un ataque ácido de las muestras biológicas.

3.1.3.5. Estudio del efecto bactericida de la plata (I) y de las nanopartículas de plata

Como se ha comentado anteriormente, las propiedades bactericidas de las nanopartículas de plata están influenciadas por propiedades específicas como el tamaño [266] o el recubrimiento y la carga superficial [267,279,312]. En este estudio, se utilizaron nanopartículas de plata estabilizadas con citrato de dos tamaños diferentes, 10 y 60 nm, con el objetivo de estudiar la influencia del tamaño de las nanopartículas en su forma de interaccionar con las bacterias. Adicionalmente, se intentó estudiar la influencia del recubrimiento analizando nanopartículas de 60 nm estabilizadas con ácido tánico, pero tras observar mediante SP-ICP-MS y HDC-ICP-MS que la suspensión original de nanopartículas contenía en torno a un 10% de plata (I), se descartó su utilización.

3.1.3.5.1. Detección de plata mediante SC-ICP-MS

Las muestras de bacterias previamente diluidas con agua ultrapura (Apartado 3.1.2.5.11) se analizaron mediante SC-ICP-MS para detectar la presencia de plata en las bacterias. Además, se analizó un control de bacterias y un control del medio de incubación. En la Figura 3.1.5 y Figura 3.1.6 se muestran los barridos de tiempo de las distintas muestras analizadas. Se aplicaron los conceptos de valores críticos discutidos en el Capítulo 1.1 relacionados con la discriminación de los eventos de línea base de los de partículas mediante el criterio 5σ y la determinación del valor crítico, $Y_{C,N}$, para la detección de partículas (ecuación (30), Apartado 1.1.3.2.2). En las condiciones de medida, el valor crítico Y_C establecido fue de 2 cuentas. Tanto en los barridos de los controles como en los de las muestras se observaron eventos por encima de este valor crítico. En este caso, tomando como blanco de matriz un control

del medio de incubación (sin exposición a bacterias ni plata) (Figura 3.1.5.a), el valor de $Y_{C,N}$ fue 150 eventos, el cual fue debido a la presencia de trazas de plata en el medio de cultivo. En los controles de bacterias sin exposición a plata (Figura 3.1.5.b y Figura 3.1.5.c), se obtuvo un número de eventos igual que el valor crítico $Y_{C,N}$, lo que confirmaba la ausencia de biopartículas que contuvieran plata en el control de bacterias. En el caso de las muestras de bacterias expuestas a Ag(I) y nanopartículas de plata de 10 y 60 nm (Figura 3.1.6), se obtuvo un número de eventos mayor (890 - 3150 eventos) que $Y_{C,N}$ (180 eventos), el cual se calculó considerando los controles de bacterias como blanco de matriz. Esto confirmó la presencia de biopartículas que contenían plata en todas las muestras, debido a que las bacterias habían interaccionado con la plata durante su incubación y la plata se había internalizado o adsorbido en la pared bacteriana.

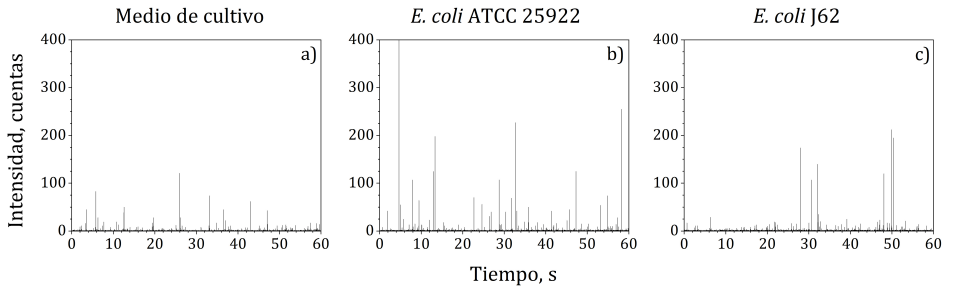


Figura 3.1.5. *Barridos de tiempo de SC-ICP-MS para distintos controles: a) Control de medio de cultivo, b) Control de bacterias* E. coli *ATCC 25922, c) Control de bacterias* E. coli *J62.*

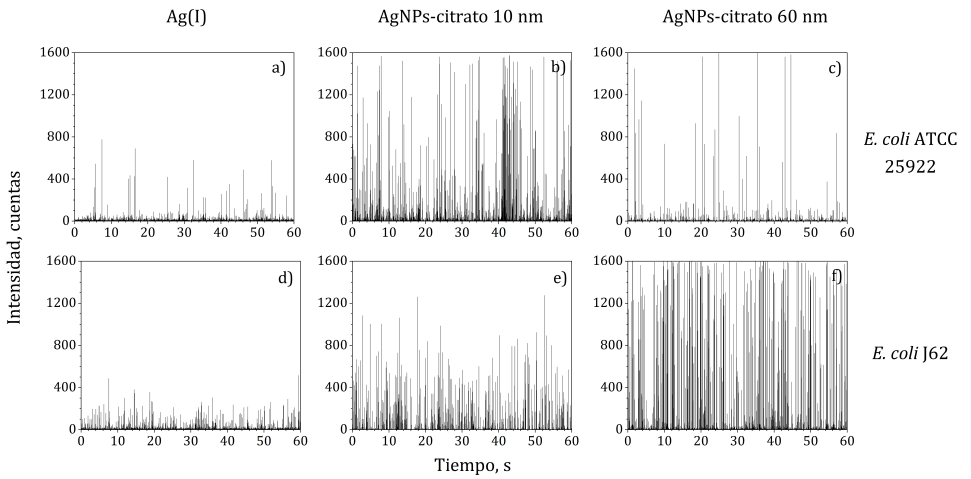


Figura 3.1.6. *Barridos de tiempo de SC-ICP-MS para las muestras de bacterias* E. coli *ATCC 25922 (a - c) y J62 (d - f) expuestas a Ag(I), AgNPs-citrato 10 nm y AgNPs-citrato 60 nm, respectivamente.*

En la Figura 3.1.7 se muestran los histogramas de masa de plata por bacteria para las muestras analizadas. En el caso de los controles se observó una pequeña distribución en comparación con el resto de las muestras de bacterias, probablemente por las trazas de plata que pudieran contener los reactivos. En estas condiciones de medida el valor crítico en masa, X_C^{masa}, fue 12 ag de plata. En el caso de las bacterias expuestas a Ag(I) (Figura 3.1.7.a), ambas distribuciones estaban comprendidas entre 12 - 400 ag/bacteria, siendo la distribución de las bacterias *E. coli* ATCC 25922 ligeramente mayor.

En el caso de las bacterias expuestas a nanopartículas de plata estabilizadas con citrato de 10 nm (Figura 3.1.7.b), las distribuciones de masa de plata estaban comprendidas, aproximadamente, entre 14 - 600 ag/bacteria y 14 - 200 ag/bacteria, para las cepas *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* J62, respectivamente; siendo mayor la distribución de las bacterias *E. coli* ATCC 25922, lo que podría deberse a que la concentración inicial de nanopartículas incubadas era mayor que en el caso de *E. coli* J62, por lo que una mayor cantidad de plata podría ser captada por las bacterias. En el caso de las bacterias expuestas a nanopartículas de plata estabilizadas con citrato de 60 nm (Figura 3.1.7.c) las distribuciones eran similares para ambas cepas y estaban comprendidas entre 12 - 400 ag/bacteria.

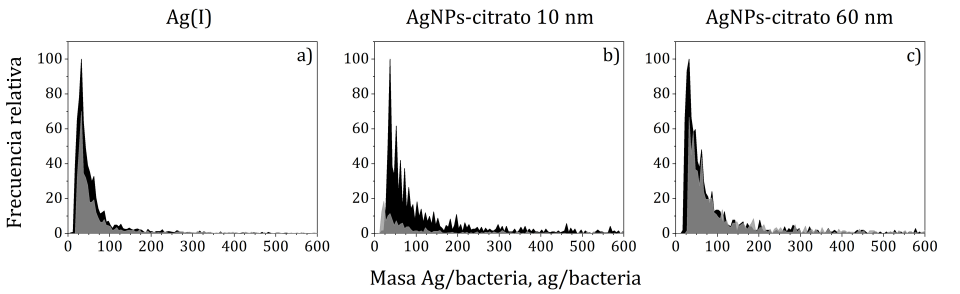


Figura 3.1.7. *Distribuciones de masa de Ag por bacteria medidas mediante SC-ICP-MS para las muestras de bacterias* E. coli *ATCC 25922 (negro) y J62 (gris) expuestas a: a) 0,50 mg L^{-1} Ag(I), b) 4 y 2 mg L^{-1} AgNPs-citrato 10 nm, respectivamente, c) 0,50 mg L^{-1} AgNPs-citrato 60 nm.*

Por tanto, estos resultados demostraron que ambas cepas de bacterias *E. coli* habían internalizado o adsorbido plata como consecuencia de la incubación de éstas con Ag(I) y nanopartículas de plata estabilizadas con citrato de 10 y 60 nm.

Adicionalmente, se determinó el porcentaje de bacterias que habían acumulado plata respecto a las bacterias en la suspensión madre de las muestras. La concentración total de bacterias se determinó siguiendo el procedimiento descrito en el Apartado 3.1.2.5.1, el cual está basado en medidas de turbidimetría. Debido a que el método de la determinación de la concentración inicial de bacterias no está validado, los resultados obtenidos de porcentaje de bacterias que contenían plata no se consideran valores absolutos, sino que solamente deben servir para realizar comparaciones entre las distintas muestras. En la Figura 3.1.8 se muestran los resultados de la concentración de bacterias detectadas que contienen plata por encima de 12 ag y la fracción que representan respecto al total de bacterias presentes en las suspensiones. En el caso de las muestras incubadas con la misma concentración (0,5 mg L^{-1}) de nanopartículas de plata de 60 nm y Ag(I) se observó que, en el último caso, la fracción de bacterias en las que se detectó plata era significativamente mayor, en torno a un 30 - 40 %, en comparación con el 2 - 9 % de plata detectada en el caso de las muestras incubadas con nanopartículas. Esto indicaba que los iones plata presentaban una mayor reactividad que las nanopartículas de plata frente a una concentración inicial de bacterias Gram-negativas similar, lo que concordaba con los resultados obtenidos previamente de CIM y CBM. La atracción electrostática entre la carga negativa de la membrana celular de estas bacterias y la carga positiva de los iones plata podría favorecer la adsorción de los iones a la pared celular y facilitar su entrada al interior de la bacteria dando lugar a una mayor acumulación de plata en las mismas; en comparación con las nanopartículas de plata estabilizadas con citrato, que presentan una carga superficial negativa [238].

Por el contrario, en el caso de las muestras de ambas cepas incubadas con nanopartículas de plata de 10 nm no se puede comparar directamente la fracción de bacterias que contenían plata frente a las muestras de bacterias incubadas con Ag(I) o nanopartículas de 60 nm debido a que, la concentración de incubación de nanopartículas de 10 nm fue diferente a la concentración de las de 60 nm y la de plata (I).

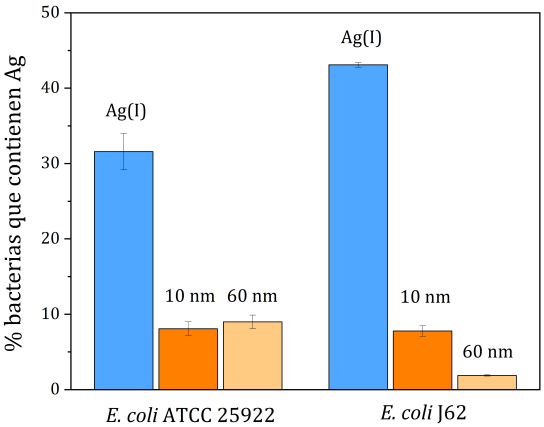


Figura 3.1.8. *Fracción de bacterias E. coli ATCC 25922 y E. coli J62 que contienen plata respecto a las bacterias totales de la suspensión. Ag(I): 0,50 mg L^{-1}. AgNPs 10 nm: 4 y 2 mg L^{-1}, respectivamente. AgNPs 60 nm: 0,50 mg L^{-1}.*

3.1.3.5.2. Detección de nanopartículas de plata en bacterias tras digestión alcalina mediante SP-ICP-MS

Las muestras de bacterias incubadas con plata, previamente digeridas con TMAH y $CaCl_2$ (Apartado 3.1.2.5.8), se midieron mediante SP-ICP-MS con el objetivo de determinar la forma química en la que se encontraba la plata internalizada o adsorbida en las bacterias. Se utilizaron como referencia suspensiones de nanopartículas de plata de 10 y 60 nm diluidas en el mismo medio final que las muestras, TMAH 0,2% y $CaCl_2$ 0,05 mM.

En la Figura 3.1.9 se muestran las distribuciones de tamaño para las muestras incubadas con nanopartículas de plata estabilizadas con citrato de 60 nm sometidas a la digestión alcalina. En las condiciones de medida, el valor crítico establecido fue de 2 cuentas, mientras que el valor crítico en tamaño fue de 14,6 nm. En el caso del control del blanco del proceso de digestión y del control de las bacterias *E. coli* J62 se obtuvieron aproximadamente 200 eventos, y se observó una pequeña distribución en torno a 20 - 25 nm correspondiente a impurezas de los reactivos. En la muestra de bacterias *E. coli* J62 incubadas con nanopartículas de 60 nm no se observó ninguna distribución correspondiente a dichas nanopartículas, lo que indicaba que las nanopartículas no habían sido internalizadas ni adsorbidas por las bacterias en su forma original. Además, se obtuvo una línea base mayor que la de las nanopartículas control, lo que indicaba que la forma química en la que las bacterias habían captado plata era plata iónica como consecuencia de la oxidación parcial de las

nanopartículas o de la plata (I) de la suspensión original, y, por tanto, tras la digestión de la matriz orgánica de las bacterias, la plata disuelta se observaba en la línea base.

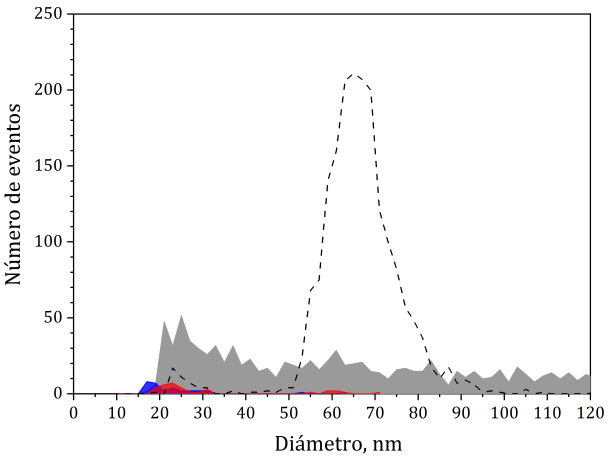


Figura 3.1.9. *Distribuciones de tamaño medidas por SP-ICP-MS para la muestra de bacterias* E. coli *J62 incubadas con AgNPs-citrato de 60 nm (gris). Control AgNPs (línea discontinua). Blanco del proceso de digestión (azul). Control de bacterias (rojo).*

En la Figura 3.1.10 se muestran las distribuciones de tamaño para las muestras incubadas con nanopartículas de plata estabilizadas con citrato de 10 nm sometidas a la digestión alcalina. Al medir la suspensión control de nanopartículas estabilizadas con citrato de 10 nm, se obtuvo una distribución incompleta, debido a que el valor crítico en tamaño era mayor que el tamaño promedio de las nanopartículas de 10 nm y, por tanto, sólo se detectó una parte de la distribución de nanopartículas que había en la suspensión. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este ensayo son cualitativos y sólo permiten corroborar la presencia de nanopartículas de tamaño por encima de 14,6 nm. En el caso de ambas bacterias incubadas con nanopartículas de plata de 10 nm, se observó unas distribuciones mayores que las de los controles de bacterias. Al comparar estas distribuciones de las muestras de bacterias con la de las nanopartículas control se podría deducir que el perfil de estas distribuciones podría deberse a la presencia de nanopartículas de plata de 10 nm captadas por las bacterias, las cuales, al degradar la matriz orgánica de las bacterias, quedan en suspensión en la muestra.

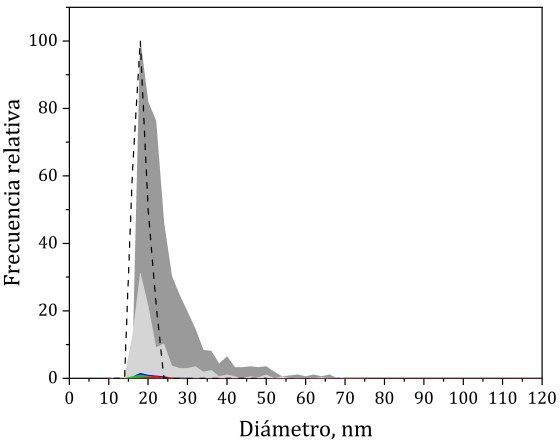


Figura 3.1.10. *Distribuciones de tamaño de AgNPs captadas por bacterias* E. coli *ATCC 25922 (gris oscuro) y J62 (gris claro) incubadas con AgNPs-citrato de 10 nm y medidas por SP-ICP-MS. Control AgNPs (línea discontinua). Blanco del proceso de digestión (azul). Control de bacterias* E. coli *ATCC (rojo) y J62 (verde).*

Tras estos resultados, se concluyó que, en el caso de las bacterias incubadas con nanopartículas de plata de 60 nm, éstas no se internalizaron ni se adsorbieron significativamente en las bacterias. La interacción producida de la plata con las bacterias sería en forma iónica, como consecuencia de la oxidación parcial de las nanopartículas. Por otro lado, en el caso de las nanopartículas de plata de 10 nm, debido a que las nanopartículas son muy pequeñas, y están muy próximas al valor crítico en tamaño para la técnica de SP-ICP-MS, sólo fue posible detectar, tras la digestión con TMAH, nanopartículas mayores de 14,6 nm. Por tanto, para validar y complementar esta información obtenida mediante SP-ICP-MS, es necesario utilizar otras técnicas complementarias como HDC-ICP-MS.

3.1.3.5.3. Detección de nanopartículas de plata en bacterias tras digestión alcalina mediante HDC-ICP-MS

Debido a las limitaciones para detectar las nanopartículas de 10 nm a través de SP-ICP-MS, las muestras de bacterias incubadas con nanopartículas de plata de 10 nm, sometidas a la digestión con TMAH y $CaCl_2$ (Apartado 3.1.2.5.8), se midieron mediante la técnica de HDC-ICP-MS. En la Figura 3.1.11 se recogen los cromatogramas hidrodinámicos para las muestras de bacterias digeridas. En ambos cromatogramas se observaron dos picos principales, el primero a un tiempo de retención de 8,50 y 8,60 min, y el segundo a un tiempo de 9,58 y 9,50 nm. El primero

de los picos de los dos cromatogramas se corresponde con la presencia de nanopartículas de plata de 10 nm, mientras que el segundo es debido a la presencia de plata disuelta. Estas muestras digeridas se encontraban en el medio de digestión TMAH y $CaCl_2$, y a su vez, durante el análisis fueron diluidas con la fase móvil. Los cromatogramas de las muestras se compararon con unas suspensiones de nanopartículas de plata de 10 nm y una disolución de plata disuelta diluidas con la fase móvil, las cuáles se eluyeron a un tiempo de 8,32 y 9,12 min, respectivamente. Las diferencias en los tiempos de retención entre las muestras y los controles se asociaron a la matriz de la muestra, ya que los dos picos observados en los cromatogramas de las muestras están desplazados en la misma proporción en comparación con los controles.

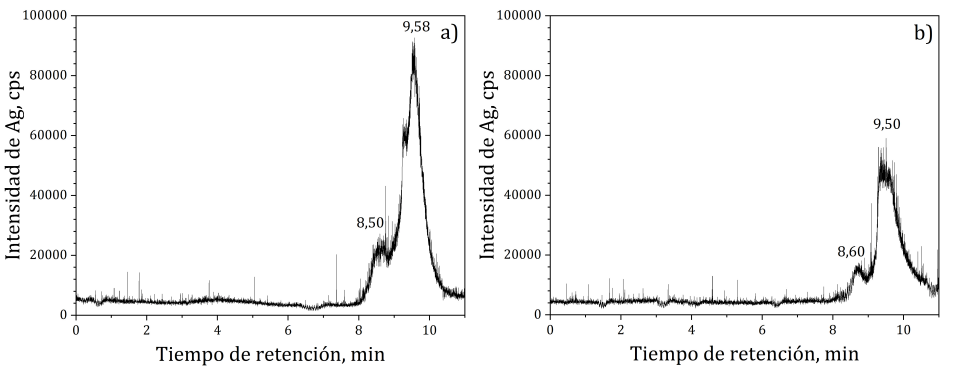


Figura 3.1.11. *Cromatogramas hidrodinámicos de las muestras digeridas con TMAH y $CaCl_2$ de bacterias a)* E. coli *ATCC y b)* E. coli *J62, incubadas con AgNPs-citrato de 10 nm. Primer pico: nanopartículas de plata; segundo pico: plata disuelta.*

Estos resultados demostraron que, aunque las nanopartículas de plata de 10 nm no se oxidan significativamente durante el proceso de incubación y la plata se encuentra en la forma particulada, cuando éstas entran en contacto con la pared de las bacterias se produce su oxidación y la liberación de iones plata de su superficie, los cuales podrían internalizarse o adsorberse en la pared de las bacterias. Alternativamente, las nanopartículas se podrían internalizar en las bacterias tras el contacto con la pared bacteriana, y una vez en el interior de las mismas, producirse la oxidación de las nanopartículas a plata (I).

Con esto, se concluye que la técnica HDC-ICP-MS permitió la separación y detección de nanopartículas de plata y sus formas disueltas en las muestras de bacterias digeridas. Estos resultados fueron concordantes con los obtenidos mediante SP-ICP-MS, y confirmaron que, en el caso de las bacterias que han sido incubadas con nanopartículas de plata de 10 nm, la plata acumulada en las bacterias se encontraba tanto en forma particulada como en forma disuelta, con una mayor proporción de esta última. Este comportamiento es distinto del observado con nanopartículas de plata de 60 nm, donde no se observó la captación de nanopartículas por parte de las bacterias.

3.1.3.5.4. Mecanismos de acción asociados a la actividad bactericida de los nanomateriales de plata

Tras comprobar que en los medios de cultivo, en ausencia de microorganismos, las nanopartículas de plata de 10 nm no se oxidan a plata (I), mientras que en el caso de las nanopartículas de 60 nm, se observaron las propias nanopartículas y la presencia de plata disuelta, el paso final consiste en establecer una relación entre los resultados analíticos obtenidos y los posibles mecanismos de acción involucrados en la actividad bactericida de estas nanopartículas de plata.

En la Tabla 3.1.8 se recoge un resumen de estudios sobre los distintos mecanismos asociados a la actividad bactericida de las nanopartículas de plata, las técnicas analíticas utilizadas y las evidencias observadas. Como se ha comentado en la Introducción, los posibles mecanismos envueltos en la actividad bactericida de las nanopartículas de plata son: asociado a las partículas, combinado ion-partícula y asociado a los iones.

Tabla 3.1.8. *Estudios de mecanismos de acción bactericida de las nanopartículas de plata. Evidencia directa (D) e indirecta (I) del mecanismo de acción.*

Mecanismo de acción	Cepa bacteriana	Tamaño NPs (nm)	Recubrimiento	Medio	Técnica analítica	Evidencias		Ref.
Partícula	*E. coli*	12	-	LB	TEM/EDS	NPs adsorbidas a la pared bacteriana y en el interior de la bacteria	D	[253]
	E. coli	10 56 72	BPEI Citrato PVP	Agua	Centrifugación (3150 g, 30 min) + GF-AAS	Liberación de iones plata por oxidación de NPs. La plata (I) liberada de las NPs es menor que la CIM de los iones plata.	I	[313]
	E. coli *S. aureus*	7	Glutatión	PBS	Diálisis (*Cut-off*: 3 kDa) + ICP-OES	Liberación de iones plata por oxidación de NPs. La plata(I) liberada de las NPs es menor que la CIM de los iones plata.	I	[314]
	Bacillus sp.	58 19 12 10	Hidrógeno Citrato PVP BPEI	Medio original de las NPs*	Conductividad	Conductividad constante a lo largo del tiempo. Mínima disolución de AgNPs.	I	[279]
				Medio DBO ($MgSO_4$, $CaCl_2$ y $FeCl_3$)	TEM	Interacción NPs con pared bacteriana	D	
					DLS	No agregación en el medio	I	

Combinado ion-partícula	*E. coli*	9 - 44 18 23	Citrato PVP BPEI	LB	DLS	Aumento tamaños NPs en presencia de medio de cultivo tras 24 h	I	[272]
					UV-visible	Disminución de la altura de las señales indica disolución de NPs	I	
					Ultracentrifugación (21.000 g, 1 h) + GF-AAS	Liberación de iones plata por oxidación de NPs	I	
					Bioluminiscencia	Determinación de Ag^+ intracelular en bacterias	D	
					AFM/TEM	Observación de NPs adsorbidas a la pared bacteriana. No se observaron NPs internalizadas.	D	
	E. coli	140	-	LB (sin NaCl)	Ultracentrifugación (50.000 g, 10 min) + ICP-MS	Liberación de iones plata por oxidación de NPs	I	[117]
					TEM	NPs asociadas a la pared bacteriana y NPs en el citosol	D	
	E. coli	24	PEGSH	LB, MH	Ultracentrifugación (20.000 g, 20 min) + ICP-MS	Liberación de iones plata por oxidación de NPs	I	[315]
					TEM/ DLS	NPs estables tras la incubación. Mantienen el tamaño original.	D	
					RMN	No adsorción de los componentes del medio con las NPs. Disminución de la densidad de PEGSH en la superficie de las NPs.	I	

Combinado ion-partícula	*E. coli*	10	Citrato MPA MHA MPS	$NaHCO_3$	Ultrafiltración (*Cut-off:* 3 kDa) + ICP- MS	Liberación de iones plata por oxidación de NPs	I	[292]
					Rayos X	Liberación de iones de las NPs depende del recubrimiento	I	
					SEM	Cambios estructurales en las bacterias	D	
					Lisis + ICP-MS	Biodistribución de la plata: más plata intracelular que en la membrana. La plata se adsorbe en la pared bacteriana y se internaliza.	D	
	E. coli *Bacillus sp.*	45	Citrato	LB	Filtración (filtro de 0,025 µm) + ICP- MS	Liberación de iones plata por oxidación de NPs	I	[316]
					FESEM	Adsorción de NPs en la pared bacteriana	D	
	E. coli *Pseudomonas fluorescens*	10 - 80	Citrato	Agua	Ultracentrifugación (390.000 g, 30 min. Eliminación de AgNPs y complejos Ag-proteínas > 5kDa) + GF-AAS	Liberación de iones plata por oxidación de NPs	I	[273]
					Bioluminiscencia	Determinación de Ag^+ intracelular en bacterias	D	
	Vibrio fischeri	20 200	-	NaCl	Ultrafiltración (*Cut-off:* 3 kDa) + ICP- MS	Liberación de iones plata por oxidación de NPs	I	[317]
					DLS	Agregación NPs en los medios	D	

Combinado ion-partícula	*Synechococcus*	20 40 100	Maltosa	Agua dulce	Diálisis + ICP-MS	Liberación de iones plata por oxidación de NPs	I	[318]
					Sedimentación por centrifugación de partículas	Agregación de tamaños en el medio	I	
	E. coli	<100	-	NaCl	Bioluminiscencia	Aniones superóxidos en el interior de bacterias. Liberación de iones plata por oxidación de NPs	D	[319]
	E. coli *V. cholera* *P. aeruginosa* *S. typhus*	16	-	LB	HAADF/STEM TEM	NPs adsorbidas a la pared bacteriana y en el interior de la bacteria.	D	[264]
				$NaNO_3$*	Voltametría	Liberación de iones plata por oxidación de NPs	D	
	E. coli	35	Carbono amorfo	Medio original de las NPs*	Ultrafiltración (*Cut-off:* 10 kDa) + ICP- MS	Cuantificación de Ag^+ (disolución de NPs). Estudio de toxicidad en condiciones anaerobias y aerobias	I	[320]
Ion	*E. coli*	3 - 11 18 - 70	PEG PVP	$NaHCO_3$	Ultrafiltración (*Cut-off:* 10 kDa) + ICP- MS	Cuantificación de Ag^+ (disolución de NPs). Estudio de toxicidad en condiciones anaerobias y aerobias	I	[321]
	E. coli	80 100	Citrato	Agua	Ultracentrifugación (390.000 g, 45 min) + GF-AAS	Liberación de iones plata por oxidación de NPs	I	[322]
					Luminiscencia y ensayos de viabilidad	Misma toxicidad en ensayo con NPs que con Ag(I). Al eliminar la fracción de NPs no disminuye la toxicidad.		

Ion	*Shewanella oneidensis*	11	Citrato	Medio de citrato férrico (presencia y ausencia de bacterias)	Electrodo selectivo de Ag^+	Liberación de iones plata por oxidación de NPs. Menor liberación de iones en presencia de bacterias.	D	[323]
					Centrifugación (4000 g, 10 min) + ICP-MS	Liberación de iones plata por oxidación de NPs	I	
					DLS	Agregación de NPs en el medio de citrato férrico	I	
					TEM	No cambios en morfología de bacterias. NPs cerca de la membrana, pero no internalizadas.	D	
	Nitrosomonas europaea	20 80	Fosfato	Tampón HEPES y $(NH_4)_2SO_4$	Ultrafiltración (*Cut-off:* 5 kDa) + ICP-OES	Liberación de iones plata por oxidación de NPs	I	[324]
					DLS	Agregación NPs en el medio	I	
	E. coli *S. aureus*	6	Ligandos mercapto	Agua	Conductividad	Liberación de iones plata por oxidación de NPs	I	[325]
					TEM	Interacción Ag(I) con bacterias, depósitos de ion plata reducido en el interior de bacterias	D	

					Ultrafiltración (*Cut-off*: 3 kDa) + ICP- MS	Liberación de iones plata por oxidación de NPs	I	
Ion	*Nitrosomonas europaea*	20 - 25	Citrato PVP GA	Medio AOB	DLS	Agregación NPs en el medio	I	[326]
					TEM	Daño en las membranas para algunas concentraciones de NPs y recubrimiento	D	

*Medio de estudio diferente al medio de cultivo

La interacción de las nanopartículas con las bacterias, en distintos medios de cultivo, se ha demostrado tras la observación directa de la presencia de nanopartículas (10 - 140 nm) por técnicas como TEM, FESEM, AFM, HAADF/STEM y EDS [253,264,272,279,316,323,327]. La mayoría de estos autores observaron que las nanopartículas se encontraban adsorbidas en la pared bacteriana [253,264,272,279,316,327]. Una parte de ellos también observaron nanopartículas en el interior del citoplasma [253,264,327], mientras que otros no observaron nanopartículas internalizadas [272,323]. Debido a estas observaciones, Sondi *et al*. concluyeron que el mecanismo de acción de las nanopartículas de 12 nm estaba asociado a la partícula. Sin embargo, no estudiaron la posible disolución de las nanopartículas y la presencia de plata disuelta, por lo que el estudio podría considerarse incompleto [253]. Asimismo, El Badawy *et al*. también justificaron un mecanismo asociado a las partículas debido a que, a partir de medidas de conductividad, consideraron que la oxidación de las nanopartículas era mínima, por lo que asociaron el efecto bactericida a las nanopartículas. Aparte de la baja sensibilidad de la conductimetría, las medidas no se realizaron en el medio de incubación, por lo que el estudio no sería totalmente representativo del comportamiento de las nanopartículas en medios microbiológicos [279] y las conclusiones no podrían considerarse definitivas.

Por lo que se refiere a otros métodos utilizados para la determinación de plata (I), otros autores han utilizado la voltametría [264] y la potenciometría con electrodos selectivos de iones plata [323]. En el primer caso, los autores observaron la presencia de un pico correspondiente con plata disuelta liberada de las nanopartículas, a concentraciones micromolares. Sin embargo, el medio utilizado no fue el de incubación de las bacterias [264], por lo que los resultados no fueron representativos de las condiciones de cultivo. Asimismo, incubaron unas bacterias *E. coli* con plata (I) y con nanopartículas de plata en medio LB y observaron que, en el caso de la incubación con plata (I), los iones produjeron la formación de una región de baja densidad molecular en el centro de la bacteria como consecuencia de que las bacterias agrupan su ADN como mecanismo de defensa. Por el contrario, en presencia de nanopartículas, no se observó ese ADN aglomerado a pesar de haber observado nanopartículas en el interior de la bacteria. El mecanismo propuesto por estos autores fue el combinado ion-partícula debido a la presencia de iones plata por la liberación de la nanopartículas y de las propias nanopartículas, las cuales se observaron adsorbidas en la pared y en el interior de la bacteria. [264]. El estudio de potenciometría con electrodos selectivos de iones plata [323] se comentará más adelante. Otro método directo para estudiar la presencia de iones plata en el interior de las bacterias ha sido la bioluminiscencia [272,273,319,322]. Para ello, los autores

analizaron bacterias recombinantes bioluminiscentes, las cuales en presencia de iones plata generan una bioluminiscencia por la unión de éstos con unas proteínas específicas. Este método permite detectar solamente los iones plata intracelulares debido a que estos iones se enlazan a los residuos de cisteína presentes en el interior de las bacterias. Estos estudios se analizarán con más detalle posteriormente.

Alternativamente, la plata (I) procedente de la oxidación de las nanopartículas se ha determinado indirectamente mediante ICP-MS o ICP-OES después de separar las nanopartículas y la fracción disuelta por ultracentrifugación [315,327], centrifugación [313,323], ultrafiltración [292,316,317,320,321,324,326] o diálisis [314,318]. Asimismo, otros autores utilizaron la técnica de espectrometría de absorción atómica junto a un paso previo de ultracentrifugación de las nanopartículas [272,273,313,322,328]. Hay que destacar que, en los estudios en los que se separó la fracción de plata disuelta de las nanopartículas mediante ultrafiltración o diálisis, el proceso de oxidación de las nanopartículas se estudió únicamente en agua [272,273,318,322] o en diversos medios salinos ($NaHCO_3$ [292,321], NaCl [317], PBS [314] u otros [320,324,326]). Por el contrario, aquellos estudios en los que la disolución se estudió en medios de cultivo como LB o MH [272,315,316,327], la separación se llevó a cabo mediante ultracentrifugación o filtración. Otro método indirecto utilizado para cuantificar la oxidación de las nanopartículas fue la espectrometría de absorción ultravioleta-visible [272]o mediante la medida de la conductividad [279,325].

Es destacable que, solamente Maurer-Jones *et al*. estudiaron la disolución de las nanopartículas de 11 nm en el medio de incubación y en presencia de microorganismos mediante la determinación de iones plata utilizando un electrodo selectivo de estos iones, y determinaron que en presencia de las bacterias la liberación de iones era menor que en su ausencia. Estos autores sugirieron un mecanismo de acción asociado a los iones debido a que observaron diferencias en la toxicidad causada por la Ag(I) y por las nanopartículas, y tras la detección de iones plata liberados de las mismas, determinaron que los iones eran los principales responsables de la toxicidad de las nanopartículas [323]. Este caso sería uno de los más representativos, ya que tanto la presencia de microorganismo como los medios de cultivo pueden alterar las condiciones y el comportamiento de las nanopartículas (agregación, adsorción a la membrana de los microorganismos…) [324]. Asimismo, los estudios de bioluminiscencia también confirmaron la presencia de iones plata intracelular en presencia de las propias bacterias luminiscentes en el medio de incubación (LB, NaCl o agua). Estos autores consideraron el mecanismo de toxicidad combinado ion-partícula, sugiriendo que aunque la toxicidad está producida principalmente por la acción de los iones, ésta depende de las propiedades

fisicoquímicas de las nanopartículas [272,273,319]. En el caso del estudio de Visnapuu *et al*., estos autores sugirieron un mecanismo asociado a iones debido a que observaron la misma toxicidad en ensayos con Ag(I) y con nanopartículas, y esta toxicidad no disminuyó al eliminar la fracción de nanopartículas, lo que indicaba que la toxicidad estaba mediada por los iones liberados de las mismas [322]. Estos autores utilizaron métodos indirectos basados en ultracentrifugación y espectrometría de absorción atómica para cuantificar la liberación de iones por la oxidación de las nanopartículas en el medio de incubación de los microorganismos [57,58,121], que permitieron corroborar la presencia de iones plata liberados de las nanopartículas en los medios de cultivo. Adicionalmente, Ivask *et al*. cuantificaron la oxidación de las nanopartículas mediante espectrometría de absorción ultravioleta-visible mediante la disminución de la absorbancia de la banda del plasmón de las nanopartículas [272]. Estos autores justificaron un mecanismo de toxicidad asociado al combinado ion-partícula, debido a que mediante AFM/TEM observaron nanopartículas adsorbidas en la pared bacteriana, como se ha comentado previamente [272].

Asimismo, otros autores también determinaron la liberación de iones plata por la oxidación de las nanopartículas (24 - 140 nm) en medios de cultivo biológicos como LB o MH, en ausencia de las bacterias [315,316,327]. En dos de estos estudios llevaron a cabo un paso previo de ultracentrifugación, en condiciones de 50.000 y 20.000 g, para asegurar la separación eficiente de la fracción de nanopartículas y de los iones plata [315,327]. Estos autores sugirieron un mecanismo de toxicidad combinado ion-partícula debido a que las propiedades de las nanopartículas afectan a la liberación de iones plata, los cuales son detectados mediante técnicas de ICP-MS [315,327]. Por otro lado, Doody *et al*. realizaron una filtración previa y detectaron los iones plata liberados por ICP-MS. En este caso, parte de los iones liberados podrían estar formando complejos con el medio biológico y quedarse retenidos en el filtro de 25 nm, por lo que se subestimaría la concentración de iones liberados. De cualquier manera, estos autores confirmaron la liberación de iones plata por la oxidación de las nanopartículas, y sugirieron un mecanismo combinado ion-partícula, ya que mediante FESEM observaron la adsorción de nanopartículas en la pared bacteriana [316].

Por otro lado, existen estudios en los que se ha determinado la liberación de iones plata por la oxidación de las nanopartículas en medios salinos como agua, PBS, $NaHCO_3$ o NaCl, entre otros, en ausencia de bacterias [292,314,317,318,320,321,324,326]. Aunque estos medios son los que se han utilizado también en los estudios de toxicidad de las nanopartículas frente a los microorganismos, no son representativos de los procesos que sufren las

nanopartículas en un ensayo microbiológico convencional, ya que como se ha demostrado a lo largo de este capítulo, la presencia del medio de cultivo afecta a las propiedades de las nanopartículas, como su agregación o disolución. En estos estudios, la separación previa más utilizada ha sido la ultrafiltración, con la que eliminaban las nanopartículas y los complejos de Ag-proteínas mayores de 3 - 10 kDa [292,317,321,324,326], mientras que otros pasos previos utilizados han sido la diálisis [314,318] o la centrifugación [313]. Tanto en el estudio de Amato *et al*. [314] como en el de Silva *et al*. [313], los autores sugirieron un mecanismo de toxicidad asociado a las partículas debido a que la concentración de iones liberados de las nanopartículas era menor que la CIM correspondiente a la toxicidad de la Ag(I), lo que indicada que las nanopartículas eran las responsables del efecto bactericida. Sin embargo, esta concentración de iones podría estar subestimada debido a que las condiciones de centrifugación y de diálisis utilizadas podrían no separar eficientemente la fracción de las nanopartículas y la de los iones plata. Esto se justificaría debido a que la fuerza de centrifugación era muy baja en el primer caso [313], mientras que, en el segundo, la presencia de PBS podría afectar a la cuantificación de la plata [314], como se observó en ensayos previos realizados durante esta Tesis Doctoral. Por el contrario, tres de los estudios citados previamente [321,324,326], sugirieron mecanismos de toxicidad de nanopartículas (3 - 80 nm) asociados a los iones liberados a partir de las mismas. Xiu *et al*. cuantificaron estos iones en condiciones aerobias y compararon la toxicidad de las nanopartículas en condiciones anaerobias y aerobias. En condiciones anaerobias, donde no se liberaban iones plata, las nanopartículas no afectaban significativamente a las bacterias, mientras que, en condiciones aerobias, los efectos bactericidas fueron mayores, lo que indicaba que la toxicidad de las nanopartículas estaba asociada a la presencia de iones, la cual, a su vez, era dependiente de la presencia de oxígeno [321]. Por otro lado, en el resto de los trabajos que estudiaron la liberación de iones en medio salinos [292,317,318], se sugirió un mecanismo combinado ion-partícula.

Por último, en la Tabla 3.1.8 se recogen ciertos estudios en los que la disolución de las nanopartículas se determinó en medios distintos de los medios de incubación de las bacterias [264,279,320], los cuales no serían representativos de los procesos que sufren las nanopartículas en un ensayo microbiológico.

En el estudio realizado a lo largo de este Capítulo 3.1 de la Tesis Doctoral se ha desarrollado una estrategia basada en distintas técnicas analíticas que permiten la detección y cuantificación de las nanopartículas de plata y los iones liberados mediante procedimientos directos que no requieren procesos previos de separación, como SP-ICP-MS o HDC-ICP-MS. Por un lado, estos ensayos han permitido la

detección e identificación directa de las distintas especies de plata resultantes de un proceso de incubación en el medio de cultivo. Por otro lado, las técnicas de SP-ICP-MS y HDC-ICP-MS en combinación con la digestión alcalina con TMAH, han permitido detectar e identificar de forma directa las distintas especies de plata que habían interaccionado con las bacterias y se habían internalizado o adsorbido en su pared tras el proceso de incubación. Adicionalmente, mediante la técnica de SC-ICP-MS se ha demostrado la presencia de biopartículas que contienen plata. La limitación de la técnica no permite determinar la biodistribución de la plata, por lo que no se puede concluir si la plata está internalizada o adsorbida en la pared.

Al analizar los resultados obtenidos experimentalmente a lo largo de este capítulo para los dos tamaños de nanopartículas expuestas a bacterias, se determinó que la actividad bactericida de las nanopartículas de 10 nm se puede asociar al mecanismo combinado ion-partícula. Este mecanismo se justifica a través de los análisis en el medio de cultivo mediante SP-ICP-MS y HDC-ICP-MS (Apartado 3.1.3.2), donde se demostró que en el medio de cultivo las nanopartículas se encuentran en su estado original, sin detectarse la presencia de iones plata, lo que indicaba que las nanopartículas no se oxidaban. El tamaño de estas nanopartículas favorece el contacto con las bacterias, lo que podría producir la alteración de la membrana y favorecer la adsorción de las nanopartículas en la pared y/o su entrada al interior de las bacterias. Esto se confirmó a partir de los resultados obtenidos tras someter a las bacterias a digestión alcalina y analizar las digestiones mediante SP-ICP-MS y HDC-ICP-MS (Apartados 3.1.3.5.2 y 3.1.3.5.3) donde se detectó la presencia de nanopartículas de 10 nm. Además, se detectaron iones plata como plata disuelta mediante HDC-ICP-MS en las bacterias sometidas a digestión alcalina (Apartado 3.1.3.5.3). Esta plata disuelta procedería de la oxidación de nanopartículas internalizadas o adsorbidas, de manera que en este último caso la plata iónica se internalizaría a través de las porinas de la membrana de las bacterias o de la membrana alterada. Estos resultados están de acuerdo con la bibliografía [258,264,272–274,292], donde los autores proporcionan una serie de evidencias analíticas que corroboran la interacción de las nanopartículas con la superficie de las bacterias mediante microscopía electrónica o la presencia de plata (I) en las bacterias mediante técnicas de ICP-MS.

En el caso de las nanopartículas de plata de 60 nm, éstas actuarían solamente a través del mecanismo asociado a los iones. El análisis del medio de cultivo por SP-ICP-MS y HDC-ICP-MS (Apartado 3.1.3.2) confirmó la presencia de iones plata y de nanopartículas, tras ser incubadas en el medio de cultivo. Además, al analizar mediante SP-ICP-MS las bacterias incubadas con dichas nanopartículas y digeridas con TMAH (Apartado 3.1.3.5.2), se comprobó la ausencia de nanopartículas de plata

de 60 nm, lo que indicaba que las nanopartículas no se habían adsorbido significativamente ni internalizado en las bacterias debido a su tamaño, lo cual está de acuerdo con la bibliografía [258,272–274]. Por otro lado, la presencia de bacterias que contenían plata se detectó mediante SC-ICP-MS (Apartado 3.1.3.5.1), lo que indicaba que las bacterias habían captado plata, la cual estaría en forma iónica y procedería de la oxidación parcial de las nanopartículas, lo que justificaría el mecanismo asociado a los iones.

3.1.4. CONCLUSIONES

Como paso previo al trabajo con nanopartículas de plata y bacterias se han estudiado distintos medios de cultivo y las condiciones de incubación con el objetivo de prevenir la agregación de las nanopartículas a lo largo del proceso de incubación, ya que influye en la capacidad bactericida de las mismas. El medio de incubación seleccionado como óptimo fue el Mueller-Hinton con 2% de Tween 80 como surfactante.

Al evaluar la actividad bactericida de la plata (I) y de nanopartículas de plata de distinto tamaño, se ha demostrado que la plata (I) presentó mayores efectos bacteriostáticos que las nanopartículas de 60 nm estabilizadas con citrato frente a *E. coli ATCC* 25922 y *E. coli* J62 y, que las nanopartículas de 10 nm estabilizadas con citrato frente a *E. coli ATCC* 25922. En el caso de los efectos bactericidas, éstos fueron mayores con la plata (I) que con las nanopartículas frente a ambas bacterias.

El uso de una plataforma analítica basada en SC-ICP-MS, SP-ICP-MS y HDC-ICP-MS ha permitido detectar la presencia de bacterias que contienen plata, así como detectar e identificar las especies de plata presentes en bacterias expuestas a plata (I) y nanopartículas de plata. Esto ha permitido validar los mecanismos de acción relacionados con la acción bactericida de las nanopartículas de plata. En el caso de las nanopartículas de plata de 10 nm, su actividad bactericida se puede asociar al mecanismo combinado ion-partícula. Este mecanismo se justifica tras la demostración de que las nanopartículas se encuentran en su estado original en el medio de cultivo, sin observarse la presencia de iones plata, lo que indica que las nanopartículas no se oxidaban. El tamaño de estas nanopartículas favorece el contacto con las bacterias, lo que podría producir la alteración de la membrana y favorecer su adsorción en la pared y/o su entrada al interior de las bacterias, lo que se ha justificado por la presencia de nanopartículas de 10 nm detectadas tras la digestión alcalina de las bacterias. Este contacto de las nanopartículas con las bacterias podría producir la oxidación de las nanopartículas adsorbidas o internalizadas, justificando la presencia de iones plata asociados a las bacterias.

La actividad bactericida de las nanopartículas de plata de 60 nm se relacionó únicamente al mecanismo asociado a los iones. Este mecanismo se justificó tras confirmar la presencia de iones plata y de nanopartículas tras la incubación. El análisis de las bacterias digeridas con TMAH confirmó la ausencia de nanopartículas de plata de 60 nm, lo que indicaba que éstas no habían sido captadas por las bacterias, y, por tanto, los responsables de la actividad bactericida serían los iones.

3.2. EFECTO BACTERICIDA DE LAS ESPECIES DE PLATA EN COMBINACIÓN CON ANTIBIÓTICOS CONVENCIONALES

3.2.1. INTRODUCCIÓN

Una alternativa para combatir la resistencia a antimicrobianos es la combinación de nanopartículas con antibióticos convencionales debido al amplio espectro de propiedades antimicóticas, antiinflamatorias y antiangiogénicas de las nanopartículas. Existen numerosos estudios que han investigado la eficacia bactericida de las combinaciones antibiótico-nanopartícula, siendo las más comunes aquellas con nanopartículas de plata [42]. Uno de los primeros estudios fue llevado a cabo por Li *et al*. en 2005, quienes estudiaron la combinación de amoxicilina con nanopartículas de plata frente a bacterias *E. coli*, y demostraron que los antimicrobianos por separado tenían una baja actividad bactericida, mientras que en combinación producían una reducción significativa del crecimiento bacteriano [61]. Shahverdi *et al*. combinaron nanopartículas de plata con 14 antibióticos de distintos grupos como β-lactámicos (penicilina G, amoxicilina, cefalosporinas), aminoglucósidos (gentamicina, eritromicina, amikacina), tetraciclinas, quinolonas (ácido nalidíxico) o glucopéptidos (vancomicina) frente a bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Los resultados mostraron un aumento de la acción bactericida de cinco de ellos en presencia de nanopartículas de plata frente a *E. coli* y *Staphylococcus aureus* [45]. Estudios similares con nanopartículas de plata en combinación con antibióticos con distintos mecanismos de acción (β-lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, glucopéptidos, cloranfenicol, tetraciclina, quinolonas, polimixina, rifampicina…) frente a diferentes bacterias (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa)*, *Enterobacter cloacae*, *Clostridium difficil*…) corroboraron el aumento del efecto bactericida e inhibición del crecimiento bacteriano [46,47,49,51,52,228,231,232,329–332].

Ciertos autores que han estudiado la actividad combinada de diferentes antibióticos con iones plata y nanopartículas de plata sugirieron los mecanismos de acción asociados a esta actividad combinada. Las combinaciones más estudiadas en la bibliografía son con antibióticos β-lactámicos y aminoglucósidos [45,46,61,228,231,232]. En primer lugar, es necesario conocer los mecanismos de acción de la actividad bactericida individual de cada antimicrobiano. Los mecanismos de los iones plata y de las nanopartículas de plata se desarrollaron en el Capítulo 3.1.

Los β-lactámicos son un grupo de antibióticos cuyo nombre deriva de la presencia de un anillo lactámico en su estructura, con un oxígeno en posición β con respecto a un nitrógeno. En función de los radicales que se unen a este anillo se distinguen varios subgrupos como penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactamas e inhibidores de las betalactamasas (Figura 3.2.1). El espectro de acción abarca las bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y espiroquetas. Los β-lactámicos son compuestos bactericidas que inhiben las fases finales de la síntesis del peptidoglucano mediante la inactivación de unas enzimas conocidas como proteínas de unión a la penicilina (PBP). La inhibición de la enzima transpeptidasa produce la formación de esferoplastos y su lisis. La inhibición de otras PBP puede producir formas ovoideas de la pared que se lisan fácilmente, formas filamentosas largas de la bacteria o inhibir la polimerización del peptidoglucano. Además, la acción bactericida de los β-lactámicos también está relacionada con la activación de las enzimas autolisinas que están implicadas en la degradación del peptidoglucano [37,236,237].

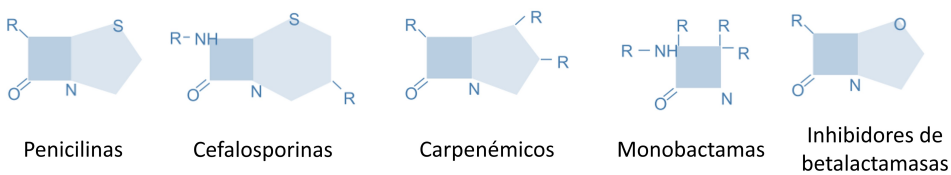


Figura 3.2.1. *Estructura química de los antibióticos β-lactámicos (adaptado de Suárez* et al*.* [236]*).*

La resistencia a los β-lactámicos se desarrolla mediante tres mecanismos diferentes. El primero viene asociado a la producción de unas enzimas betalactamasas, especialmente en bacterias Gram-negativas, las cuales hidrolizan el anillo betalactámico e inactivan el antibiótico antes de su unión con las PBP. Otro mecanismo, especialmente en bacterias Gram-positivas, es la modificación de la diana en las PBP debido a alteraciones de estas proteínas como mutaciones, hiperexpresión y modificación de la afinidad. El último mecanismo viene dado por las bombas de expulsión de antibióticos de las bacterias Gram-negativas. Algunos microorganismos como *P. aeruginosa* presentan unos sistemas de bombeo de antibióticos muy eficaces, que determinan su resistencia intrínseca a muchos antibióticos, incluidos algunos de los betalactámicos [236,237].

Li *et al*. propusieron el mecanismo de sinergia asociado a la actividad combinada de nanopartículas de plata de 20 nm y amoxicilina (grupo de las penicilinas) frente a bacterias *E. coli* [61]. Las moléculas de amoxicilina contienen grupos activos como grupos hidroxilo y amida, los cuales reaccionarían rápidamente con las nanopartículas por quelación y formarían una estructura formada por un núcleo de plata rodeado de moléculas de amoxicilina. Así, cuando los grupos de antimicrobianos actúan en un punto de la superficie de la bacteria podrían causar una mayor destrucción al aumentar la concentración de antimicrobianos. Duran *et al*. propusieron que los puentes sulfuro de la molécula de amoxicilina son los sitios de unión más probables con las nanopartículas de plata [333]. Además, Li *et al*. sugirieron que el mecanismo más probable de los efectos sinérgicos podía ser debido a que las nanopartículas de plata actúan como portadores del antibiótico. A diferencia de la amoxicilina que es hidrófila, las nanopartículas de plata son moléculas hidrofóbicas, por lo que son capaces de interactuar con la membrana compuesta por grupos hidrofóbicos, y con esto, facilitar el transporte de la amoxicilina a la superficie bacteriana [61]. Por tanto, estas situaciones favorecen la acción de la amoxicilina, lo que conlleva la rotura de la pared celular y un aumento de la permeabilidad, y esto a su vez, favorece la entrada de las nanopartículas de plata y/o de los iones plata, procedentes de la oxidación de las nanopartículas, y la activación de los mecanismos asociados a la plata. Fayaz *et al*. propusieron los mismos mecanismos de sinergia tras combinar nanopartículas de plata con ampicilina, otro antibiótico del grupo de las penicilinas [46]. Estos mecanismos sinérgicos se recogen en la Figura 3.2.2.

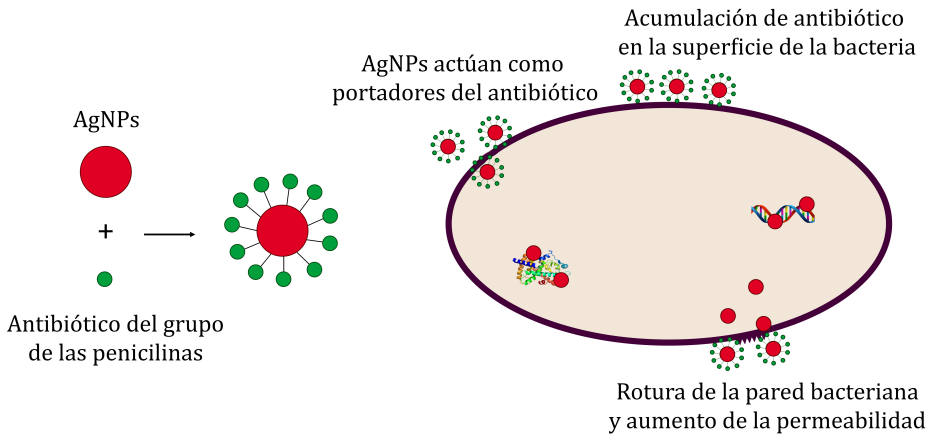


Figura 3.2.2*. Mecanismos de sinergia por la combinación de nanopartículas de plata y antibióticos del grupo de las penicilinas (adaptado de Allahverdiyev* et al. [42]*).*

Por su parte, los aminoglucósidos son un grupo de antibióticos bactericidas cuya estructura se compone de aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un alcohol cíclico hexagonal con grupos amino (aminociclitol). El componente aminociclitol puede ser estreptidina o 2-desoxiestreptamina. El primer caso se encuentra en el antibiótico estreptomicina, mientras que el resto de los aminoglucósidos se engloban en la segunda situación, entre los que se encuentran kanamicina, tobramicina, gentamicina, neomicina y apramicina, entre otros. La apramicina es un aminoglucósido estructuralmente único caracterizado por un anillo 2-desoxiestreptamina mono sustituido por una inusual molécula bicíclica [334], como se observa en la Figura 3.2.3.

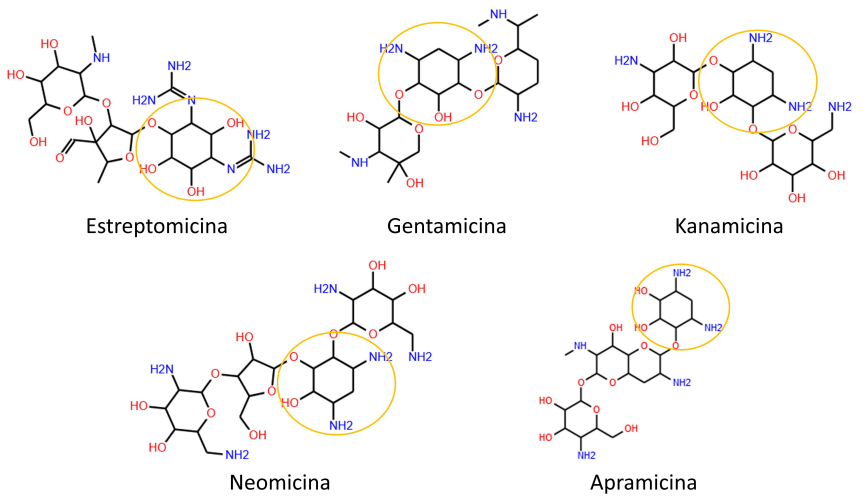


Figura 3.2.3. *Estructura química de los antibióticos aminoglucósidos. El círculo amarillo señala el anillo aminociclitol.*

El espectro de acción de los aminoglucósidos abarca fundamentalmente las bacterias Gram-negativas aerobias y micobacterias. La diana de los aminoglucósidos es la subunidad ribosomal 30S e inducen la incorporación errónea de aminoácidos [335]. Los aminoglucósidos son antibióticos catiónicos que se unen electrostáticamente a la membrana externa de las bacterias cargada negativamente. En las bacterias Gram-negativas, los sitios de unión en la membrana externa incluyen los lipopolisacáridos, las cabezas polares de fosfolípidos y las proteínas de membrana; mientras que en las bacterias Gram-positivas la carga negativa la aportan los ácidos teicoicos unidos al peptidoglucano [37]. En consecuencia, se desplazan los

iones magnesio y calcio que se enlazan a moléculas de lipopolisacáridos adyacentes, lo que produce la desestructura de la membrana externa y permite el paso de los aminoglucósidos. Otro mecanismo de entrada en el caso de bacterias Gram-negativas es mediante los canales de porinas. Una vez en el espacio periplásmico, estos antibióticos necesitan ser transportados hasta la membrana citoplasmática para llegar a su diana y esto es un proceso dependiente de la energía generada por el transporte de electrones. Esta captación se puede describir en dos fases. La fase I (EDP-I) dependiente de la fuerza motriz de los protones permite que los aminoglucósidos lleguen al citosol y actúen sobre los ribosomas produciendo errores en la lectura del ARN mensajero. La duración y la velocidad de captación de aminoglucósidos durante esta fase es dependiente de la concentración de aminoglucósidos. Esta fase puede suprimirse por completo utilizando altas concentraciones de aminoglucósido. En la fase II (EDP-II) los ribosomas inhibidos liberan proteínas dañadas o mal plegadas que se incorporan y alteran la organización de la membrana, y como consecuencia de esto, se produce una masiva entrada de aminoglucósidos que detienen irreversiblemente la síntesis de proteínas [37,228,232,336].

Algunas especies bacterianas, como los anaerobios y enterococos, presentan resistencia intrínseca a los aminoglucósidos debido a un transporte deficitario a través de la membrana bacteriana [335]. La resistencia adquirida se desarrolla mediante cuatro mecanismos diferentes. Los más frecuentes son por la modificación enzimática del aminoglucósido o por la producción de enzimas que los inactivan (acetiltransferasas, adeniltransferasas y fosfotransferasas). Los otros mecanismos se deben a la disminución de la concentración intracelular del antibiótico mediante la alteración de la difusión al interior de la bacteria, el secuestro citoplasmático del antibiótico o por bombas de extracción activa de aminoglucósidos; o a la mutación de la subunidad ribosómica 30S [335,337]. La apramicina es capaz de eludir casi todos los mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos, excepto el de la inactivación por la enzima acetiltransferasa [334,338]. A pesar de que la apramicina es un antibiótico ampliamente usado en veterinaria, esta característica única hace que la apramicina sea particularmente atractiva como un candidato a antibióticos de nueva generación para uso clínico en humanos y luchar contra la resistencia a antimicrobianos [334,339].

Respecto a los mecanismos de sinergia por la combinación de aminoglucósidos con iones plata, Herisse *et al*. sugirieron que la plata desestabiliza mediante la alteración de la permeabilidad o ruptura de la membrana permitiendo que los aminoglucósidos entren al citosol más fácilmente. Esta contribución no es suficiente

para que los aminoglucósidos entren masivamente al citosol, por lo que sugirieron que otra contribución adicional sería mediante la actuación directa de la plata sobre los ribosomas. Esta inhibición de los ribosomas produce la liberación de proteínas dañadas o mal plegadas que se dirigen a la membrana, como en la fase II del mecanismo de los aminoglucósidos. Esta alteración en la organización de la membrana facilita la entrada de más aminoglucósidos [232]. Este mecanismo concuerda con los resultados obtenidos por Morones *et al*. [228,231]. Por otro lado, Herisse *et al*. sugirieron que la formación de ROS no juega un papel principal en la potenciación de los efectos por la plata [232]. En la Figura 3.2.4 se recogen los mecanismos de esta sinergia, así como los de la acción individual de los aminoglucósidos.

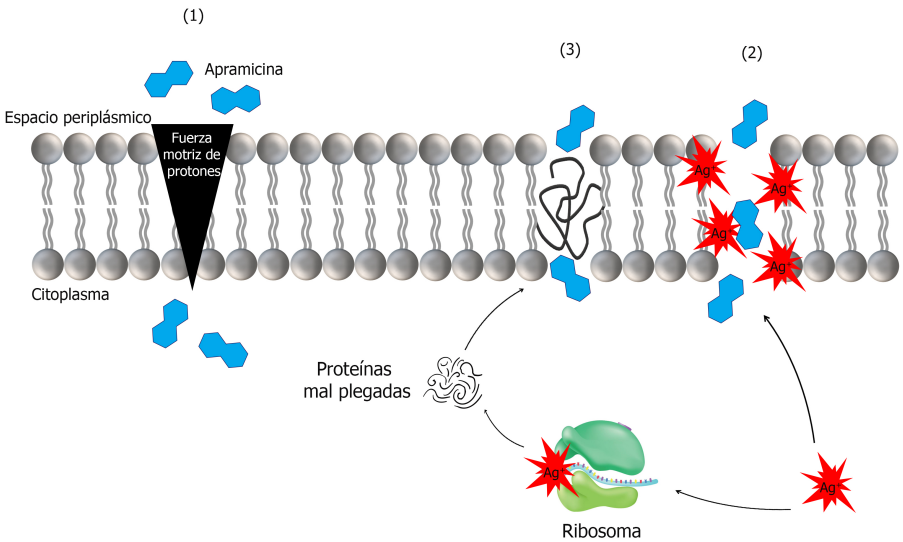


Figura 3.2.4. *Mecanismos de acción de los aminoglucósidos (1) y mecanismos de sinergia por la combinación de plata y aminoglucósidos (2) y (3).*

En el caso de los mecanismos de sinergia por la combinación de aminoglucósidos con nanopartículas de plata, al igual que en el caso de la amoxicilina, Buszewski *et al*. sugirieron que el mecanismo más probable puede ser debido a que las nanopartículas de plata actúan como portadores de los aminoglucósidos [252]. Esto se debe a las interacciones electrostáticas entre las partículas cargadas negativamente y la región de los antibióticos cargada positivamente, y por las interacciones hidrofóbicas y la unión covalente de las nanopartículas a los grupos sulfhidrilo o amida de los antibióticos [46,48,49,59]. De

esta forma, se produce un aumento de la concentración de antibióticos en un sitio focalizado que conduce a una mayor destrucción de las bacterias. Los resultados obtenidos por Vazquez-Muñoz *et al*. indicaron que las nanopartículas de plata y la kanamicina no se enlazaban mediante enlaces covalentes, sino que lo hacían por medio de interacciones electrostáticas ya que observaron cambios en la carga superficial [59]. Deng *et al*. también demostraron mediante espectroscopía Raman y ultravioleta-visible el enlace fuerte de la kanamicina y neomicina con nanopartículas de plata, por sustitución de las moléculas de citrato de la superficie de las nanopartículas por moléculas de antibiótico para formar unos complejos apramicina-nanopartículas [329]. Por otro lado, otro mecanismo sugerido es que las nanopartículas producen una alteración de la integridad de la membrana exterior y una despolarización que favorece la entrada de los antibióticos, los cuales producen a su vez un gran daño celular, especialmente en el caso de los antibióticos con dianas intracelulares. Este daño celular se suma al daño causado por las especies de plata que también consiguen entrar en las bacterias [59,252,340]. Ali *et al*. observaron mayores efectos sinérgicos contra bacterias resistentes a los antibióticos estudiados, lo que podría explicarse por el daño causado por las nanopartículas en la pared celular, que favorece la acción de los antibióticos intracelularmente al ser capaces de entrar en las bacterias y conlleva una reversión de la capacidad de resistencia de las bacterias a los antibióticos [340]. Deng *et al*. sugirieron que la interacción entre nanopartículas de plata y varios antibióticos, entre ellos la kanamicina y neomicina, favorece el incremento de la liberación de iones plata, los cuales también incrementan el daño en las bacterias [329].

Además de los métodos microbiológicos tradicionales que se utilizan para determinar los mecanismos de sinergia asociados a las combinaciones de nanopartículas, existen técnicas analíticas que pueden corroborar los mecanismos de acción descritos previamente. Las técnicas analíticas más utilizadas por los autores son técnicas de microscopía electrónica. Como se ha comentado, el mecanismo de acción de los antibióticos aminoglucósidos está ligado, por un lado, a la alteración de la membrana externa, y por otro, a la inhibición de la síntesis de las proteínas por la unión al ribosoma bacteriano. Estas alteraciones de las membranas han sido demostradas mediante microscopía electrónica tras la exposición de *P. aeruginosa* con gentamicina [341,342]. Por el contrario, Habash *et al*. no observaron cambios estructurales mediante TEM tras la exposición individual de tobramicina, aztreonam y nanopartículas de plata frente a *P. aeruginosa*, pero sí que los observaron, además de irregularidades en la distribución de los contenidos de la membrana y desprendimiento del citosol, al combinar los antibióticos con las nanopartículas [343,344]. A su vez, Kaur *et al*. observaron mediante FESEM cambios

morfológicos y alteraciones en la pared bacteriana de *E. coli* y *Staphylococcus aureus* tras su tratamiento con vancomicina y nanopartículas de plata [332].

En la actualidad, no existen estudios sobre el papel de las especies de plata en los mecanismos de sinergia asociados a la combinación de antibióticos con nanopartículas de plata, lo cual implica poder disponer de información química sobre la biodistribución de la plata en las bacterias, así como de las distintas especies que están involucradas en dicha actividad sinérgica. En línea con el capítulo anterior, el objetivo principal de este capítulo se centra en el desarrollo y aplicación de una metodología analítica que permita la detección y cuantificación directa de especies de plata en cultivos de bacterias *E. coli* previamente incubados con antibióticos convencionales y plata (I) o nanopartículas de plata. La cepa elegida para este estudio fue *E. coli* ATCC 25922, ya que es la cepa de referencia que se ha utilizado a lo largo de esta Tesis Doctoral, mientras que las nanopartículas de plata elegidas fueron de 10 nm estabilizadas con citrato, debido a que en el Capítulo 3.1 se determinó que su efecto bactericida estaba relacionado con un mecanismo asociado al combinado ion-partícula. La finalidad de este estudio es aportar la información química necesaria para contribuir a dilucidar los mecanismos de sinergia de estos antimicrobianos y se apoya en los siguientes objetivos específicos:

- Evaluación de la actividad bactericida de los antibióticos convencionales (penicilina G y apramicina) y de las combinaciones de estos antibióticos con plata (I) o nanopartículas de plata metálica.

- Determinación de la plata total captada por bacterias incubadas con antibióticos convencionales y plata (I) o nanopartículas de plata, así como su distribución por bacteria.

- Determinación de la biodistribución (internalización vs. adsorción) de la plata en bacterias.

- Relación de las especies de plata detectadas en medios de cultivo y bacterias con los mecanismos sinérgicos asociados a la actividad bactericida combinada de los antibióticos convencionales y plata (I) o nanopartículas de plata.

3.2.2. EXPERIMENTAL

3.2.2.1. Instrumentación

Los instrumentos para la determinación de los contenidos totales de plata y para los análisis mediante SC-ICP-MS se corresponden con los anteriormente descritos en el estudio de los efectos bactericidas de las especies de plata (Apartado 3.1.2.1 del Capítulo 3.1).

La observación mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de las muestras de bacterias expuestas a antimicrobianos se realizó con un microscopio de barrido JSM 6360-LV. Para la obtención de las imágenes con mayor resolución se empleó el detector *in-lens* de electrones secundarios del mismo microscopio. Las dimensiones de las bacterias se determinaron utilizando el *software* de procesamiento de imágenes digitales ImageJ versión 1.8.0 (National Institute of Health, EE. UU.).

La observación mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las muestras de bacterias expuestas a antimicrobianos se realizó con un microscopio de transmisión JEOL 1010. Las imágenes se tomaron con una cámara Gatan Bioscan de barrido lento.

La observación mediante microscopio óptico de los esferoplastos y de las bacterias se realizó con un microscopio óptico Zeiss West Germany.

3.2.2.2. Estándares y reactivos

Lo reactivos empleados se corresponden con los anteriormente descritos en el estudio de los efectos bactericidas de las especies de plata (Apartado 3.1.2.2 del Capítulo 3.1). Además, se utilizó lisozima de clara de huevo (90%), Tris-Hidrocloruro (Tris-HCl) (99%) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (98%) (Scharlau, Scharlab. S.L., Barcelona, España) y sacarosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.). Para la preparación de las muestras para SEM y TEM se utilizó glutaraldehído (4%), tetraóxido de osmio, (Electron Microscopy Sciences, Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, Walthman, EE.UU.), resina epoxi, acetato de uranilo, citrato de plomo y etanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.); y para la tinción de Gram se utilizó cristal violeta, lugol, disolución decolorante de Gram y safranina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.). Para los cultivos microbiológicos, se utilizaron disoluciones de fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4), fosfato de sodio dibásico (Na_2PO_4) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.), sulfato de apramicina (Alfa

Aesar, Karlsruhe, Alemania), sal sódica de penicilina G (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) y discos de penicilina G Oxoid™ (Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, Walthman, EE.UU.).

3.2.2.3. Cepas bacterianas

Las cepas de bacterias Gram-negativas utilizadas fueron *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ATCC 27853 y *P. aeruginosa* PAO1. Las cepas se cultivaron en agar Mueller-Hinton a 37^0C durante 24 h, y se guardaron a -80^0C en leche desnatada estéril.

3.2.2.4. Muestras de cultivos bacterianos con plata y/o antibiótico

Las muestras de cultivos bacterianos con plata estudiadas consistieron en cepas de bacterias *Escherichia coli* ATCC 25922 incubadas previamente con Ag(I), nanopartículas de plata de 10 nm estabilizadas con citrato, apramicina o distintas combinaciones apramicina - plata. El medio de cultivo en todas las muestras fue MH + 2% Tween 80. Las concentraciones de Ag(I), nanopartículas de plata y apramicina se eligieron en función del índice de la concentración inhibitoria fraccional (CIF) y del índice de la concentración bactericida fraccional (CBF) que se determinaron experimentalmente (Apartado 3.2.3.2). Se eligieron unas combinaciones antibiótico-plata con concentraciones por debajo de aquellas que producían efectos sinérgicos con el fin de que las bacterias introdujeran o adsorbieran los antimicrobianos sin que estas cantidades ocasionaran la muerte de las mismas. Con el objetivo de estudiar si la concentración de apramicina contribuye a una mayor internalización o adsorción de las especies de plata, se estudiaron dos combinaciones de apramicina - Ag(I) y apramicina - nanopartículas, manteniendo fija la concentración de Ag(I) (0,5 mg L^{-1}) y de nanopartículas (2,0 mg L^{-1}), y variando la concentración de apramicina (0,25 y 2 mg L^{-1}).

Las distintas muestras utilizadas a lo largo del estudio fueron:

- Bacterias *E. coli* incubadas con 0,5 mg L^{-1} de Ag(I).

- Bacterias *E. coli* incubadas con 2,0 mg L^{-1} de nanopartículas de plata de 10 nm estabilizadas con citrato.

- Bacterias *E. coli* incubadas con 0,25 mg L^{-1} del antibiótico apramicina.

- Bacterias *E. coli* incubadas con 2,0 mg L^{-1} del antibiótico apramicina.

- Bacterias *E. coli* incubadas con 0,25 mg L^{-1} de apramicina y 0,5 mg L^{-1} de Ag(I).

- Bacterias *E. coli* incubadas con 2,0 mg L^{-1} de apramicina y 0,5 mg L^{-1} de Ag(I).

- Bacterias *E. coli* incubadas con 0,25 mg L^{-1} de apramicina y 2,0 mg L^{-1} de nanopartículas de plata de 10 nm estabilizadas con citrato.

- Bacterias *E. coli* incubadas con 2,0 mg L^{-1} de apramicina y 2,0 mg L^{-1} de nanopartículas de plata de 10 nm estabilizadas con citrato.

Asimismo, se contó con cultivos bacterianos de control, en los que no se añadió plata en ninguna de sus formas ni apramicina, y un control del medio de incubación.

3.2.2.5. Procedimientos

3.2.2.5.1. Preparación de las muestras

La preparación de las muestras de cultivos bacterianos y la estimación de la concentración de bacterias en las muestras se llevó a cabo siguiendo los mismos procedimientos descritos en el Apartado 3.1.2.5.1 del Capítulo 3.1.

El medio de incubación MH + 2% Tween 80 se preparó por pesada en una balanza analítica GH-200 (A&D, California, EE.UU.) con una precisión de ± 0,1 mg, se añadió el surfactante Tween 80 hasta conseguir una concentración final del 2% y se disolvieron en agua destilada. El medio final se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121^{0}C y 1 atmósfera. Se guardaron a 4^{0}C hasta su uso.

3.2.2.5.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y de la concentración bactericida mínima (CBM)

Para la determinación de la CIM y de la CBM se aplicó el mismo procedimiento descrito en el Apartado 3.1.2.5.5 del Capítulo 3.1.

El rango de concentraciones de antimicrobianos estudiadas frente a *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *P. aeruginosa* PAO1 en la determinación de la CIM fueron:

- Ag(I): 0,0625 - 64 mg L^{-1}

- Nanopartículas de plata de 10 nm estabilizadas con citrato: 0,0625 - 16 mg L^{-1}

- Apramicina: 4 - 1024 mg L^{-1}

- Penicilina G: 0,125 - 64 mg L^{-1}

3.2.2.5.3. Determinación de la actividad bactericida de las combinaciones de antimicrobianos

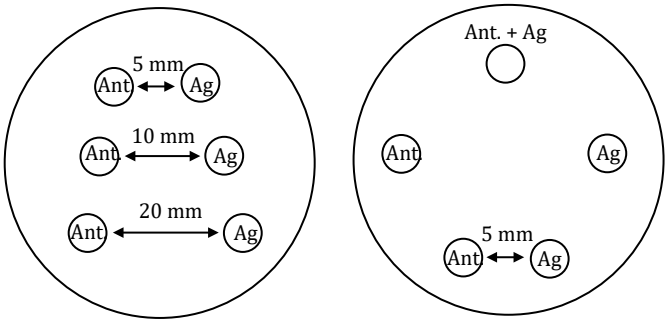
Se llevaron a cabo dos procedimientos distintos para estudiar el comportamiento y la aparición de posibles efectos sinérgicos al combinar dos antimicrobianos: antibióticos y plata (en su forma disuelta o como nanopartículas). Estos procedimientos se realizaron siguiendo la metodología del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) y de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [35,36,41].

Las combinaciones estudiadas frente a *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *P. aeruginosa* PAO1 fueron:

- Penicilina G + Ag(I)
- Penicilina G + AgNPs de 10 nm estabilizadas con citrato
- Apramicina + Ag(I)
- Apramicina + AgNPs de 10 nm estabilizadas con citrato

Método de difusión

Se preparó el inóculo de bacterias a partir de varias colonias procedentes de un cultivo sembrado el día anterior en placas Petri con agar MH y se suspendieron en 5 mL de SFE. La turbidez de este inóculo se preparó por comparación con el estándar 0,5 de la escala McFarland, un estándar turbidimétrico que corresponde a $1{,}5 \times 10^8$ UFC mL^{-1}. A continuación, se inoculó con un hisopo la placa Petri que contenía agar MH. Se dejó secar durante 3 - 5 minutos y se cargaron las muestras de antimicrobianos en las placas inoculadas siguiendo los esquemas de distribución que se muestran en la Figura 3.2.5. La placa se incubó durante 24 horas a 37^0C. Tras la incubación, se observaron los halos de inhibición obtenidos de los antimicrobianos individualmente y de su combinación.



Esquema 1 Esquema 2

Figura 3.2.5. *Esquemas de la distribución de las muestras en las placas Petri. En la posición de "Ant." (antibiótico) se añadió penicilina G o apramicina; y en la posición de "Ag" se añadió Ag(I) o AgNPs.*

En el esquema 1, en la posición "Ant." se cargaron los discos de penicilina G que tenían una carga de 10 U (10 µg) o 5 µL de apramicina de 10 o 100 g L^{-1}, aportando una carga de 50 y 500 µg, respectivamente. En la posición "Ag", se añadieron 5 µL de nanopartículas de plata de 21 mg L^{-1} o 5 µL de Ag(I) de 994 mg L^{-1}, aportando una carga de 0,11 y 4,97 µg, respectivamente. Se estudiaron tres distancias de separación entre los antimicrobianos (5, 10 y 20 mm).

En el esquema 2, en la posición "Ant." se añadieron 3 µL de penicilina G de 10 g L^{-1}, aportando una carga de 30 µg. En la posición "Ag", se añadieron 3 µL de nanopartículas de plata de 21 mg L^{-1} o 3 µL de Ag(I) de 994 mg L^{-1}, aportando una carga de 0,06 y 2,98 µg, respectivamente. En este caso se estudiaron los antimicrobianos individualmente, la combinación de antimicrobianos separados a 5 mm, y la combinación de ambos en el mismo punto de carga.

Método del tablero:

En el eje X se colocaron las diluciones de los antibióticos en concentraciones decrecientes: penicilina G de 64 a 0,25 mg L^{-1}, o apramicina de 64 a 0,25 mg L^{-1} o 256 a 1 mg L^{-1}, en función del microorganismo estudiado. En el eje Y se colocaron las diluciones de los materiales de plata en concentraciones decrecientes: Ag(I) de 32 a 0,25 mg L^{-1} o nanopartículas de plata de 16 a 0,125 mg L^{-1}. En la Figura 3.2.6 se muestra un esquema de la placa microtituladora con el método del tablero. En las dos últimas columnas de la placa se realizaron controles negativos del medio de

incubación (C_M), controles positivos de las bacterias sin antimicrobianos (C_B) y controles negativos de los antimicrobianos ($C_{ANT,1}$ y $C_{ANT,2}$) (sin exposición a bacterias).

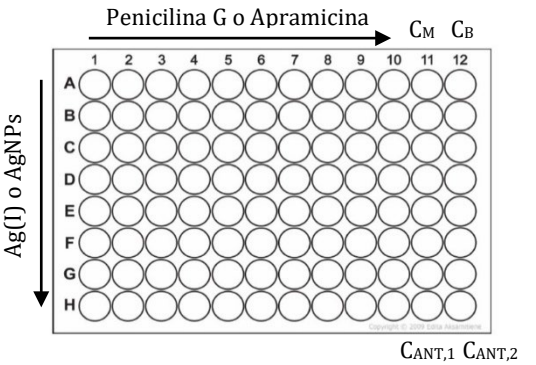


Figura 3.2.6. *Esquema de la placa microtituladora con el método del tablero.*

Se prepararon diluciones seriadas a la mitad en medio MH + 2% Tween 80, a partir de una dilución madre de los antimicrobianos. En una placa de 96 pocillos, se añadieron 40 µL de la dilución de cada uno de los antimicrobianos correspondientes. Posteriormente, se preparó el inóculo a partir de una suspensión de bacterias del 0,5 de la escala McFarland en un tubo que contenía 5 mL de SFE. En cada pocillo, se añadieron 20 µL de esta suspensión de bacterias. Finalmente, la placa se incubó durante 24 horas a 37^0C. Tras la incubación, se procedió a la lectura de los resultados observando la turbidez de los pocillos. Los resultados se transfirieron a un esquema, indicando en cada casilla si había crecimiento visible o no. Por último, se calculó la concentración inhibitoria fraccional (CIF) para cada compuesto y la suma de las dos CIF permitió obtener el índice CIF para cada combinación de antimicrobianos, con el cual se estudiaron sus efectos bacteriostáticos.

El cálculo CIF para cada compuesto y del índice CIF se realizan mediante las siguientes ecuaciones:

$$CIF\ del\ antimicrobiano\ A = \frac{CIM\ del\ antimicrobiano\ A\ en\ combinación\ con\ el\ B}{CIM\ del\ antimicrobiano\ A\ en\ solitario} \quad (37)$$

$$CIF\ del\ antimicrobiano\ B = \frac{CIM\ del\ antimicrobiano\ B\ en\ combinación\ con\ el\ A}{CIM\ del\ antimicrobiano\ B\ en\ solitario} \quad (38)$$

$$Índice\ CIF\ o\ \Sigma CIF = CIF\ A + CIF\ B \quad (39)$$

La interpretación del índice CIF es la siguiente:

- Sinergia: ΣCIF ≤ 0,5
- Indiferencia: 0,5 > ΣCIF ≤ 4
- Antagonismo: ΣCIF > 4

Adicionalmente, tras la determinación de la CIF individual y del índice CIF, se sembraron en placas Petri con agar MH las suspensiones de los pocillos resultantes de la placa de 96 pocillos. De aquellos pocillos en los que se observó turbidez, se plaquearon 10 µL, mientras que de aquellos en los que no se observó turbidez, se plaquearon 100 µL. Se incubaron las placas durante 24 horas a 37^0C. Tras la incubación, se procedió a la lectura de los resultados observando el crecimiento bacteriano en las placas. Los resultados se transfirieron a un esquema, indicando en cada casilla si había crecimiento o no. Por último, se calculó la concentración bactericida fraccional (CBF) para cada compuesto y la suma de las dos CBF, la cual permite obtener el índice CBF para cada combinación de antimicrobianos y a través del cual se estudiaron los efectos bactericidas. La interpretación de los resultados del índice CBF es la misma que para el índice CIF (indiferencia, sinergia y antagonismo) y para el cálculo de las CBF y el índice CBF se utilizan las mismas expresiones (37) - (39), pero cambiando las concentraciones de CIM por CBM [41,50,345–347].

3.2.2.5.4. Determinación de los contenidos totales de Ag mediante digestión ácida

Para determinar el contenido total de plata de las muestras de cultivos bacterianos con plata y/o antibiótico (Apartado 0) se llevó a cabo el mismo

procedimiento de digestión ácida que en el Apartado 3.1.2.5.7 del Capítulo 3.1 y posterior cuantificación mediante ICP-MS.

Este procedimiento también se aplicó para cuantificar la plata intracelular y la plata adsorbida a la pared de las bacterias tras la digestión con lisozima (Apartado 3.2.3.3.2). Para ello, los sobrenadantes (restos de la membrana y líquido del espacio periplasmático) y los residuos finales tras los dos lavados con tampón Tris-HCl 0,01 M (esferoplastos), se sometieron a la digestión ácida y se cuantificaron mediante ICP-MS.

3.2.2.5.5. Determinación de los contenidos de plata intracelular mediante digestión enzimática

Para la determinación de la plata intracelular se realizó una digestión enzimática de las muestras de cultivos bacterianos con plata y/o antibiótico (Apartado 3.2.2.4) con lisozima, la cual degrada la pared celular de las bacterias dejándolas en forma de esferoplastos. Para ello, se cogieron 100 µL de cada muestra y se centrifugaron a 3000 g durante 20 min y 4^0C para eliminar el medio de PBS (centrífuga refrigerada Heraeus Multifuge X1R equipada con un rotor de ángulo fijo para tubos Eppendorf). El residuo resultante se lavó dos veces con tampón Tris-HCl 0,01 M (pH=7,8) centrifugando a 3000 g durante 20 min y 4^0C. El sobrenadante se eliminó y el residuo se resuspendió en 500 µL de tampón Tris-HCl 0,01 M (pH=7,8). Se añadieron lentamente 10 µL de EDTA 0,5 M (pH=8) a la suspensión resultante, para que la concentración final fuera 10 mM. Se incubó durante 30 min con una agitación de 100 rpm y a 37^0C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 3000 g durante 20 min y se eliminó el sobrenadante. El residuo resultante se trató con 500 µL de lisozima de 2 mg mL^{-1} y se incubó durante 1 hora con una agitación de 100 rpm y a 37^0C. Se centrifugó a 4000 g durante 20 min y 4^0C. El sobrenadante, que contenía los restos de la membrana y el líquido del espacio periplasmático, se recogió para ser analizado posteriormente. El residuo, que contenía los esferoplastos, se lavó dos veces con tampón Tris-HCl 0,01 M (pH=7,8) para eliminar los componentes residuales de la membrana exterior centrifugando a 3000 g durante 20 min y 4^0C. El residuo final se guardó a 4^0C en medio de tampón Tris-HCl 0,033 M y 2% sacarosa (pH=7,8) hasta su medida en SC-ICP-MS. Los controles del medio de incubación y de las bacterias se sometieron al mismo proceso.

3.2.2.5.6. Detección y cuantificación de plata en bacterias mediante SC-ICP-MS

Las muestras de cultivos bacterianos con plata y/o antibiótico (Apartado 3.2.2.4) se midieron mediante la técnica de SC-ICP-MS para detectar y cuantificar la plata presente en las bacterias (Apartado 3.2.3.3.1). Para ello, se aplicó el mismo procedimiento descrito en el Apartado 3.1.2.5.11. del Capítulo 3.1.

Las muestras digeridas con lisozima del Apartado 3.2.2.5.5 se midieron mediante SC-ICP-MS (Apartado 3.2.3.3.2). Debido a que las muestras se encontraban en medio de tampón Tris-HCl 0,033 M y 2% sacarosa (pH=7,8), las suspensiones se centrifugaron a 3000 g durante 20 min y 4^0C para eliminar el medio. Posteriormente, los residuos (esferoplastos) se suspendieron hasta 2 mL con tampón Tris-HCl 0,01M (pH=7,8). Antes del análisis, las suspensiones se volvieron a diluir con el mismo tampón.

El rendimiento de nebulización del analito se calculó de acuerdo con los métodos desarrollados por Pace *et al*. [88], usando los estándares de nanopartículas de oro de 50 nm descritos anteriormente. Se obtuvieron resultados similares para el método de la frecuencia y el método del tamaño (60,5 ± 0,3 % y 57,1 ± 0,3 %, respectivamente, n = 6). Los caudales de muestra se midieron gravimétricamente por triplicado.

3.2.2.5.7. Observación de los esferoplastos mediante microscopio óptico

Los residuos de esferoplastos y las bacterias *E. coli* sin tratar se sometieron a una tinción de Gram para su posterior observación en microscopio óptico. Los residuos se depositaron en un portaobjetos con un asa de platino esterilizada y posteriormente, se añadió cristal violeta seguido de lugol (disolución de yodo), una disolución decolorante de Gram (acetona/etanol), y finalmente, safranina básica. Después de cada adición y antes de la siguiente, se dejó actuar el reactivo añadido durante un minuto y se lavó con agua destilada. Por último, las muestras se observaron al microscopio óptico con un aumento de 100x.

3.2.2.5.8. Detección de posibles alteraciones estructurales de las bacterias mediante SEM y TEM

Las muestras de cultivos bacterianos con plata y/o antibiótico (Apartado 3.2.2.4) se observaron mediante microscopía electrónica de barrido y de

transmisión. Para ello, las muestras, que estaban suspendidas en PBS, se centrifugaron a 10.000 g durante 20 min para eliminar el medio de PBS. El residuo resultante se lavó a las mismas condiciones con tampón PB 0,1M (pH=7,4), preparado a partir de la dilución de una disolución de Na_2PO_4 0,2M y una disolución de NaH_2PO_4 0,2M. A continuación, el residuo se fijó con glutaraldehído al 2,5% en tampón PB 0,1M (pH=7,4) durante 24 horas. Posteriormente, se lavó con el mismo tampón y se realizó una post-fijación con tetraóxido de osmio al 2% en PB 0,1 M durante 1 hora. Finalmente, las muestras se deshidrataron con etanol. Para la observación en SEM, las muestras se recubrieron con carbono para aumentar su conductividad y se observaron con un aumento de 10.000x.

Para la observación en TEM, las muestras se tiñeron con acetato de uranilo al 2% y se lavaron con tampón PB 0,1M (pH=7,4). Posteriormente, se realizó la inclusión en resina epoxi y se polimerizó a 70^0C en una estufa durante 48 horas. Se realizaron unos cortes ultrafinos de 70 nm y, por último, se realizó una tinción de Reynolds con citrato de plomo sobre la rejilla. La observación se realizó con un rango de aumentos de 25.000 - 100.000x a 80kV.

3.2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.2.3.1. Evaluación de la actividad bactericida individual de materiales de plata y antibióticos convencionales: apramicina y penicilina G

La actividad bacteriostática y bactericida de los nanomateriales de plata y los antibióticos convencionales se determinó mediante el método de dilución, a través del cual se determinó la CIM y la CBM, respectivamente. En la Figura 3.2.7 se muestra el resultado obtenido de ausencia o presencia de turbidez en los pocillos de una placa microtituladora como ejemplo de la determinación de la CIM, en este caso, de la apramicina tras la incubación de *E. coli* y *P. aeruginosa*. En la Figura 3.2.8 se muestra un ejemplo de la determinación de la CBM, donde se observa la ausencia o presencia de crecimiento bacteriano en las placas Petri en función de la concentración de apramicina.

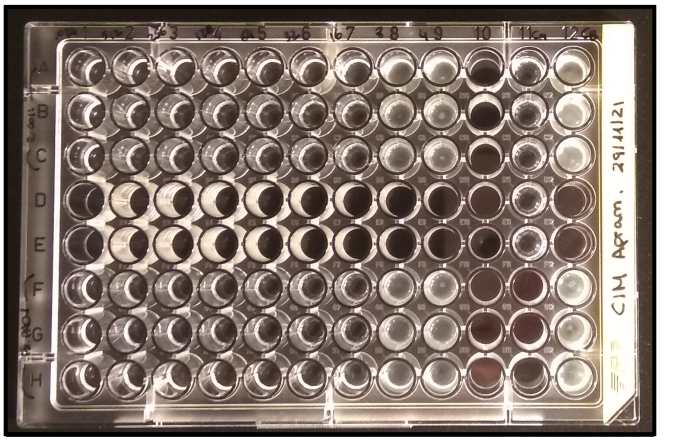


Figura 3.2.7. *Placa microtituladora para la determinación de la CIM de apramicina frente a bacterias* E. coli *y* P. aeruginosa*. Pocillos con turbidez: crecimiento bacteriano. Pocillos sin turbidez: ausencia de crecimiento bacteriano.*

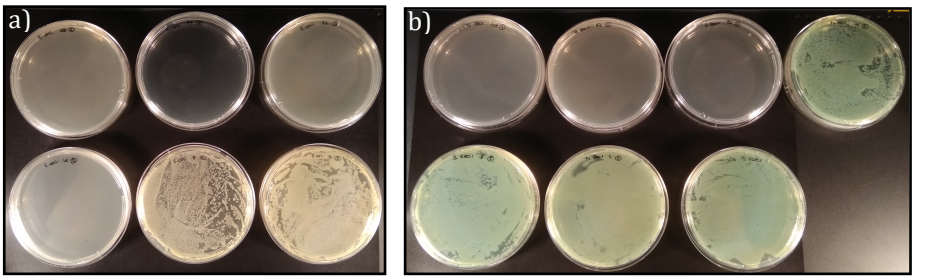


Figura 3.2.8. *Placas Petri para la determinación de la CBM de apramicina en a)* E. coli *y b)* P. aeruginosa*. Placas Petri en orden decreciente de concentración de apramicina.*

Como se ha comentado previamente, las nanopartículas elegidas en este estudio fueron las nanopartículas de plata de 10 nm debido a que, como se determinó en el Capítulo 3.1, el efecto bactericida está relacionado con un mecanismo asociado al combinado ion-partícula, siendo las nanopartículas capaces de internalizar o adsorberse en las bacterias. Como las nanopartículas de 60 nm no eran capaces de interaccionar en su forma particulada, se descartó su uso en estos estudios.

Respecto a los antibióticos, se eligió la penicilina G debido a que es un antimicrobiano ampliamente utilizado en medicina. Su espectro de acción abarca principalmente, los cocos Gram-negativos y Gram-positivos y bacilos Gram-positivos [236], por lo tanto, no se esperaba que tuviera acción bactericida frente a los bacilos Gram-negativos *E. coli* y *P. aeruginosa.* El objetivo de estudiar este antibiótico era determinar si su acción aumentaba frente a estas bacterias Gram-negativas por la aparición de efectos sinérgicos al combinarlo con plata. Por otro lado, se eligió otro antibiótico, la apramicina, cuyo espectro de acción es frente a bacterias Gram-negativas y es comúnmente utilizado en medicina veterinaria. En este caso, el objetivo era determinar si los efectos bactericidas de la apramicina mejoraban al combinarlo con plata.

Además de la cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922 utilizada en los Capítulos 2 y 3.1, se amplió el estudio de la determinación de los posibles efectos sinérgicos por la combinación de plata con antibióticos convencionales a las bacterias Gram-negativas *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *P. aeruginosa* PAO1, ya que son microorganismos que presentan resistencia intrínseca a la penicilina G.

En la Tabla 3.2.1 se recogen los resultados de la CIM y CBM de cada una de los antimicrobianos frente a las tres cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa*. Los resultados obtenidos de la CIM y CBM tienen una incertidumbre de ± 1 dilución. Generalmente, la CBM es la misma o como máximo una o dos diluciones mayor que la CIM [36]. Como se observa, los resultados obtenidos mostraron este comportamiento.

Al comparar los valores obtenidos experimentalmente de CIM y CBM para las tres cepas bacterianas se observó que todos los antimicrobianos presentaron los mismos efectos bacteriostáticos (misma CIM) frente a las tres cepas, excepto en el caso de la penicilina G frente a *E. coli,* donde se obtuvo mayor actividad bacteriostática que frente a las cepas de *P. aeruginosa*. Respecto a la actividad bactericida, se obtuvieron mayores efectos bactericidas (menor CBM) de la apramicina y de Ag(I) frente a *E. coli* que frente a *P. aeruginosa*.

Tabla 3.2.1. *Concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM) de distintos antimicrobianos frente a distintas cepas de bacterias* E. coli *y* P. aeruginosa*.*

Cepa bacteriana	**Antimicrobiano**	**CIM** $mg\ L^{-1}$	**CBM** $mg\ L^{-1}$
E. coli ATCC 25922	Ag(I)	8	8
	AgNPs-citrato 10 nm	16	16
	Apramicina	16	16
	Penicilina G	64	> 64
P. aeruginosa ATCC 27853	Ag(I)	8	16
	AgNPs-citrato 10 nm	16	16
	Apramicina	16	64
	Penicilina G	> 64	> 64
P. aeruginosa PAO1	Ag(I)	8	16
	AgNPs-citrato 10 nm	16	16
	Apramicina	16	64
	Penicilina G	> 64	> 64

Como se comentó en el Apartado 3.1.3.3 del Capítulo 3.1, en la bibliografía se encuentran valores muy diferentes de la CIM y CBM de $AgNO_3$ y nanopartículas de plata frente a *E. coli*, debido a que el efecto bactericida de los antimicrobianos depende de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas como el tamaño o el recubrimiento, y de otros factores como el medio de cultivo, las cepas de bacterias o la concentración del inóculo inicial. Autores como Pormohammad *et al*. demostraron esta dependencia de la CIM y CBM de $AgNO_3$ en función del medio de cultivo para la cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853. Los valores determinados de CIM y CBM fueron 5 y 21 $mg\ L^{-1}$ en medio MH [57]. Estos valores son similares a los obtenidos experimentalmente para $AgNO_3$ frente a esta cepa bacteriana incubados en medio MH + 2% Tween 80, donde la CIM para $AgNO_3$ sería 12,6 $mg\ L^{-1}$ (CIM de Ag(I) = 8 $mg\ L^{-1}$). A su vez, Radzig *et al*. determinaron la CIM de $AgNO_3$ frente a *P. aeruginosa* PAO1 en caldo de nutrientes obteniendo un valor de 0,3 $mg\ L^{-1}$ [348]; mientras que Glisic *et al*., obtuvieron un valor de 3 $mg\ L^{-1}$ [349]. Otros valores de CIM obtenidos para distintas cepas de *P. aeruginosa* en distintos medios varían entre 0,21 y 2 $mg\ L^{-1}$ [44,256,350].

Respecto a la CIM y CBM de las nanopartículas de plata, existen una gran variedad de estudios que recogen valores de estas concentraciones frente a bacterias *P. aeruginosa* y *E. coli*, pero al igual que se comentó anteriormente, resulta muy complicado comparar estos valores ya que las nanopartículas utilizadas en los estudios tienen diferentes tamaños, así como las cepas de bacterias y los medios de cultivo son distintos. Entre las distintas cepas de *P. aeruginosa* estudiadas se encuentran valores de CIM de 2 -10 mg L^{-1} de nanopartículas de plata con tamaños entre 5 y 20 nm en medio Luria-Bertani y MH [44,256,348,351,352]. Estos valores son ligeramente menores que los obtenidos experimentalmente en este trabajo, aunque estas diferencias pueden ser debidas a las distintas propiedades de las nanopartículas y a las distintas condiciones de cultivo. La dependencia de la actividad bactericida de las nanopartículas en función del tamaño frente a *P. aeruginosa*, fue demostrada por Li *et al*., quienes obtuvieron valores diferentes de CIM para nanopartículas de distinto tamaño [256]. Este mismo comportamiento fue observado por Agnihotri *et al*. en bacterias *E. coli* [266]. Varios de estos autores compararon la CIM de $AgNO_3$ y nanopartículas de plata frente a *P. aeruginosa* y *E. coli* en el mismo estudio. En este caso tampoco se observó ninguna tendencia clara de que las distintas formas de plata presentasen un mayor efecto bactericida en una especie bacteriana que en la otra. Algunos estudios obtuvieron valores de CIM menores frente a *E. coli* y por tanto, mayor efecto bactericida [256,348]; mientras que en otros, se obtuvieron resultados opuestos, observando un mayor efecto bactericida frente a *P. aeruginosa* [349,351,352]. Por otro lado, Gurunathan *et al*. obtuvieron valores de la CIM iguales frente a ambas bacterias [44]. Los datos experimentales obtenidos en este trabajo concuerdan con este último estudio, obteniéndose que ambas bacterias son igual de susceptibles frente a Ag(I) y nanopartículas de plata de 10 nm, con valores de CIM de 8 y 16 mg L^{-1} (Tabla 3.2.1), respectivamente.

Respecto a la apramicina, a pesar de ser un antibiótico usado en veterinaria, no existen unos criterios clínicos de CIM o CBM frente a *P. aeruginosa* y *E. coli,* establecidos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) o el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST). Varios autores han evaluado la actividad bactericida de la apramicina frente a un gran número de cepas, generalmente cepas que no son de referencia, de *P. aeruginosa* y *E. coli* y la han comparado con otros aminoglucósidos utilizados en medicina. Los resultados obtenidos frente a *P. aeruginosa* muestran distribuciones de CIM que van desde 2 a 512 mg L^{-1}, asignando como valor de corte epidemiológico el valor de 64 mg L^{-1}, y distribuciones de CBM que van desde 16 a 512 mg L^{-1}. Al comparar estos valores con las CIM obtenidas para otros aminoglucósidos como amikacina,

gentamicina y tobramicina determinaron que la apramicina tenía mayores efectos bactericidas frente a las mismas cepas [353–355]. Kang *et al*., en el caso de la cepa de referencia *P. aeruginosa* ATCC 27853, determinaron una CIM de la apramicina de 8 mg L^{-1} [353]. Este dato es comparable al valor obtenido experimentalmente en este estudio en el que el valor de la CIM para ambas cepas de *P. aeruginosa* fue 16 mg L^{-1} (Tabla 3.2.1). En el caso de estudios con distintas cepas de *E. coli*, los valores obtenidos de la CIM fueron entre 1 y 256 mg L^{-1} [356–358], sugiriendo como valor de corte epidemiológico el valor de 16 - 32 mg L^{-1}. Kobe *et al*. determinaron una CIM de la apramicina frente a la cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922 de 2 mg L^{-1} [358], mientras que Juhas *et al*. obtuvieron un valor de 8 mg L^{-1} [338]. Este último valor es comparable al obtenido experimentalmente en este estudio en el que se obtiene este mismo valor de CIM de la apramicina frente a esta cepa (Tabla 3.2.1). Al igual que ocurría frente a *P. aeruginosa*, al comparar la actividad bactericida frente a *E. coli* de la apramicina y otros aminoglucósidos como gentamicina o amikacina, se determinó que la apramicina presentaba CIM menores y por tanto, mayores efectos bacteriostáticos [338].

Por último, como se observa en la Tabla 3.2.1, los valores de CIM y CBM de penicilina G obtenidos para las tres cepas son generalmente, mayores del rango estudiado. Esto es debido a que el espectro de acción de la penicilina G es frente a bacterias Gram-positivas, y las bacterias estudiadas en este caso son Gram-negativas, por lo tanto, su actividad bactericida frente a ellas fue muy pequeño, obteniéndose CIM y CBM muy altas (>64 mg L^{-1}). Debido a la limitación de la actividad bactericida de la penicilina frente a bacterias Gram-negativas, existe un reducido número de estudios que determinen la CIM y CBM de este antibiótico frente a estas bacterias. Kazemnia *et al*. determinaron los efectos bactericidas de la penicilina frente a un gran número de cepas, que no eran de referencia, de *E. coli* y obtuvieron unos valores de CIM comprendidos entre 25 y >100 mg L^{-1} y de CBM entre 50 y >100 mg L^{-1} [359]. Por otro lado, otros valores obtenidos de CIM para tres cepas de *E. coli*, una de ellas la cepa *E. coli* ATCC 25922, fueron 16 y 64 mg L^{-1} [360]. Fass *et al*. determinaron una CIM de penicilina G frente a *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 de 32 y >128 mg L^{-1} en medio MH [361]. Estos datos son concordantes con los obtenidos experimentalmente en este trabajo. Como se ha comentado anteriormente, *P. aeruginosa* presenta resistencia intrínseca a varios grupos de antimicrobianos, en concreto a β-lactámicos como la penicilina. Esto se debe a la baja permeabilidad de su membrana y la capacidad funcional de las porinas que limita significativamente el paso de antimicrobianos. Las bombas de expulsión activas constituyen otro mecanismo de resistencia por el cual expulsan al antibiótico de su sitio de acción

antes de que actúe. Éste último mecanismo es característico tanto de bacterias *P. aeruginosa* como de *E. coli* [237].

3.2.3.2. Evaluación de la actividad bactericida de las combinaciones antibiótico convencional - plata e identificación de efectos sinérgicos

Una vez determinadas la CIM y CBM de los cuatro antimicrobianos por separado, se combinaron los antibióticos convencionales con los nanomateriales de plata y se evaluó la capacidad bactericida de estas combinaciones, así como la posible aparición de efectos sinérgicos. La actividad bactericida de estas combinaciones se estudió mediante un procedimiento previo de difusión en disco y mediante el método del tablero.

3.2.3.2.1. Método de difusión

Mediante el método de difusión se estudiaron los halos de inhibición resultantes de la combinación de dos antimicrobianos, tras colocar unos discos comerciales o unos microlitros de los antimicrobianos con concentraciones conocidas. El sinergismo se observa como una zona de inhibición que une los halos de dos antimicrobianos, mientras que en el antagonismo esta zona de unión aparece con crecimiento visible incluso en las zonas de inhibición de los dos antimicrobianos [36]. En primer lugar, se estudió el esquema 1 (Figura 3.2.5 del Apartado 3.2.2.5.3) para las combinaciones de antimicrobianos penicilina G + AgNPs y penicilina G + Ag(I) frente a las cepas de *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *P. aeruginosa* PAO1. Debido a que no se observaron halos de inhibición correspondientes con los discos de penicilina G estudiados frente a ninguna de las tres cepas, se aumentó la carga de la penicilina y se estudió el esquema 2 (Figura 3.2.5 del Apartado 3.2.2.5.3) para las mismas combinaciones de antimicrobianos y cepas de bacterias.

Los resultados obtenidos para la combinación de penicilina G + Ag(I) se muestran en la Figura 3.2.9. Como se ha comentado, en las placas con el esquema 1 (a, b y c), la penicilina G no presentó efectos bactericidas ya que no se observó ningún halo de inhibición para ninguna de las cepas. Por otro lado, los halos correspondientes a la Ag(I) tenían un diámetro de 11 y 13 mm, para las cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa*, respectivamente, lo que demostraba un efecto bactericida similar para las tres cepas. En las placas del esquema 2 (Figura 3.2.9.d, e y f), se aumentó la carga de la penicilina G. En el caso de las bacterias *E. coli*, esto conllevó la aparición

de halos de inhibición como consecuencia del efecto bactericida de este antibiótico, con un tamaño de 15 mm, tanto en el punto de carga del antibiótico individual como en las dos combinaciones de penicilina y Ag(I) (antimicrobianos en el mismo punto de carga y separados 5 mm). En el caso de la Ag(I), aparecieron unos halos de 7 mm tanto en la carga individual como en la combinación en la que ambos antimicrobianos estaban separados, lo que concordó con los resultados del esquema 1 en los que los halos eran mayores debido a la mayor concentración añadida de Ag(I). Ni en la situación en la que se combinaron los antimicrobianos en el mismo punto de carga ni en la que estaban ligeramente separados se observó un aumento del halo en la parte donde se juntan los dos halos o un aumento del tamaño de los halos, lo que indicaba que no se producía efecto sinérgico. Por el contrario, en el caso de las bacterias *P. aeruginosa*, la penicilina G no tuvo ningún efecto bactericida ya que no se observaron halos de inhibición. Esto indicaba que las bacterias no son sensibles a la penicilina G a esta concentración, lo que concuerda con los resultados de la CIM y CBM debido a que presentan resistencia intrínseca a la penicilina G. Al combinar la penicilina G y Ag(I) no se observó un aumento del halo de inhibición y el observado fue como consecuencia del efecto bactericida de la Ag(I), el cual formó halos de 7 - 8 mm. Por tanto, se concluyó que a estas concentraciones estudiadas la combinación de penicilina G y Ag(I) no presentaron efectos bactericidas sinérgicos.

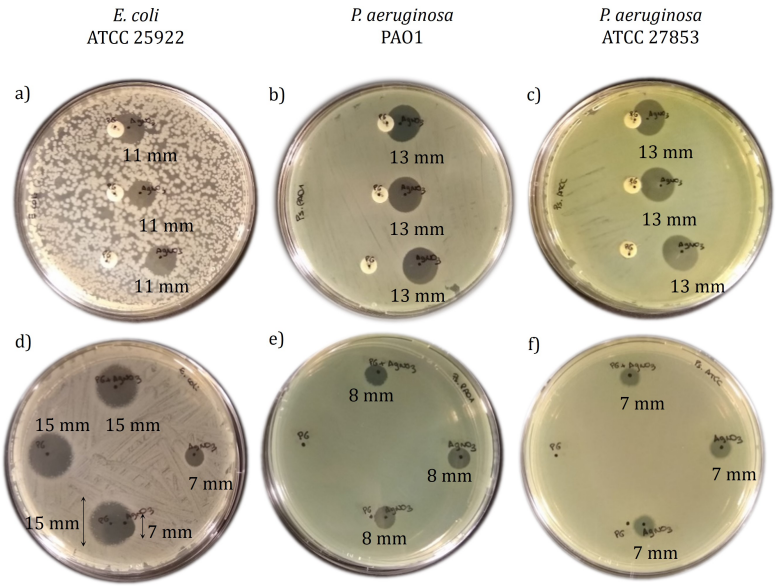


Figura 3.2.9. *Placas Petri con los halos de inhibición para la combinación de penicilina G + Ag(I) frente a las bacterias a) y d)* E. coli *ATCC 25922, b) y e)* P. aeruginosa *PAO1 y c) y f)* P. aeruginosa *ATCC 27853. Placas con esquema 1: a, b y c. Placas con esquema 2: d, e y f.*

Los resultados obtenidos para la combinación de penicilina G + nanopartículas de plata se muestran en la Figura A3.3.1 (Anexo A3.3). Al igual que en el caso anterior, en las placas del esquema 1, no se obtuvieron halos de inhibición correspondientes con la penicilina G. Tampoco se obtuvieron halos en el caso de las nanopartículas de plata, ni en las combinaciones de ambos antimicrobianos. En las placas del esquema 2, se obtuvieron los mismos halos de inhibición de 15 mm para la penicilina G frente a *E. coli*, mientras que al combinar la penicilina G con las nanopartículas se obtuvieron unos halos ligeramente mayores, de 17 mm. Este ligero aumento no se consideró producido por efectos sinérgicos ya que la diferencia entre los diámetros es muy pequeña. En el caso de las cepas de *P. aeruginosa* no se observó ningún halo ni para los antimicrobianos individuales ni para las combinaciones de ellos, lo cual volvía a demostrar el nulo efecto de la penicilina G frente a estas cepas, así como la ausencia de efectos sinérgicos tras la combinación de estos antimicrobianos. Solamente se observó un pequeño halo frente a *P. aeruginosa* PAO1 en el punto de carga de las nanopartículas, el cual presentaba a su vez un ligero crecimiento de bacterias en su interior, lo que indicaba que las nanopartículas a esta concentración sólo producían la muerte de una parte de la población de bacterias.

Posteriormente, se estudió la actividad bactericida de las combinaciones de antimicrobianos apramicina + AgNPs y apramicina + Ag(I) frente a las cepas de *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *P. aeruginosa* PAO1, siguiendo el esquema 1 (Figura 3.2.5 del Apartado 3.2.2.5.3). En primer lugar, se llevó a cabo este esquema añadiendo 5 µL de la suspensión de apramicina de 10 g L^{-1}, y posteriormente, se repitió el ensayo aumentando 10 veces la concentración de apramicina, añadiendo 5 µL de la suspensión de apramicina de 100 g L^{-1}.

Los resultados obtenidos para la combinación de apramicina + Ag(I) se muestran en la Figura 3.2.10. La apramicina añadida a una concentración de 10 g L^{-1} produjo halos de inhibición de 19 - 21 mm para las tres cepas estudiadas, mientras que los halos producidos por la Ag(I) tenían un tamaño de 8 - 9 mm. En la primera situación en la que los antimicrobianos estaban separados 5 mm, se observó un halo perfectamente definido de la apramicina superpuesto casi completamente al halo de la Ag(I), sin observarse efectos sinérgicos ya que la suma de los halos no era mayor que el halo individual de la apramicina. En el resto de las situaciones en las que los antimicrobianos estaban más separados tampoco se observaron efectos sinérgicos.

Debido a esto se aumentó la concentración de apramicina a 100 g L^{-1}. Los halos de la apramicina aumentaron hasta tamaños de 28 - 29 mm, mientras que los de la Ag(I) mantuvieron su tamaño (8 - 9 mm). Al igual que en el caso anterior, para las situaciones de las cargas separadas 5 y 10 mm se observó que el halo de la

apramicina superponía al halo de la Ag(I), completamente y parcialmente, respectivamente; excepto en la placa de *E. coli*, en la que, para la separación de 5 mm, se obtuvo un halo de un tamaño de 36 mm, que correspondía con la suma del halo de apramicina y el de la Ag(I), aunque no se distinguieran el uno del otro. Por el contrario, en la situación de separación de 20 mm, en la placa de *E. coli* (Figura 3.2.10.d) se obtuvieron los dos halos separados completamente, mientras que en las placas de ambas *P. aeruginosa* (Figura 3.2.10.e y f) se observaron los dos halos ligeramente separados entre sí, y entre medio de ambos una deformación del halo de la Ag(I). Esto indicaba que había sinergia a estas concentraciones entre la apramicina y Ag(I) para *P. aeruginosa* PAO1 y ATCC 27853. Adicionalmente, se observó sinergia entre los halos formados por la apramicina, donde se observó la deformación de éstos. Las flechas rojas muestran la deformación de los halos de inhibición.

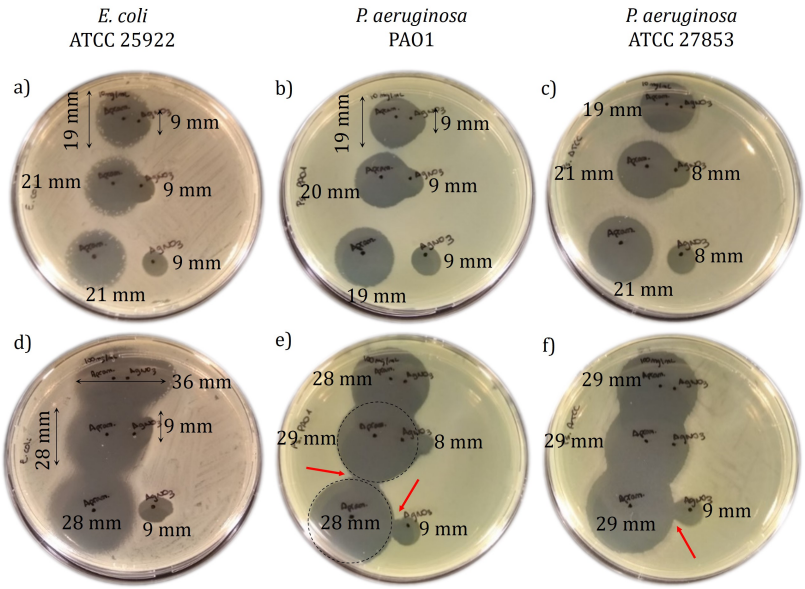


Figura 3.2.10. *Placas Petri (esquema 1) con los halos de inhibición para la combinación de apramicina + Ag(I) frente a las bacterias a) y d)* E. coli *ATCC 25922, b) y e)* P. aeruginosa *PAO1 y c) y f)* P. aeruginosa *ATCC 27853. Concentración de 10 g L^{-1} de apramicina: a, b y c. Concentración de 100 g L^{-1} de apramicina: d, e y f. Flechas rojas: presencia de sinergia.*

Los resultados obtenidos para la combinación de apramicina + nanopartículas de plata se muestran en la Figura A3.3.2 (Anexo A3.3). Al igual que en el estudio de la combinación de penicilina + nanopartículas de plata, estas últimas no produjeron halos de inhibición, por lo que no se podían observar efectos sinérgicos al combinarlas con apramicina. Entre los halos de apramicina a la concentración de 10 g L^{-1}, que tenían diámetros de 20 - 22 mm se observaron sinergias (flechas rojas) en el caso de ambas cepas de *P. aeruginosa*. Al aumentar la concentración a 100 g L^{-1}, solamente se observó el aumento de los halos de la apramicina a 27 - 29 mm, como en el caso anterior de la combinación de apramicina + Ag(I).

Debido a que las sinergias entre los halos de la apramicina no son relevantes en esta investigación, solamente se va a comentar las sinergias y las interacciones entre la apramicina y las especies de plata. Los resultados obtenidos a lo largo de este ensayo en relación con la ausencia de efectos bactericidas de las nanopartículas de plata son concordantes con los resultados obtenidos de CIM y CBM, los cuales tenían un valor de 16 mg L^{-1} (1,28 µg). Por debajo de este valor no se observaban efectos bactericidas, lo cual concuerda con la ausencia de estos efectos a una carga de 0,11 o 0,06 µg en el método de difusión. Además, otro inconveniente es que las nanopartículas podrían no dispersarse correctamente por el agar y por tanto, no se podría estudiar la actividad bactericida de las nanopartícula mediante este método.

Como conclusión, en el caso de la combinación de penicilina G con Ag(I) o nanopartículas de plata no se produjeron efectos sinérgicos a ninguna de las concentraciones estudiadas en ninguna de las tres cepas debido a que no se observaron efectos aditivos en los halos de inhibición de las combinaciones. De la misma forma, para las combinaciones de apramicina con nanopartículas de plata tampoco se observaron efectos sinérgicos entre ambos antimicrobianos debido a que estas últimas no produjeron halo de inhibición. Por el contrario, la combinación de la apramicina con Ag(I) fue la única en la que se observaron efectos sinérgicos para las bacterias *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *P. aeruginosa* PAO1.

3.2.3.2.2. Método del tablero

Debido a que el método de difusión permite el estudio de una única concentración de antimicrobianos en cada ensayo, se llevó a cabo el método del tablero, el cual permite estudiar la actividad bacteriostática y bactericida de varias concentraciones de antimicrobianos combinados simultáneamente. Este método está basado en el método de la determinación de la CIM y CBM, pero en este caso se van combinando concentraciones seriadas a la mitad de ambos antimicrobianos.

Como se ha comentado, existen dos tipos de ensayos, los cuales permiten el estudio de los efectos bacteriostáticos y bactericidas de las combinaciones de antimicrobianos [50]. El ensayo más utilizado en la bibliografía es aquel que estudia los efectos bacteriostáticos combinados [53,58,362,363]; mientras que el relacionado con los efectos bactericidas de las combinaciones no es tan frecuente [345,347].

A partir del método de la CIM y CBM, se calcularon las concentraciones inhibitorias fraccionales (CIF) y el índice CIF o ΣCIF para cada combinación, con el cual se estudiaron si los efectos bacteriostáticos (inhibidores) de las combinaciones son: sinérgicos (ΣCIF ≤ 0,5), indiferentes (0,5 > ΣCIF ≤ 4) o antagónicos (ΣCIF > 4) [33,35,36]. Lo mismo se realizó con las concentraciones bactericidas fraccionales (CBF) y el índice CBF para cada combinación, con el cual se estudiaron los efectos bactericidas de cada combinación.

Estudio de los efectos bacteriostáticos sinérgicos: determinación de la CIF y el índice CIF

Este estudio se realizó para las cuatro combinaciones de antimicrobianos citadas anteriormente frente a las tres cepas *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *P. aeruginosa* PAO1. En la Figura A3.4.1 (Anexo A3.4) se muestran dos ejemplos de las placas resultantes de la evaluación de la actividad bactericida de las combinaciones de antimicrobianos mediante este método. En todas las situaciones estudiadas los controles positivos de bacterias presentaron turbidez, mientras que los controles negativos del medio de incubación y de los antimicrobianos presentaron ausencia de turbidez.

Para determinar los efectos bacteriostáticos de las combinaciones de antimicrobianos en los que se observó ausencia de turbidez es necesario calcular las CIF de cada antimicrobiano y el índice CIF, mediante las ecuaciones (37), (38) y (39) (Apartado 3.2.2.5.3). Los resultados obtenidos de las CIF, del índice CIF y de su interpretación para cada una de las combinaciones, así como las tablas y el análisis detallado de cada una de las combinaciones, se recogen en el Anexo A3.4 y en las Tabla A3.4.4 - Tabla A3.4.14.

La conclusión general obtenida de los efectos bacteriostáticos identificados en esta evaluación se resume a continuación. Ninguna de las combinaciones de penicilina G con Ag(I) o nanopartículas de plata presentaron efectos bacteriostáticos sinérgicos frente *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853. En el caso de las bacterias *P. aeruginosa* PAO1, la combinación de penicilina G con Ag(I) tampoco

produjo efectos sinérgicos; mientras que la combinación de penicilina G con nanopartículas de plata produjo efectos bacteriostáticos sinérgicos, permitiendo disminuir la concentración de penicilina hasta 256 veces y hasta 4 veces la de nanopartículas, para obtener el mismo efecto que los antimicrobianos en solitario a concentraciones elevadas.

Por el contrario, la combinación de ciertas concentraciones de apramicina con Ag(I), produjo efectos bacteriostáticos sinérgicos que permitieron una disminución de la concentración de la apramicina de hasta 8 - 16 veces frente a las tres cepas; y la concentración de Ag(I) hasta 16 - 32 veces. De la misma forma, la combinación de ciertas concentraciones de apramicina con nanopartículas de plata, produjo efectos bacteriostáticos sinérgicos que permitieron una disminución de la concentración de la apramicina de hasta 4 - 16 veces y la de nanopartículas hasta 4 - 128 veces, frente a las tres cepas estudiadas.

Estudio de los efectos bactericidas sinérgicos: determinación de la CBF y el índice CBF

Adicionalmente, además de evaluar los efectos bacteriostáticos sinérgicos de las mismas, se llevó a cabo la evaluación de los efectos bactericidas de las combinaciones. Se llevó a cabo el mismo procedimiento de evaluación que en el caso de los efectos bacteriostáticos. Los resultados obtenidos de las CBF, del índice CBF y de su interpretación para cada una de las combinaciones, así como las tablas y el análisis detallado de cada una de las combinaciones, que muestran los efectos bactericidas, se recogen en el Anexo A3.4 y en las Tabla A3.4.18 - Tabla A3.4.27.

Las conclusiones generales obtenidas de los efectos bactericidas identificados en esta evaluación fueron que ninguna de las combinaciones de penicilina G con Ag(I) o nanopartículas de plata presentaron efectos bactericidas sinérgicos frente a ninguna de las tres cepas estudiadas. Los únicos efectos bactericidas producidos por las combinaciones de antimicrobianos fueron indiferentes debido a que al menos la concentración de uno de los antimicrobianos tenía una dilución menor de su CBM y por tanto, la actividad bactericida de los dos antimicrobianos no difiere de la actividad del más efectivo en solitario. Por el contrario, la combinación de ciertas concentraciones de apramicina con Ag(I), produjo efectos bactericidas sinérgicos que permitieron una disminución de la concentración de apramicina de hasta 8, 16 y 64 veces frente a *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa* ATCC 27853, respectivamente; y la concentración de Ag(I) hasta 16 y 64 veces frente a *E. coli* y *P. aeruginosa*, respectivamente.

De la misma forma, la combinación de ciertas concentraciones de apramicina con nanopartículas de plata, produjo efectos bactericidas sinérgicos que permitieron una disminución de la concentración de apramicina de hasta 4 veces frente a las tres cepas, y la de nanopartículas hasta 4 y 8 frente a *E. coli* ATCC y *P. aeruginosa*, respectivamente. Se observaron combinaciones con mayores reducciones de las concentraciones que las comentadas anteriormente en las que no hubo crecimiento bacteriano y había efectos sinérgicos, pero no se consideraron válidas debido a que combinaciones contiguas con concentraciones de antimicrobiano mayores presentaron crecimiento bacteriano. Por ejemplo, esto ocurrió en la combinación apramicina - nanopartículas de plata frente a *P. aeruginosa* PAO1 (Tabla A3.4.16.d) a las concentraciones de 16 mg L^{-1} de apramicina + 0,125 mg L^{-1} de nanopartículas (pocillo H5) donde no hubo crecimiento, mientras que en las combinaciones de 16 mg L^{-1} de apramicina + 0,25 - 2 mg L^{-1} de nanopartículas (pocillos D5-G5) crecieron 1 o 2 bacterias, indicando que había un gran efecto bactericida pero no produjo la muerte de la población completa de microorganismos. Lo mismo ocurrió en la combinación apramicina - nanopartículas de plata frente a *P. aeruginosa* ATCC (Tabla A3.4.17.d).

Al comparar los resultados obtenidos para ambas combinaciones de apramicina con los antimicrobianos a base de plata se determinó que la presencia de plata (I) permite una mayor reducción de las concentraciones de apramicina y de plata (I), a la vez que se mantienen los efectos bactericidas de cada uno de los antimicrobianos individualmente. En las combinaciones de apramicina con nanopartículas, la reducción de las concentraciones fue menor, tanto para la concentración de apramicina como la de nanopartículas.

Existen numerosos estudios que han demostrado efectos sinérgicos entre distintos antibióticos y nanopartículas de plata frente a varias bacterias. Shahverdi *et al*. estudiaron el efecto combinado de nanopartículas de plata de 20 nm con distintos antibióticos frente a *E. coli* y *Staphylococcus aureus* mediante ensayos de difusión en disco, y los resultados determinaron que al combinar la penicilina G, aumentó la actividad de este antibiótico en presencia de nanopartículas de plata frente a ambas cepas [45]. Estos datos difieren de los resultados obtenidos en el Apartado 3.2.3.2.1, en los que, como se comentó anteriormente, no se observó un aumento al combinar penicilina G con nanopartículas de plata. Esta diferencia puede ser debido a varios factores. En primer lugar, la concentración de nanopartículas estudiadas fue muy pequeña (0,06 - 0,11 µg) en comparación con la del estudio de Shahverdi *et al*. (10 µg), por lo que no presentaron efectos bactericidas, ni individualmente ni en la combinación, dato que además concuerda con la CBM

obtenida experimentalmente (16 mg L^{-1} = 1,28 µg). Por otro lado, otro problema podría ser que las nanopartículas no se dispersen bien en el agar al añadirlas directamente sobre el mismo, ya que Shahverdi *et al*. añadieron las nanopartículas sobre el disco de antibiótico comercial de penicilina G. En el caso de la penicilina, en el ensayo de esta Tesis Doctoral se probaron dos penicilinas G, una mediante un disco comercial, el cual no presentó efectos bactericidas, al contrario de lo observado en el estudio de Shahverdi *et al*. a pesar de que la carga era la misma en ambos estudios; y la otra a partir de una disolución de penicilina G añadida directamente sobre el agar, con una carga final más concentrada, la cual presentó efectos bactericidas [45].

Otros estudios similares también demostraron un aumento de la actividad bactericida de los antimicrobianos mediante métodos de difusión al observar un aumento del diámetro de las zonas de inhibición frente a bacterias como *E. coli, P. aeruginosa o Staphylococcus aureus*. En todos ellos, las nanopartículas, con tamaños entre 5 y 80 nm, tenían una carga final de 5 o 10 µg y se añadieron sobre el disco comercial de los antibióticos o cargando el antibiótico en un disco de papel [46–49,364]; excepto en el estudio de Ali *et al*., en el que añadieron las nanopartículas, con una carga final de 1 µg, sobre un agujero realizado en el agar [340]. Entre estos estudios se encuentran antibióticos de la familia de las penicilinas (amoxicilina [49,340], ampicilina [46,47,340], ácido clavulánico [340]) y de los aminoglucósidos (kanamicina [46,47,49,340], estreptomicina [47,364], tobramicina [340], gentamicina [47,48]), aunque los antibióticos de este último grupo tienen propiedades bactericidas muy diferentes a la apramicina, por lo que es difícil compararlos con los resultados obtenidos en este estudio con apramicina. Asimismo, Kora *et al*., sugirieron que el aumento de la actividad combinada de los antibióticos y de las nanopartículas dependía del recubrimiento de las nanopartículas, demostrando que nanopartículas estabilizadas con PVP favorecían el aumento de los efectos bactericidas en combinación con antibióticos, frente a las nanopartículas estabilizadas con citrato o SDS [364].

Respecto al estudio de la actividad bactericida de combinaciones de antimicrobianos mediante el método del tablero también existen numerosos estudios. Smekalova *et al*. estudiaron los efectos bacteriostáticos de cuarenta combinaciones de distintos antibióticos con nanopartículas de plata de dos tamaños diferentes (8 y 28 nm) frente a seis cepas bacterianas. Una de las combinaciones estudiada fue la de penicilina G con nanopartículas de plata frente a bacterias *E. coli*, determinando efectos bacteriostáticos indiferentes, resultados concordantes con los obtenidos en el ensayo de este capítulo. Estos efectos también se obtuvieron cuando estas combinaciones se estudiaron frente a otras cinco bacterias, entre las que se

encontraban bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Sin embargo, cuando se combinó la penicilina G con las nanopartículas de menor tamaño frente a una cepa de bacterias Gram-negativas (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) se obtuvieron efectos sinérgicos. En este estudio también se combinó amoxicilina, que es un derivado semisintético de la penicilina, con nanopartículas de plata y se obtuvieron los mismos resultados que con la penicilina G [53]. El hecho de que los antibióticos β-lactámicos no mostraran ninguna sinergia con las nanopartículas de plata se basa en que los antibióticos actúan afectando a la integridad de la pared celular bacteriana, por lo que su efecto no se ve influenciado por los cambios en la permeabilidad y la entrada celular del antibiótico [59].

Respecto a los antibióticos de la familia de los aminoglucósidos, como la apramicina, Smekalova *et al*. estudiaron la gentamicina combinada con nanopartículas de plata, y en la combinación con las nanopartículas de mayor tamaño (28 nm) observaron efectos sinérgicos frente a *E. coli* [53]. Asimismo, Hwang *et al*. demostraron efectos bacteriostáticos sinérgicos frente a *E. coli* ATCC 25922 al combinar ampicilina y kanamicina con nanopartículas de plata de 3 nm; y frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853 al combinar cloranfenicol y kanamicina con las mismas nanopartículas [58]. Habash *et al*. demostraron efectos bacteriostáticos sinérgicos o aditivos, en función del tamaño de las nanopartículas que se combinaron con tobramicina, frente a *P. aeruginosa* PAO1. Las nanopartículas menores de 20 nm presentaron efectos sinérgicos mientras que las mayores de ese tamaño, presentaron efectos aditivos. Además, al compararlo con otro estudio similar con aztreonam (antibiótico betalactámico) sugirieron que la sinergia producida por las nanopartículas de plata pequeñas difiere para cada tipo de antibiótico y puede depender del mecanismo de acción del antibiótico [343,344].

3.2.3.3. Identificación y cuantificación de la plata involucrada en la actividad bactericida de las combinaciones antibiótico convencional - material de plata

Los mecanismos de interacción y de sinergia de las nanopartículas de plata con los antibióticos muestran una gran variabilidad en la bibliografía, probablemente debido a las diferencias en las propiedades de las nanopartículas estudiadas en relación con el tamaño, recubrimientos, carga superficial, medios de cultivo… Con el fin de determinar estos mecanismos de acción de las combinaciones de antimicrobianos es necesario conocer tanto la forma química en la que se encuentra la plata durante la incubación de las bacterias como al internalizarse o adsorberse en las paredes de los microorganismos. A su vez, también es importante cuantificar la

plata que ha interaccionado con estas bacterias al combinar antibióticos convencionales con plata y compararlas con muestras que se han expuesto a los mismos antimicrobianos por separado, para intentar explicar el papel bactericida que juega cada uno de ellos.

Para ello, se llevó a cabo la incubación de bacterias *E. coli* con dos combinaciones distintas de apramicina y nanopartículas de plata de 10 nm o plata (I), en las que se mantuvo constante la concentración de plata y variaba la concentración de apramicina (Apartado 3.2.2.4), con el fin de estudiar cómo afectaba la concentración de apramicina a la cantidad de plata internalizada o adsorbida en la pared de las bacterias. Debido a que en las tres cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* se observaron efectos bactericidas sinérgicos al combinar apramicina con plata y no se observaron diferencias muy significativas en los resultados obtenidos para cada una de las cepas (Apartado 3.2.3.2), se decidió utilizar la cepa *E. coli* ATCC 25922 en los siguientes experimentos, ya que ha sido la cepa de referencia que se ha utilizado a lo largo de esta Tesis Doctoral. Las concentraciones de los antimicrobianos elegidas eran menores que aquellas concentraciones que, combinadas, producían efectos bacteriostáticos y bactericidas sinérgicos y, por tanto, se eligieron en función de los índices CIF y CBF obtenidos anteriormente (Apartado 3.2.3.2.2). Adicionalmente, se incubaron las mismas bacterias con los antimicrobianos individuales como controles. No se estudiaron combinaciones de penicilina G con plata debido a que no se observaron efectos sinérgicos en los ensayos previos (Apartado 3.2.3.2).

3.2.3.3.1. Detección y cuantificación de plata en bacterias mediante SC-ICP-MS

Las muestras de cultivos bacterianos con plata y/o antibiótico, previamente diluidas con agua ultrapura, se introdujeron en el sistema ICP-MS y se analizaron mediante SC-ICP-MS para detectar la presencia de plata en las bacterias. Además, se analizó un control de bacterias y un control del medio de incubación.

En las Figura 3.2.11 y Figura 3.2.12 se muestran las distribuciones de masa de plata por bacteria correspondientes a las muestras analizadas. Las distribuciones de los controles del medio de incubación, de bacterias sin exposición a antimicrobianos, así como las bacterias expuestas a dos concentraciones de apramicina (0,25 y 2 mg L^{-1}) fueron muy pequeñas en comparación con el resto de las muestras. Esta plata detectada podría corresponderse con trazas de plata que pudieran contener los reactivos. En estas condiciones de medida, el valor crítico en masa fue 13 ag de plata. Las distribuciones de los controles solamente están representadas en la Figura

3.2.11.c, pero son comunes para el resto de las figuras. Es importante destacar que estas distribuciones no son comparables a las del Capítulo 3.1 debido a que se aplicaron distintos factores de dilución.

Al comparar la distribución de las bacterias expuestas a Ag(I) con las expuestas a apramicina + Ag(I) (Figura 3.2.11) se observó que en la primera de ellas, había una primera distribución más grande de bacterias con masas pequeñas de plata y una segunda distribución más pequeña de bacterias con mayor masa de plata; mientras que en la combinación con apramicina de menor concentración (0,25 mg L^{-1}), la primera distribución había disminuido considerablemente y la segunda había aumentado en magnitud. Esto podría deberse a que la apramicina puede producir una alteración en la pared bacteriana y con esto, facilitar la entrada de una mayor cantidad de plata en las bacterias. Esto justificaría la disminución de la primera distribución y el aumento de la segunda como consecuencia de que las bacterias captaran mayores cantidades de plata. Por el contrario, en la combinación con 2 mg L^{-1} de apramicina, se observó una única distribución más pequeña de bacterias con mayor masa de plata. La disminución de la segunda distribución de la Figura 3.2.11.c respecto de la Figura 3.2.11.b, podría deberse a que, altas concentraciones de apramicina pueden producir un gran daño en las paredes y membranas, el cual sería el responsable de una mayor captación de plata por las bacterias, como se ha comentado. Sin embargo, si el daño causado es muy grande, podría producir a su vez la salida de parte del citosol de la bacteria, y con ello, de la plata que hubiera sido internalizada en el mismo, por lo que disminuiría la concentración de plata detectada mediante SC-ICP-MS.

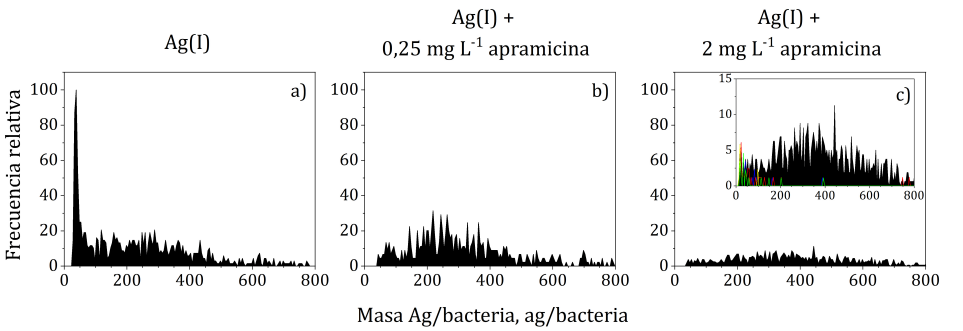


Figura 3.2.11. *Distribuciones de masa de Ag por bacteria medidas mediante SC-ICP-MS para las muestras de bacterias* E. coli *ATCC 25922 expuestas a: a) 0,50 mg L^{-1} Ag(I), b) 0,50 mg L^{-1} Ag(I) + 0,25 mg L^{-1} apramicina, c) 0,50 mg L^{-1} Ag(I) + 2 mg L^{-1} apramicina (negro). Control de medio de incubación (azul). Control de bacterias (rojo). Bacterias expuestas a 0,25 (amarillo) y 2 mg L^{-1} de apramicina (verde).*

En el caso de las combinaciones con apramicina y nanopartículas de plata (Figura 3.2.12) se observaron distribuciones de mayor magnitud en aquellas que contenían apramicina, en comparación con la muestra en la que las bacterias habían sido expuestas solamente a nanopartículas de plata, donde la distribución era ligeramente menor. Esto volvía a demostrar la influencia de la apramicina en relación con la internalización o adsorción de la plata en las bacterias.

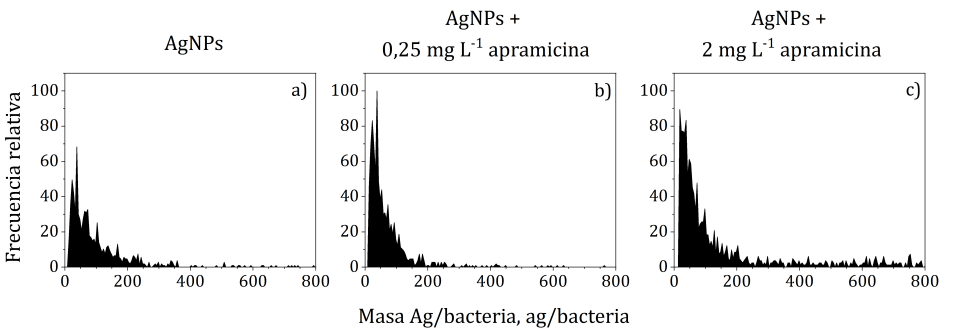


Figura 3.2.12. *Distribuciones de masa de Ag por bacteria medidas mediante SC-ICP-MS para las muestras de bacterias* E. coli *ATCC 25922 expuestas a a) 2 mg L^{-1} AgNPs 10 nm, b) 2 mg L^{-1} AgNPs 10 nm + 0,25 mg L^{-1} apramicina, c) 2 mg L^{-1} AgNPs 10 nm + 2 mg L^{-1} apramicina.*

En la Figura 3.2.13 se muestra la fracción de bacterias que contienen plata respecto al total de bacterias presentes en las suspensiones. Debido a que el método turbidimétrico utilizado para la determinación de la concentración inicial de bacterias no está validado, los resultados obtenidos de porcentaje de bacterias que contenían plata no se consideran valores absolutos, sino que solamente se van a comparar de manera semicuantitativa entre las distintas muestras. Tanto en la combinación de apramicina con Ag(I) como con nanopartículas de plata se observó que al añadir apramicina de 0,25 mg L^{-1}, la fracción de bacterias que contenían plata (internalizada o adsorbida) era similar a la obtenida en ausencia de apramicina, aproximadamente un 3 - 5 %. Por el contrario, al aumentar la concentración de apramicina a 2 mg L^{-1}, la fracción de bacterias que contenían plata aumentó significativamente, hasta un 33% en el caso de la combinación con Ag(I) y un 13% en la de nanopartículas de plata.

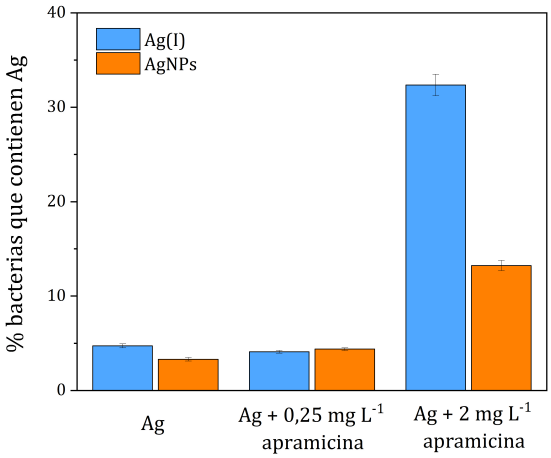


Figura 3.2.13. *Fracción de bacterias* E. coli *ATCC 25922 que contienen plata respecto a las bacterias totales de la suspensión. Ag(I): 0,50 mg* L^{-1}*. AgNPs 10nm: 2 mg* L^{-1}*.*

Mediante un análisis directo, la técnica de SC-ICP-MS permite cuantificar el contenido de plata captado por las bacterias tras la exposición. Los contenidos de plata totales se validaron con los resultados obtenidos tras realizar un ataque ácido a las mismas muestras. En la Tabla 3.2.2 se muestran las cantidades de plata obtenidas mediante el análisis directo SC-ICP-MS y mediante ICP-MS tras el ataque ácido de las muestras. Además, se muestra el porcentaje de plata captada por las bacterias durante la incubación con la plata y apramicina.

El límite de cuantificación obtenido del análisis directo de SC-ICP-MS (calculado como 10 veces la desviación estándar del blanco) fue 3 ng L^{-1}. Teniendo en cuenta la dilución de las muestras, los límites de cuantificación obtenidos referidos a las suspensiones fueron 128 ng L^{-1}. El límite de cuantificación obtenido de la digestión ácida (calculado como 10 veces la desviación estándar del blanco) fue 2 ng L^{-1}. Teniendo en cuenta la dilución de las muestras, los límites de cuantificación obtenidos referidos a las suspensiones fueron 200 ng L^{-1}.

Aplicando un test t con un nivel de confianza del 95% se puede afirmar que el procedimiento de análisis directo mediante SC-ICP-MS da similares resultados a los obtenidos mediante un ataque ácido de las muestras biológicas. No se encontraron diferencias significativas entre ambos métodos. Este procedimiento permite, por tanto, la cuantificación de plata total captada por las bacterias en este tipo de muestras biológicas permitiendo, de forma simultánea, obtener la distribución de la masa de plata captada por cada bacteria individualmente.

Tabla 3.2.2. *Concentración de plata tras el análisis directo mediante SC-ICP-MS y tras ataque ácido; y porcentaje de plata captada por las bacterias* E. coli *ATCC 25922 respecto a la concentración inicial de plata añadida en la incubación (% calculado a partir de la concentración determinada mediante SC-ICP-MS).*

Muestras	**Concentración de plata µg L^{-1}**		**Plata captada por bacterias %**
	Análisis directo SC-ICP-MS	**Digestión ácida ICP-MS**	
Control medio incubación	2,2 ± 0,2	< 0,2	-
Control bacterias *E. coli*	< 0,1	0,3 ± 0,1	-
0,25 mg L^{-1} apramicina	< 0,1	0,5 ± 0,1	-
2 mg L^{-1} apramicina	< 0,1	0,2 ± 0,1	-
Ag(I)	72,0 ± 3,0	73,3 ± 6,5	21,3 ± 0,9
Ag(I) + 0,25 mg L^{-1} apramicina	88,9 ± 0,9	85,6 ± 2,0	32,0 ± 0,3
Ag(I) + 2 mg L^{-1} apramicina	44,8 ± 3,1	40,6 ± 0,6	10,1 ± 0,7
AgNPs	26,5 ± 1,4	25,3 ± 0,9	1,6 ± 0,1
AgNPs + 0,25 mg L^{-1} apramicina	21,9 ± 2,1	21,1 ± 1,3	1,2 ± 0,1
AgNPs + 2 mg L^{-1} apramicina	393,6 ± 22,9	424,3 ± 50,2	21,1 ± 1,3

Al comparar los resultados obtenidos en relación con el porcentaje de plata captada por las bacterias durante la incubación para las distintas combinaciones de apramicina con plata (Tabla 3.2.2), se observaron comportamientos contrarios según la forma de plata utilizada. En el caso de la Ag(I), se obtuvo que al combinarlo con una concentración baja de apramicina (0,25 mg L^{-1}), aumentó significativamente el porcentaje de la plata captada por las bacterias, de un 21% a un 32%, respecto a la ausencia de apramicina, lo que sugiere que la apramicina favorece la captación de la plata. Esto podría deberse a un cambio de permeabilidad en la membrana de las bacterias, que favorece la internalización de plata o su adsorción en la pared modificada o en las proteínas presentes en el espacio periplásmico [231,232]. Teniendo en cuenta los resultados de la Figura 3.2.13, donde no hubo diferencias en la fracción de bacterias que contenían plata (4 - 5 %) en estas muestras, se pudo justificar que el aumento de la cantidad de plata observada en presencia de apramicina se debía a que cada bacteria captaba una mayor cantidad de plata, lo que concordaba con la distribución de masa de plata por bacteria (Figura 3.2.11.b).

Por el contrario, en el caso de la combinación de Ag(I) con una concentración alta de apramicina (2 mg L^{-1}), disminuyó significativamente el porcentaje de plata captada por las bacterias, de un 21% a un 10%; mientras que el porcentaje de bacterias que contenían plata aumentó de un 4,7% a un 33%. Este aumento del porcentaje de bacterias con plata podría justificarse por el daño en la membrana que produciría la apramicina a altas concentraciones, lo que permitiría que la plata se acumulara en las bacterias. Por otro lado, la cantidad de plata captada disminuye porque esta alta concentración de apramicina podría causar perforaciones y un gran daño en la membrana, produciendo la liberación del citosol al medio de cultivo [255] y con ello, de parte de la plata captada por las bacterias. Esta plata liberada no sería cuantificada mediante SC-ICP-MS ya que se perdería durante la centrifugación inicial de la muestra (Apartado 3.2.2.5.6).

En el caso de las nanopartículas de plata, al combinarlas con una concentración baja de apramicina (0,25 mg L^{-1}) se observó que tanto el porcentaje de plata acumulado en las bacterias (1,2 - 1,6 %) (Tabla 3.2.2), como el porcentaje de bacterias que contenían plata (en torno a 3 - 4 %) (Figura 3.2.13) era similar a la situación de incubación en ausencia de apramicina. Esto podría indicar que la presencia de apramicina a esta concentración no afectaba significativamente a la captación de plata por las bacterias. Sin embargo, al aumentar la concentración de apramicina se observó un gran aumento tanto del porcentaje de plata captada por las bacterias, de 1,6% a 21% (Tabla 3.2.2) como de bacterias que contienen plata (de 3% a 13%) (Figura 3.2.13). Con esto se demostró que la captación de la plata procedente de las nanopartículas por parte de las bacterias depende en gran medida de la concentración de apramicina. Estos resultados pueden ser debidos a que el cambio de permeabilidad o la generación de poros en la pared facilitarían la internalización en el citoplasma o la acumulación de plata en el espacio periplásmico y/o una mayor adsorción de la plata en las paredes de las bacterias.

Por otro lado, al comparar el comportamiento de la Ag(I) y las nanopartículas de plata, sin apramicina, en relación con la cantidad de plata captada y de las bacterias que contenían plata, se observó una gran diferencia. En el caso de la exposición de Ag(I), las bacterias captaron un 21% de la plata incubada mientras que, en el caso de las nanopartículas, solamente captaron un 1,6%, a pesar de que la concentración de incubación inicial de la Ag(I) era menor que la de las nanopartículas. Por el contrario, el porcentaje de bacterias que contenían plata era similar en ambos casos (3 - 5 %). Esto indicaba que cuando la plata está principalmente en forma de iones, como en el caso de la Ag(I), las bacterias son capaces de captar más cantidad de plata que en el caso de la exposición a

nanopartículas, como ya se ha visto en secciones previas. Esto podría ser debido a la mayor afinidad electrostática entre la carga negativa de la membrana celular de estas bacterias y la carga positiva de los iones plata, que facilita la interacción y por tanto, la internalización o adsorción en las bacterias.

3.2.3.3.2. Detección y cuantificación de la plata intracelular en bacterias

Para intentar dilucidar el mecanismo de la actividad bactericida de las combinaciones de apramicina con plata, es necesario determinar si la plata detectada en las bacterias se encuentra internalizada o adsorbida en su pared. Por ello, se desarrolló un método para discriminar la plata internalizada en las bacterias de aquella que se encuentra adsorbida o acumulada en el espacio periplásmico, basado en la digestión enzimática de la pared celular con lisozima (Figura 3.2.14). Este método fue adaptado del desarrollado por Dong *et al*. [365]. Mediante este procedimiento, las bacterias *E. coli* tratadas con lisozima pierden la pared celular, quedando en forma de esferoplastos, los cuales se analizaron mediante SC-ICP-MS para cuantificar la plata intracelular. Por otro lado, en los residuos de esta digestión quedan restos de la pared celular, con plata que estaba adsorbida, y el líquido del espacio periplásmico, con plata que estuviera acumulada en él. En el caso de las bacterias Gram-negativas, es necesario usar EDTA y bajas temperaturas para facilitar el paso de la enzima a través de la membrana externa. El EDTA actúa como un quelante que se une a iones divalente como Ca^{2+} y permite la permeabilización de la membrana [366].

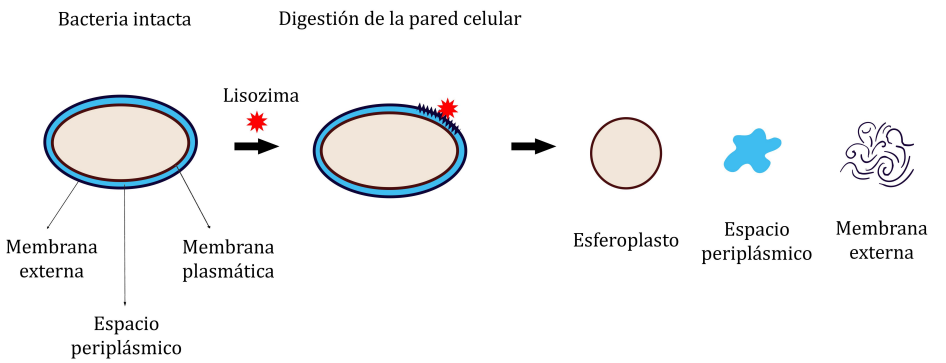


Figura 3.2.14. *Esquema de la digestión enzimática con lisozima.*

Tras aplicar el tratamiento con lisozima, los esferoplastos resultantes se observaron utilizando un microscopio óptico tras realizar una tinción de Gram para comprobar la eficacia del método. En la Figura 3.2.15.a se muestran bacterias *E. coli* sin aplicación de ningún tratamiento, donde se observa que las bacterias mantienen su forma de bacilo. En la Figura 3.2.15.b se muestran los esferoplastos de *E. coli* resultantes del tratamiento con lisozima, los cuales han perdido la pared celular y han adoptado una forma esférica, a la vez que mantienen su integridad.

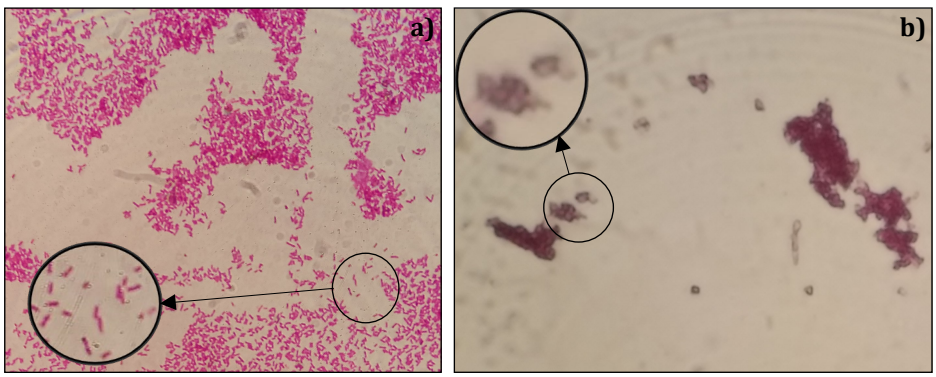


Figura 3.2.15. *a) Bacterias* E. coli *ATCC 25922 con pared celular y b) esferoplastos tras eliminar la membrana externa por tratamiento con lisozima.*

Tras llevar a cabo la eliminación de la pared celular bacteriana mediante el uso de lisozima, los esferoplastos se diluyeron con tampón Tris-HCl 0,01M y se analizaron mediante SC-ICP-MS para cuantificar la plata intracelular de las bacterias. En la Tabla 3.2.3 se recogen las concentraciones de plata intracelular obtenidas mediante el análisis directo de SC-ICP-MS de los esferoplastos y el porcentaje de plata intracelular respecto a la plata total captada por las bacterias (obtenida en la Tabla 3.2.2, Apartado 3.2.3.3.1). Se observó que en el caso de las bacterias incubadas solamente con Ag(I), la plata captada estaba principalmente internalizada en los esferoplastos, mientras que en el caso de las bacterias incubadas con combinaciones de apramicina y Ag(I), el porcentaje de plata internalizada disminuyó hasta un 70 - 80 %. Esto podría ser consecuencia de la disminución de plata intracelular por la liberación de citosol, por la degradación de las bacterias o por la adsorción de la plata en las paredes bacterianas o internalización en el espacio periplásmico.

En el caso de las bacterias incubadas con nanopartículas de plata se observó que el 46% de la plata captada por las bacterias se internalizaba en las mismas. Al añadir

apramicina a la menor concentración (0,25 mg L^{-1}), el porcentaje de plata internalizada aumentaba hasta el 61%, mientras que al añadir la apramicina a la mayor concentración (2 mg L^{-1}), el porcentaje de plata internalizada disminuía hasta el 36%.

El hecho de que las bacterias expuestas a plata (I) internalizasen entre el 70 - 100 % de la plata captada, frente al 30 - 60 % al utilizar nanopartículas de plata, independientemente de la concentración de apramicina, podría deberse al impedimento que presentan las nanopartículas a atravesar la membrana interior debido a su tamaño.

Tabla 3.2.3. *Concentración de plata intracelular tras el análisis directo de los esferoplastos mediante SC-ICP-MS y el porcentaje de plata intracelular respecto a la concentración de plata captada por las bacterias* E. coli *ATCC 25922 (obtenida en la Tabla 3.2.2, Apartado 3.2.3.3.1)*

Muestras de esferoplastos	**Concentración de plata intracelular µg L^{-1}**	**Ag intracelular %**
Control medio incubación	< 0,3	-
Control bacterias	1,7 ± 0,6	-
0,25 mg L^{-1} apramicina	1,0 ± 0,3	-
2 mg L^{-1} apramicina	1,5 ± 0,4	-
Ag(I)	73,0 ± 4,2	101,4 ± 5,8
Ag(I) + 0,25 mg L^{-1} apramicina	63,2 ± 4,7	71,1 ± 5,3
Ag(I) + 2 mg L^{-1} apramicina	36,5 ± 2,7	81,6 ± 6,1
AgNPs	12,1 ± 1,0	45,8 ± 3,6
AgNPs + 0,25 mg L^{-1} apramicina	13,4 ± 1,0	61,1 ± 4,6
AgNPs + 2 mg L^{-1} apramicina	142,0 ± 8,4	36,0 ± 2,1

LOQ = 0,3 µg L^{-1}

Para validar los contenidos de plata intracelular obtenidos mediante análisis directo por SC-ICP-MS de los esferoplastos resultantes de la digestión con lisozima, se llevó a cabo una digestión ácida de estos esferoplastos y su posterior medida mediante ICP-MS. Adicionalmente, los sobrenadantes que contenían los restos de la membrana y los componentes del espacio periplásmico se atacaron con una digestión ácida y se midieron para cuantificar la plata adsorbida en la pared o que se

encontraba en el espacio periplásmico. En la Tabla 3.2.4 se recogen las concentraciones de plata intracelular y de la plata adsorbida en la pared/espacio periplásmico obtenidas tras el ataque ácido, así como los porcentajes de plata que representan respecto a la concentración de plata total captada por las bacterias (obtenida en la Tabla 3.2.2, Apartado 3.2.3.3.1). Aplicando un test t con un nivel de confianza del 95% se puede afirmar que el procedimiento de análisis directo mediante SC-ICP-MS da similares resultados a los obtenidos mediante un ataque ácido de los esferoplastos. No se encontraron diferencias significativas entre ambos métodos.

Tabla 3.2.4. *Concentración de plata intracelular y de plata adsorbida en la pared o en el espacio periplásmico tras la digestión con lisozima y posterior ataque ácido, y el porcentaje que representan respecto a la concentración de plata total captada por las bacterias* E. coli *ATCC 25922 (obtenida en la Tabla 3.2.2, Apartado 3.2.3.3.1).*

Muestras de esferoplastos	**Ag intracelular**		**Ag adsorbida pared/ espacio periplásmico**		**Ag total %**
	Concentración de plata µg L^{-1}	**Ag intracelular %**	**Concentración de plata µg L^{-1}**	**Ag adsorbida %**	
Control medio incubación	0,7 ± 0,6	-	0,2 ± 0,1	-	
Control bacterias	0,8 ± 0,1	-	< 0,2	-	
0,25 mg L^{-1} apramicina	0,5 ± 0,1	-	< 0,2	-	
2 mg L^{-1} apramicina	0,2 ± 0,1	-	< 0,2	-	
Ag(I)	75,1 ± 3,6	102,5± 4,9	2,6 ± 0,1	3,5 ± 0,1	106,0 ± 4,9
Ag(I) + 0,25 mg L^{-1} apramicina	63,6 ± 7,7	74,3 ± 9,0	6,3 ± 1,4	7,3 ± 1,6	81,6 ± 9,1
Ag(I) + 2 mg L^{-1} apramicina	34,5 ± 2,8	85,1 ± 6,9	3,3 ± 0,5	8,1 ± 1,1	93,2 ± 7,0
AgNPs	11,1 ± 0,9	43,9 ± 3,5	0,3 ± 0,1	1,1 ± 0,3	45,0 ± 3,5
AgNPs + 0,25 mg L^{-1} apramicina	11,9 ± 1,8	56,5 ± 8,7	< 0,2	< 0,9	56,5 ± 8,7
AgNPs + 2 mg L^{-1} apramicina	136,2 ± 17,7	32,1 ± 4,2	107,7 ± 16,6	25,4 ± 3,9	57,5 ± 5,7

LOQ = 0,2 µg L^{-1}

Debido a que la suma de las concentraciones de la plata intracelular y de la plata adsorbida en la pared/espacio periplásmico (Tabla 3.2.4) no coincide con la concentración de la plata total captada (Tabla 3.2.2 Apartado 3.2.3.3.1), especialmente en las muestras con nanopartículas, se llevó a cabo un ensayo de adición estándar para comprobar si la matriz afectaba a la recuperación de la plata. Para ello, tras realizar la digestión con lisozima de unos controles de bacterias se adicionó Ag(I) a los esferoplastos y a los sobrenadantes y se sometieron a ataque ácido. Las recuperaciones obtenidas fueron del 87 ± 4 % y 78 ± 3 %, respectivamente. Teniendo en cuenta la complejidad de las muestras biológicas y de la matriz resultante de la digestión con lisozima, se consideró que las recuperaciones fueron aceptables.

En el caso de las bacterias expuestas a Ag(I) y sus combinaciones con apramicina, la suma de las concentraciones de la plata intracelular y de la plata adsorbida en la pared/espacio periplásmico era un 82 - 106 % de la plata total captada. Comparando estos resultados con los obtenidos en los ensayos de adición, estos datos se pueden considerar dentro de la incertidumbre del método y por tanto, considerarse válidos. Por lo tanto, se confirma que en las situaciones en las que se incuban bacterias con Ag(I) se consigue determinar cuantitativamente la biodistribución de las especies de plata satisfactoriamente. Por el contrario, en el caso de las bacterias expuestas a nanopartículas de plata y sus combinaciones con apramicina, la suma de estas concentraciones representa solamente un 45 - 58 % de la plata total captada por las bacterias. Esto puede deberse a que el resto de la plata, en forma de nanopartículas, se encontraba adsorbida en la pared antes de la digestión con lisozima, y parte de esta plata se hubiera perdido durante el procedimiento debido a que durante el proceso se realizaron varios pasos de lavados y centrifugación.

Dong *et al*. estudiaron la biodistribución de la plata en las bacterias mediante cromatografía por exclusión de tamaño acoplada a ICP-MS tras una digestión enzimática con lisozima y, obtuvieron que tras incubar bacterias *E. coli* JCM 1649 con iones plata y nanopartículas de plata de 10 y 30 nm estabilizadas con citrato, la plata incubada se encontraba predominantemente adsorbida en la pared de las bacterias (25 - 64 %), y solamente una pequeña proporción de la plata se había internalizado (6 - 15 %). El resto de la plata incubada (24 - 60 %) no había interaccionado con las bacterias y se había eliminado durante los lavados iniciales tras la incubación [72]. Por el contrario, en nuestro estudio se observó que la mayor parte de la plata incubada estaba en el interior de las bacterias (1 - 20 %), mientras que menos del 6 % de la plata se encontraba adsorbida en la pared de las bacterias en todos los casos.

En el caso de la incubación con nanopartículas y sus combinaciones con apramicina, el porcentaje de plata adsorbida en la pared podría ser mayor, ya que como se ha visto, parte de la plata no se había podido cuantificar.

Por otro lado, Long *et al*. determinaron la biodistribución de plata en bacterias *E. coli* MG 1655 expuestas a iones plata y nanopartículas de plata de 10 nm estabilizadas con citrato, mediante un procedimiento de lisis celular y posterior separación de las fracciones de la membrana y el citoplasma y cuantificación mediante ICP-MS, y obtuvieron mayores niveles de plata en el citoplasma que en la membrana. En el caso de las nanopartículas, determinaron que aproximadamente un 70% de la plata captada estaba internalizada y un 30% se encontraba en la membrana, mientras que en el caso de la incubación con iones plata, aproximadamente un 55% de la plata se encontraba en el citoplasma y un 45% en la membrana [292]. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos en nuestros ensayos. Los autores concluyeron que la plata puede adsorberse en la membrana tanto en forma iónica como particulada, y penetrar en las bacterias. La plata intracelular sería la responsable del daño oxidativo y la inhibición de procesos como el de la cadena respiratoria [292].

Además de los resultados cuantitativos obtenidos mediante SC-ICP-MS, se obtuvieron las distribuciones de masa de plata por esferoplasto correspondientes con las muestras tras la digestión con lisozima. En la Figura 3.2.16 y Figura 3.2.17 se muestran estas distribuciones obtenidas mediante SC-ICP-MS. Las distribuciones de los controles del medio de incubación de los esferoplastos obtenidos de bacterias sin exposición a antimicrobianos, así como de aquellos procedentes de las bacterias expuestas a las dos concentraciones de apramicina (0,25 y 2 mg L^{-1}) fueron muy pequeñas en comparación con el resto de las muestras. La plata detectada en estos casos podría estar relacionada con las trazas de plata que pudieran contener los reactivos. En estas condiciones de medida, el valor crítico en masa fue 24 - 32 ag de plata. Este valor es mayor que en el Apartado 3.2.3.3.1 debido a que el medio final era Tris-HCl y los valores de línea base obtenidos eran mayores que en agua.

En primer lugar, se compararon las distribuciones de esferoplastos procedentes de las bacterias digeridas con lisozima expuestas a Ag(I) con las expuestas a apramicina + Ag(I) (distribuciones grises) (Figura 3.2.16). Las tres distribuciones, presentan el mismo perfil, pero con distinta magnitud. Al comparar las distribuciones de las bacterias (negras) con las de los correspondientes esferoplastos (grises), se observó que en el caso de las bacterias expuestas a Ag(I) (Figura 3.2.16.a) se obtuvieron perfiles ligeramente diferentes. La acción de la lisozima, que degrada la pared externa y separa el espacio periplásmico de las

bacterias, conlleva a su vez una pérdida de la plata asociada a estas fracciones, por lo que la cantidad y distribución de plata por esferoplasto fue distinta a la de las bacterias originales. La recuperación de esferoplastos expuestos a Ag(I) calculada a partir de las bacterias que contenían plata cuantificadas mediante SC-ICP-MS (Apartado 3.2.3.3.1) fue del 85 ± 2 %. Al comparar las muestras expuestas a ambas concentraciones de apramicina (Figura 3.2.16.b y Figura 3.2.16.c), se observó que, tras el tratamiento con lisozima, se obtuvo una primera distribución de esferoplastos con menos plata y una segunda distribución con mayor cantidad de plata. Aparentemente, la apramicina estaría favoreciendo la adsorción de la plata en las paredes de las bacterias o su acumulación en el espacio periplásmico, por lo que tras la acción de la lisozima los esferoplastos detectados contendrían menos plata. Este hecho justificaría la presencia de la primera distribución. Por otra parte, y como hipótesis alternativa, la pared celular y la membrana plasmática de las bacterias tratadas con apramicina podría estar tan dañada que, tras la digestión con lisozima, una fracción de esferoplastos no fuera lo suficientemente estable, produciendo la consiguiente degradación de la bacteria y con ello, la liberación de la plata captada. Esta plata liberada al medio no se cuantificaría mediante SC-ICP-MS debido a que se eliminaría durante los pasos previos de lavado.

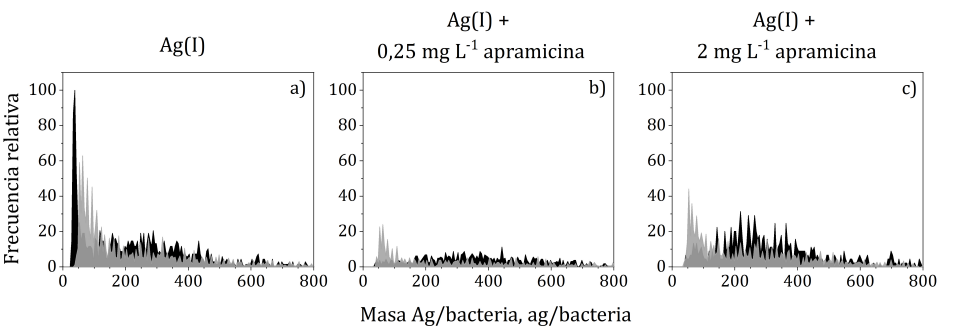


Figura 3.2.16. *Distribuciones de masa de Ag por biopartícula: bacteria íntegra (negro), esferoplasto (gris) medidas mediante SC-ICP-MS. Bacterias* E. coli *ATCC 25922 expuestas a a) 0,50 mg L^{-1} Ag(I), b) 0,50 mg L^{-1} Ag(I) + 0,25 mg L^{-1} apramicina, c) 0,50 mg L^{-1} Ag(I) + 2 mg L^{-1} apramicina.*

Respecto a las muestras expuestas a nanopartículas de plata y las combinaciones con apramicina (Figura 3.2.17) se observó el mismo perfil de las distribuciones, aunque con distinta magnitud para las distintas distribuciones de esferoplastos (distribuciones grises). En este caso, en la combinación de nanopartículas de plata con la concentración más alta de apramicina (2 mg L^{-1}) se obtuvo la distribución con mayor magnitud, mientras que para la combinación con una concentración pequeña de apramicina y en la que sólo se expusieron a nanopartículas de plata, se obtuvieron distribuciones de un tamaño similar. Al comparar las distribuciones de las bacterias (negras) con los correspondientes esferoplastos (grises), se obtuvieron los mismos perfiles, con una única distribución correspondiente a bacterias con menores cantidades de plata, siendo significativamente menores las distribuciones correspondientes a esferoplastos. Esta disminución podría indicar que la plata en las bacterias se encontraría principalmente en la fracción de la plata adsorbida a la pared celular o en el espacio periplásmico, la cual se liberaría al medio por acción de la lisozima. Este hecho es concordante con los resultados cuantitativos obtenidos mediante SC-ICP-MS (Tabla 3.2.3), los cuales indicaban que solamente un 30 - 60 % de la plata captada se encontraba internalizada en los esferoplastos.

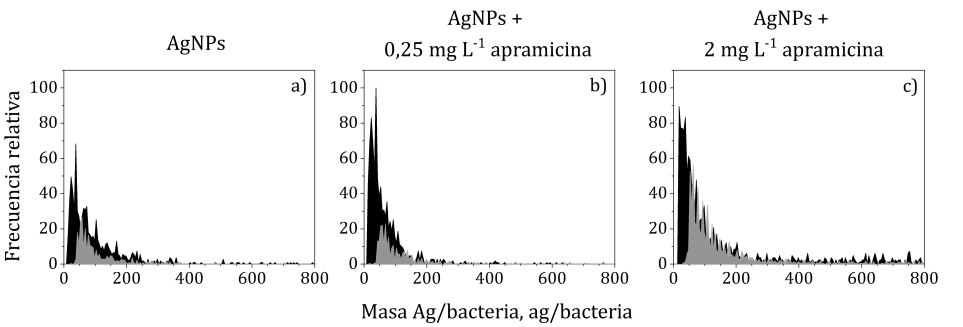


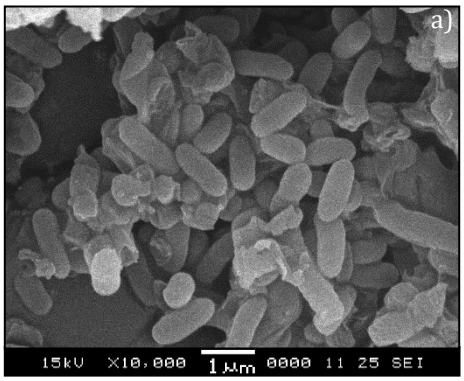
Figura 3.2.17. *Distribuciones de masa de Ag por biopartícula: bacteria íntegra (negro), esferoplasto (gris). Bacterias* E. coli *ATCC 25922 expuestas a a) 2 mg L^{-1} AgNPs, b) 2 mg L^{-1} AgNPs + 0,25 mg L^{-1} apramicina, c) 2 mg L^{-1} AgNPs + 2 mg L^{-1} apramicina.*

3.2.3.3.3. Detección de posibles alteraciones estructurales de las bacterias mediante SEM y TEM

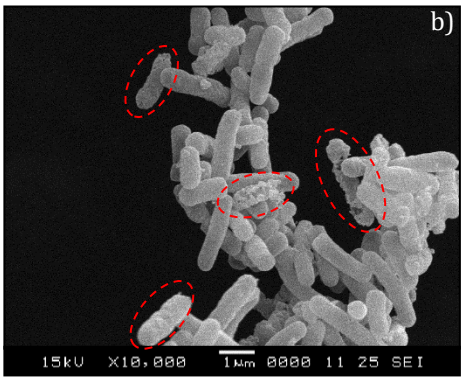
Con el objetivo de observar las posibles alteraciones de la pared de las bacterias como consecuencia de la presencia de apramicina o de plata, las muestras se estudiaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM).

En la Figura 3.2.18 se muestran las imágenes de SEM de las muestras de bacterias control y las incubadas con apramicina y nanopartículas, individualmente y combinadas. En el caso de las bacterias control se observó que mantenían intacta su estructura y que la superficie de la pared era lisa (Figura 3.2.18.a). En presencia de apramicina (2 mg L^{-1}) (Figura 3.2.18.b) se observó que las bacterias mantenían su forma de bacilo, pero la pared estaba dañada en gran parte de ellas como consecuencia del efecto bactericida del antibiótico, observándose que la superficie de la pared se había vuelto rugosa y presentaba poros, o incluso faltaban trozos de pared en los casos de daños más severos. En el caso de la presencia de nanopartículas de plata (2 mg L^{-1}) (Figura 3.2.18.c), la pared de las bacterias no se observaba tan dañada como en presencia del antibiótico, aunque también se observó cierta rugosidad en su superficie. Por último, cuando las bacterias se incubaron con la combinación de 2 mg L^{-1} de apramicina + 2 mg L^{-1} de nanopartículas de plata (Figura 3.2.18.d) se observó que la mayoría de las bacterias tenían la pared muy dañada y la superficie rugosa, la aparición de poros o incluso que la pared estaba fragmentada. Los círculos rojos de la Figura 3.2.18 muestran ejemplos de bacterias con la pared rugosa, fragmentada o alterada y bacterias deformadas.

Control bacterias



2 mg L^{-1} apramicina



2 mg L^{-1} AgNPs 10 nm 2 mg L^{-1} apramicina + 2 mg L^{-1} AgNPs 10 nm

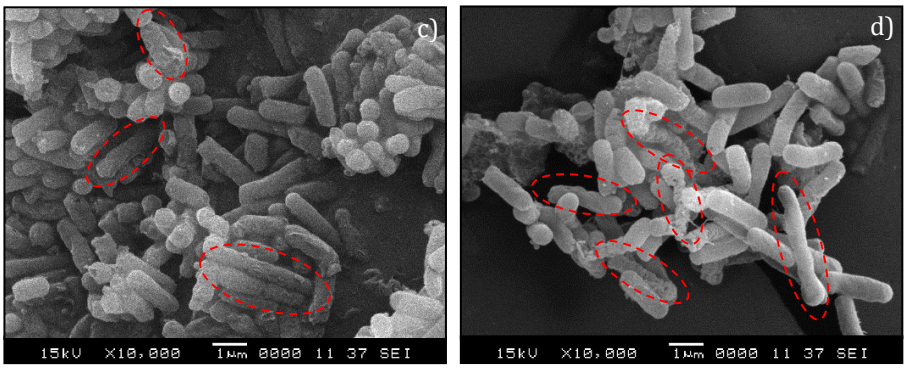


Figura 3.2.18. *Imágenes SEM (10.000x) de las bacterias* E. coli *ATCC 25922 a) control y expuestas a: b) 2 mg L^{-1} apramicina; c) 2 mg L^{-1} AgNPs 10 nm; d) 2 mg L^{-1} apramicina + 2 mg L^{-1} AgNPs 10 nm. Círculos rojos: bacterias con la pared rugosa, deformadas o con alteración en la pared.*

En la Figura 3.2.19 se muestran las imágenes de TEM de las mismas muestras observadas mediante SEM. En el caso de las bacterias control se observó que mantenían intacta la doble membrana y la forma ovalada de las bacterias, así como una homogeneidad del citoplasma en el interior de la bacteria (Figura 3.2.19.a). En presencia de apramicina (2 mg L^{-1}) (Figura 3.2.19.b) se observó un gran daño en la estructura de las bacterias, en las que la doble membrana estaba completamente rota o plegada sobre sí misma, e incluso se había perdido el contenido del citoplasma. En otros casos, la forma de la bacteria se había alterado y se observaron irregularidades en la estructura de la membrana. En el caso de la presencia de nanopartículas de plata (2 mg L^{-1}) (Figura 3.2.19.c y d), también se observó que la membrana estaba rota y plegada sobre sí misma o irregularidades en la membrana. Además, se observó la contracción del citoplasma en algunas bacterias y una heterogeneidad del mismo (zonas blancas y grises), en comparación con la bacteria control. Por último, cuando las bacterias se incubaron con la combinación de 2 mg L^{-1} de apramicina + 2 mg L^{-1} de nanopartículas de plata (Figura 3.2.19.e y f) se observó que la membrana estaba dañada, así como una alteración de la forma de las bacterias y la contracción y heterogeneidad del citoplasma. Además, se observó la rotura de la membrana, la liberación de citoplasma por ciertas zonas de la membrana y la deformación de las bacterias. Los círculos rojos de la Figura 3.2.19 muestran la rotura de la doble membrana y la liberación del contenido del citoplasma, mientras que las flechas rojas indican la contracción y heterogeneidad del citoplasma.

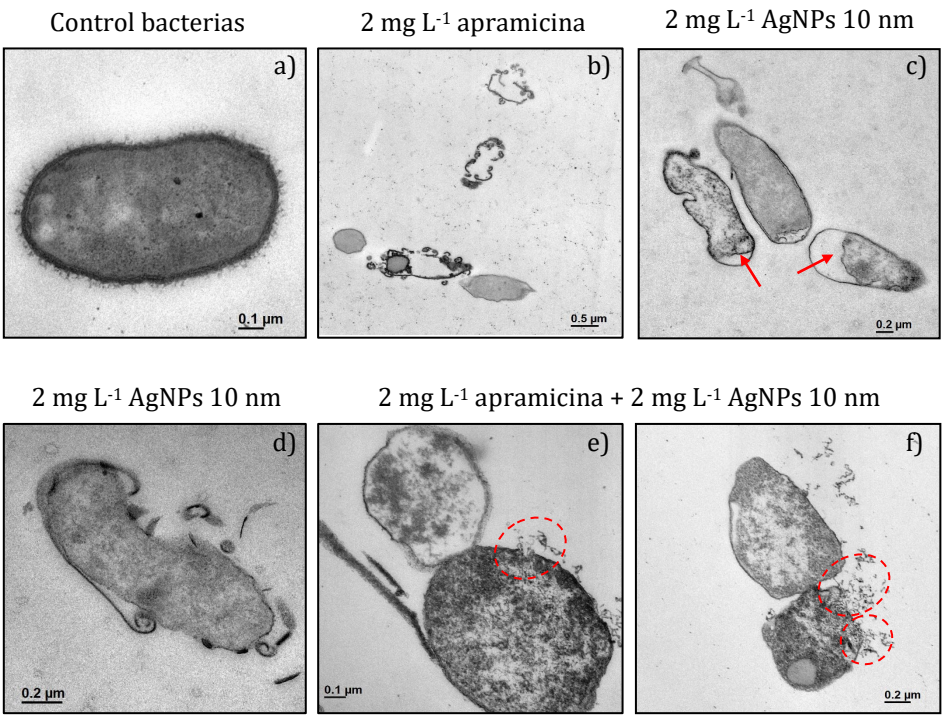


Figura 3.2.19. *Imágenes TEM (25.000x - 100.000x) de las bacterias E. coli ATCC 25922 a) control y expuestas a: b) 2 mg L-1 apramicina; c, d) 2 mg L-1 AgNPs 10 nm; e, f) 2 mg L-1 apramicina + 2 mg L-1 AgNPs 10 nm. Círculos rojos: rotura de la membrana y liberación del citoplasma. Flechas rojas: contracción y heterogeneidad del citoplasma.*

La alteración de la integridad de la pared bacteriana, la rugosidad de la pared y la formación de poros en las bacterias *E. coli* como consecuencia del efecto bactericida de las nanopartículas de plata se observó mediante SEM en otros estudios como los realizados por Li *et al*. y Biao *et al*. [254,290]. Estudios de TEM han demostrado una ampliación del espacio periplásmico en bacterias *E. coli* que sugieren la contracción de la membrana interna y su desprendimiento de la pared celular [231], así como la alteración de la estructura, la rotura de la membrana externa y la liberación del citoplasma [255,256,290]. Estas observaciones demostraron uno de los mecanismos de la actividad bactericida de las nanopartículas de plata más observados en la bibliografía, consistente en la interacción de las nanopartículas con la pared de las bacterias, causando perforaciones, cambios estructurales y la contracción del citoplasma, así como cambios en la permeabilidad de la membrana que favorece la entrada de las nanopartículas y de los iones plata al interior de las bacterias o su adhesión a las

paredes, como se demostró previamente en el Apartado 3.1.3.5 en el caso de las nanopartículas de plata de 10 nm.

A su vez, la alteración de la membrana externa producida por la apramicina concuerda con las observaciones demostradas tras la exposición de *P. aeruginosa* con otros aminoglucósidos como gentamicina y tobramicina [341,367], lo que corrobora el mecanismo de alteración de la membrana producida por estos antibióticos. Habash *et al*. observaron irregularidades en la distribución de los contenidos de la membrana y desprendimiento del citosol en bacterias *P. aeruginosa* al combinar tobramicina y nanopartículas de plata [343,344], lo que concuerda con los datos observados mediante SEM y TEM en este estudio, y corrobora el mecanismo de acción de alteración de la membrana externa al combinar aminoglucósidos y nanopartículas de plata.

3.2.3.4. Estudio de los mecanismos de acción de las combinaciones antibiótico convencional – plata

Tras evaluar la actividad bactericida de las combinaciones de apramicina con los antimicrobianos de plata, el método analítico basado en SC-ICP-MS desarrollado para determinar la biodistribución de la plata, se ha aplicado en bacterias incubadas con las combinaciones de antimicrobianos para determinar los mecanismos de acción involucrados en la actividad bactericida sinérgica de dichas combinaciones. Para ello, hay que tener en cuenta los mecanismos de acción de los antimicrobianos individualmente. Teniendo en cuenta los resultados que se han obtenido a lo largo de este capítulo 3.2, se ha determinado mediante SC-ICP-MS que al combinar plata (I) con una concentración baja de apramicina (0,25 mg L^{-1}), las bacterias captaron un 32% de plata añadida al cultivo, mientras que las bacterias en ausencia de apramicina captaron un 21% (Tabla 3.2.2). Respecto a la fracción de bacterias que contenían plata, en ambas situaciones fue similar (Figura 3.2.13). Estos hechos indicaron que la apramicina favorece la captación de más cantidad de plata por las bacterias que ya habían captado plata en ausencia de apramicina, probablemente como consecuencia de las alteraciones de la membrana, observadas mediante SEM y TEM (Apartado 3.2.3.3.3) y como se ha demostrado en otros estudios con aminoglucósidos [341,367]. Esto concuerda con las distribuciones obtenidas mediante SC-ICP-MS (Figura 3.2.11.a y b), donde se observó que en ausencia de apramicina había una primera distribución de bacterias que habían captado pequeñas cantidades de plata y una segunda distribución de bacterias con mayores cantidades. Por su parte, en presencia de concentraciones bajas de apramicina, la

primera distribución había desaparecido como consecuencia de que las bacterias habían captado mayores cantidades de plata debido a la alteración de la membrana, observándose un aumento de la segunda distribución. Respecto a la biodistribución de la plata, tras someter a las bacterias a una digestión con lisozima seguida de un análisis mediante SC-ICP-MS, se observó que las bacterias incubadas con 0,25 mg L^{-1} de apramicina habían internalizado sólo un 71% de la plata (I) captada, mientras que en ausencia de apramicina, la plata estaba principalmente internalizada (Tabla 3.2.3). Estas diferencias podrían ser debidas a procesos asociados a la membrana favorecidos por la apramicina, por los cuales la plata se quedaría adsorbida en la pared o acumulada en el especio periplásmico. Esta plata adsorbida supuso un 7% de la plata captada por las bacterias, el doble de la cuantificada en ausencia de apramicina (Tabla 3.2.4).

En el caso de la combinación de plata (I) con una mayor concentración de apramicina (2 mg L^{-1}), el porcentaje de plata captada disminuyó del 21 al 10% (Tabla 3.2.2), en comparación con ausencia de apramicina; mientras que el porcentaje de bacterias que contenían plata aumentó del 5 al 33% (Figura 3.2.13). Como se ha visto en las imágenes de TEM y SEM (Apartado 3.2.3.3.3), la apramicina causó alteraciones en la membrana exterior de las bacterias, produciendo perforaciones que facilitarían tanto la internalización de plata como de otras moléculas de apramicina, así como la salida de parte del citosol. Por un lado, estos hechos justificarían el aumento de bacterias que contienen plata debido a que la apramicina favorece su captación. Por otro lado, si el daño en la pared celular es muy grande, se puede producir la liberación de parte del citosol, y con ello, de la plata captada por las bacterias, lo que justificaría la disminución de la concentración de plata cuantificada mediante SC-ICP-MS. Esta plata liberada se perdería en la centrifugación inicial durante la preparación para la medida mediante SC-ICP-MS, por lo que plata captada estaría subestimada. Respecto a la plata intracelular, se determinó que el 82% de la plata captada estaría internalizada (Tabla 3.2.3). Este resultado es concordante con el obtenido para una concentración baja de apramicina, lo que puede ser consecuencia de que la apramicina favorece los procesos asociados a la membrana por los que la plata se adsorbería en la pared o se acumularía en el espacio periplásmico. En este caso se determinó que el 8% de la plata captada se encontraba en la fracción asociada a la pared y al espacio periplásmico (Tabla 3.2.4).

Tras analizar estos resultados, se puede proponer un mecanismo de acción bactericida asociado a los efectos sinérgicos por la combinación de plata (I) con apramicina. Inicialmente los iones plata podrían interaccionar con la pared bacteriana y producir una alteración de la membrana externa, favoreciendo la

entrada de moléculas de apramicina y de iones plata al interior de la bacteria. Una vez en el interior, tanto la apramicina como los iones se unirían a los ribosomas, lo cual produciría proteínas dañadas o mal plegadas que se incorporarían y alterarían la organización de la membrana [335]. Esto, a su vez, favorecería la entrada masiva de más moléculas de apramicina y de iones plata [232]. Estos iones también actuarían mediante sus mecanismos enlazándose a biomoléculas como proteínas o el ADN, e inhibiendo procesos como la cadena respiratoria o la síntesis de ATP. La combinación de estos efectos bactericidas de la apramicina y de los iones producirían daños severos en los procesos biológicos y la rotura de la pared bacteriana, que producirían a su vez, la muerte de las bacterias. Como se ha visto en el Apartado 3.2.3.2, estos mecanismos de sinergia surgen tras la combinación de concentraciones de apramicina y de plata (I) menores que la CIM y CBM individual de cada uno de los antimicrobianos, donde se observó que estas combinaciones mantenían los efectos individuales de los antimicrobianos produciendo la muerte de las bacterias, mientras que, por separado, esas concentraciones no tenían efectos bactericidas.

En el caso de la combinación de nanopartículas de plata con apramicina, al añadir una concentración baja de apramicina (0,25 mg L^{-1}), el porcentaje de plata captada por las bacterias era similar que en ausencia de apramicina (1,2 - 1,6 %) (Tabla 3.2.2). Asimismo, la fracción de bacterias que contenían plata también era similar (3 - 4 %) (Figura 3.2.13). Esto indicaría que esta concentración de apramicina no afectaría a la captación de plata a partir de nanopartículas. Por el contrario, en la combinación con una concentración alta de apramicina (2 mg L^{-1}), el porcentaje de plata captada aumentó hasta el 21% (Tabla 3.2.2) y la fracción de bacterias que contenían plata hasta el 13% (Figura 3.2.13). Como se ha visto en las imágenes de TEM y SEM (Apartado 3.2.3.3.3), tanto la apramicina como las nanopartículas producen una gran alteración en la pared bacteriana, lo cual permitiría la captación de una mayor cantidad de plata. Respecto a la biodistribución de la plata, se determinó que solamente un 40 - 60 % de la plata se encontraba internalizada. El resto de la plata estaría adsorbida en las paredes de las bacterias o acumulada en el espacio periplásmico, aunque esta plata no se ha podido cuantificar mediante ICP-MS, probablemente porque la mayor parte de las nanopartículas adsorbidas se podrían haber perdido durante la centrifugación en el proceso de digestión con lisozima. Esta relación entre la plata adsorbida y la plata intracelular estaría justificada por el mayor tamaño de las nanopartículas, las cuales tienen un mayor impedimento para internalizarse, en comparación con los iones plata.

De nuevo, tras analizar estos resultados, se puede proponer un mecanismo de acción bactericida asociado a los efectos sinérgicos por la combinación de

nanopartículas de plata con apramicina. Inicialmente las nanopartículas de plata interaccionarían con la pared bacteriana y se adsorberían en ella, produciendo una alteración y aumento de la permeabilidad de la membrana. En esta interacción de las nanopartículas con las bacterias, las nanopartículas podrían liberar iones plata, los cuales podrían producir una mayor alteración de la membrana. Esta alteración favorecería la entrada de la apramicina y de plata, que se enlazarían con los ribosomas, inhibiendo la síntesis de proteínas y produciendo proteínas dañadas que se incorporarían y alterarían la membrana [232,335,340]. Esto a su vez, favorecería una mayor entrada de la apramicina y de la plata, y se activarían los mecanismos propios de cada antimicrobiano, los cuales producirían daños severos en las bacterias, y con ello, su muerte. Vazquez-Muñoz *et al*. sugirieron que la actividad antimicrobiana de las combinaciones de antibiótico - nanopartículas de plata es principalmente por la alteración de la estructura celular más que por la interacción directa antibiótico-nanopartículas [59], lo cual está en concordancia con lo sugerido en el presente estudio. Estos mecanismos de sinergia surgen tras la combinación de concentraciones de apramicina y de nanopartículas de plata menores que la CIM y CBM individual de cada uno de los antimicrobianos. En el Apartado 3.2.3.2, se observó que estas combinaciones mantenían los efectos individuales de los antimicrobianos produciendo la muerte de las bacterias, mientras que, de forma individual, esas concentraciones no presentaron efectos bactericidas.

Tanto la combinación de plata (I) como de nanopartículas de plata con la apramicina ha permitido la reducción de las concentraciones de los tres antimicrobianos, a la vez que se han mantenido los efectos bactericidas de cada uno de los antimicrobianos individualmente. En el caso de la combinación de plata (I) con apramicina se obtuvo una mayor reducción de las concentraciones de ambos antimicrobianos, mientras que en presencia de las nanopartículas de plata, la reducción fue ligeramente menor (Apartado 3.2.3.2.2). Esto está en concordancia con lo observado en la determinación de la actividad bactericida individual de la plata (I) y de las nanopartículas de plata de 10 nm en bacterias *E. coli* ATCC 25922, donde se obtuvieron mayores efectos bactericidas en el caso de la plata (I) (Apartado 3.2.3.1). En la bibliografía, la mayoría de los autores concluyen que los iones plata presentan una actividad bactericida mayor que las nanopartículas de plata y que los iones plata juegan un papel importante en la actividad bactericida de las nanopartículas [247]. Sin embargo, las nanopartículas podrían considerarse una fuente de iones plata y una especie más estable que la plata iónica procedente de sales inorgánicas como $AgNO_3$. La actividad bactericida de esta plata (I) y de las nanopartículas podrían reducirse por la presencia de ligandos presentes en los medios como Cl^-, S^{2-}, cisteína o fosfatos. Xiu et al. demostraron que la presencia de iones cloruro redujo la actividad

bactericida de la plata (I) en torno a un 55% mientras que la de las nanopartículas solamente se redujo un 9%. En presencia de ligandos como cisteína y sulfuros, la toxicidad de la plata se mitiga completamente por la precipitación de la plata. En presencia de fosfato también se redujo significativamente. Esta reducción podría explicar los estudios en los que la actividad bactericida de las nanopartículas es mayor que la de los iones plata a concentraciones equivalentes [320]. Por tanto, las nanopartículas podrían convertirse en un medio más eficaz para administrar iones plata a los microorganismos cuando la biodisponibilidad de los iones se reduce por complejación o precipitación con ligandos comunes.

3.2.4. CONCLUSIONES

La combinación de una metodología analítica basada en el uso de ICP-MS junto a una metodología microbiológica ha permitido evaluar y determinar los efectos bactericidas sinérgicos de distintas combinaciones de plata con antibióticos convencionales, así como los mecanismos de acción asociados a estos efectos bactericidas.

Se ha evaluado la actividad bactericida individual y combinada de la plata (I), nanopartículas de plata de 10 nm, penicilina G y apramicina frente a bacterias *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *P. aeruginosa* PAO1. En ninguna de las combinaciones de penicilina G con plata se observaron efectos sinérgicos, por lo que se descartó su utilización en posteriores experimentos. Por el contrario, en el caso de la combinación de apramicina con plata (I) se observaron efectos bactericidas sinérgicos frente a las tres cepas, permitiendo reducir la concentración de apramicina hasta 8 - 64 veces y de la plata (I) hasta 16 - 64 veces. En el caso de la combinación de apramicina con nanopartículas de plata también se observaron estos efectos sinérgicos frente a las tres cepas, con reducción de la concentración de apramicina hasta 4 veces y la de nanopartículas hasta 4 - 8 veces, preservando el efecto bactericida individual de los antimicrobianos.

El desarrollo de un método analítico basado en SC-ICP-MS ha permitido detectar y cuantificar directamente la plata presente en bacterias *E. coli* ATCC 25922 que previamente habían sido incubadas con combinaciones de apramicina y plata (I) o nanopartículas de plata de 10 nm. Además, la técnica de SC-ICP-MS complementada con procedimientos de digestión enzimática con lisozima ha permitido estudiar la biodistribución de estas especies de plata y cuantificar la plata intracelular presente. En el caso de la incubación de bacterias con plata (I), se ha determinado que la plata

captada se encontraba principalmente internalizada en las bacterias, mientras que, en el caso de la incubación con nanopartículas de plata de 10 nm, solamente un 45 % de la plata lo estaba. Esto justifica un mecanismo de acción bactericida combinado ion-partícula, por el cual las nanopartículas, en primer lugar, interaccionan con la pared de las bacterias. Tras esto, las nanopartículas podrían adsorberse en la pared, internalizarse en el espacio periplásmico y en el citoplasma y liberar iones por la oxidación de su superficie.

Por otro lado, en la combinación de apramicina con plata (I) se ha determinado mediante SC-ICP-MS que la presencia de apramicina favorece la captación de la plata, probablemente por la alteración de la membrana de las bacterias, como se ha observado mediante SEM y TEM. Tras la digestión con lisozima de las bacterias y el análisis mediante SC-ICP-MS de los esferoplastos, se ha determinado que un 70 - 80 % de la plata captada es internalizada en el citoplasma. En la combinación de altas concentraciones de apramicina con nanopartículas de plata de 10 nm, también se ha observado que la apramicina favorece la captación de plata, debido a que se ha cuantificado una mayor cantidad de plata y una mayor fracción de bacterias con plata que en ausencia de apramicina. Respecto a la biodistribución de la plata, se ha determinado que un 30 - 60 % de la plata se encuentra internalizada, mientras que el resto de la plata estaría en la fracción de la pared y del espacio periplásmico.

La combinación de plata con apramicina ha permitido la reducción de las concentraciones tanto de la plata (I) y de las nanopartículas de plata como de la apramicina, manteniendo los efectos bactericidas de cada uno de los antimicrobianos individuales. La combinación de plata (I) con apramicina ha permitido una reducción mayor de las concentraciones de ambos antimicrobianos que utilizando nanopartículas. Sin embargo, el uso de la plata en forma de nanopartículas en lugar de sales solubles puede presentar ventajas adicionales, al evitar la precipitación/complejamiento de la plata (I), afectando a su biodisponibilidad, así como reduciendo los riesgos a su exposición directa, responsable de la toxicidad de este elemento en organismos superiores (argiria).

IV. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta que el objetivo principal de esta Tesis Doctoral es el desarrollo y aplicación de una plataforma analítica basada en ICP-MS, con especial atención a la detección de (bio)partículas individuales, que permita obtener información complementaria sobre la detección y cuantificación de nanopartículas de plata y especies derivadas de las mismas en cultivos microbiológicos, los resultados obtenidos han permitido extraer las siguientes conclusiones:

- La detección de partículas en SP-ICP-MS implica disponer de criterios robustos que permitan la discriminación de sus señales con respecto a la línea base. El criterio seleccionado se ha basado en la aplicación de un valor crítico igual a 5σ (σ: desviación estándar de la línea base). Este criterio permite, sin comprometer la detección de partículas pequeñas, eliminar o minimizar el riesgo de falsos positivos, garantizando los mejores límites de detección respecto al número de partículas. En las situaciones en las que se detectan partículas en un blanco, el valor crítico para la detección de partículas se basa en un criterio $2{,}33\sigma$ (σ: desviación estándar del número de partículas contadas en el blanco).

- La evaluación y validación de SP-ICP-MS como método de *screening* se ha basado en aplicar los conceptos de valores críticos descritos previamente y en la determinación de parámetros analíticos como los valores críticos de concentración en número y tamaño, regiones de incertidumbre, sensibilidad o selectividad, entre otros. Este método ha permitido confirmar la presencia/ausencia de partículas metálicas (oro, plata y aluminio) en muestras alimentarias.

- La validez de la información cuantitativa (tamaño y concentración de partículas) proporcionada por SP-ICP-MS se ha evaluado a través de la estimación de los valores críticos de tamaño y el análisis de diluciones sucesivas. Sólo si la distribución de tamaños obtenida está por encima del valor crítico de tamaño, la información se puede considerar cuantitativa, mientras que si incluye el valor crítico, la información debe considerarse cualitativa o semicuantitativa. Este procedimiento se ha validado a través de distintos casos y se ha aplicado al análisis de nanomateriales antimicrobianos.

- La introducción de muestra en SC-ICP-MS se ha estudiado en dos sistemas de nebulización diferentes, seleccionándose las mismas condiciones óptimas para ambos sistemas (0,3 L min^{-1} del gas de nebulización y 0,9 L

min^{-1} del gas de *make-up*). La aplicación de estos sistemas de introducción en el análisis de muestras de bacterias incubadas previamente con plata (I) y nanopartículas de plata ha permitido detectar la presencia de biopartículas que contenían plata y cuantificar su contenido individualizado. La validez de la información obtenida mediante SC-ICP-MS se ha evaluado mediante un procedimiento análogo al descrito anteriormente para SP-ICP-MS.

- El análisis de zinc como elemento marcador endógeno de bacterias ha permitido detectar la presencia de biopartículas que contenían zinc mediante SC-ICP-MS, aunque la información obtenida se ha considerado semicuantitativa debido a las características de las muestras y a la sensibilidad del instrumento utilizado. Se ha concluido que el zinc no es el elemento adecuado para ser utilizado como marcador endógeno de bacterias.

- La evaluación de actividad bactericida de la plata (I) y de nanopartículas de plata de 10 y 60 nm ha demostrado que la plata (I) presenta mayores efectos bacteriostáticos y bactericidas frente a bacterias *E. coli*. La combinación de apramicina con plata (I) y nanopartículas de plata de 10 nm ha provocado la aparición de efectos sinérgicos frente a bacterias *E. coli* y *P. aeruginosa*, permitiendo la reducción de las concentraciones de los antimicrobianos y preservando su efecto bactericida individual. La combinación de plata (I) con apramicina ha permitido una reducción mayor de las concentraciones de ambos antimicrobianos que en presencia de nanopartículas. Sin embargo, las nanopartículas de plata podrían convertirse en un medio eficaz para administrar iones plata a los microorganismos en situaciones en los que la disponibilidad de iones se reduce por complejación o precipitación.

- El uso de un método analítico basado en SC-ICP-MS ha permitido detectar y cuantificar directamente la plata presente en bacterias *E. coli* expuestas a plata (I) y nanopartículas de plata de 10 y 60 nm. El uso de una plataforma analítica basada en SP-ICP-MS y HDC-ICP-MS, en combinación con la digestión alcalina con TMAH, ha permitido detectar e identificar las especies de plata presentes en bacterias, así como en los medios de cultivo. El análisis de estos resultados, junto con la información complementaria proporcionada por la microscopía electrónica de transmisión y de barrido, ha permitido sugerir los mecanismos de acción bactericida asociados a la plata (I) y a las nanopartículas de plata. En el

caso de las nanopartículas de 10 nm se ha asociado a un mecanismo combinado ion-partícula. Las nanopartículas se encuentran en su estado original en el medio de cultivo, sin observarse la presencia de iones plata, mientras que en presencia de las bacterias se ha observado tanto la presencia de las nanopartículas como de iones plata, procedentes de la posible oxidación de las nanopartículas tras su interacción con las bacterias. Las nanopartículas de 60 nm actúan mediante un mecanismo asociado únicamente a los iones. Tras la incubación en el medio de cultivo se ha observado la presencia de nanopartículas y de iones platas, mientras que en presencia de las bacterias solamente se han detectado iones plata, lo que indicaba que las nanopartículas de 60 nm no son captadas por las bacterias, y los responsable de la actividad bactericida serían los iones.

- El uso de un método analítico basado en SC-ICP-MS ha permitido detectar y cuantificar directamente la plata presente en bacterias *E. coli* incubadas con combinaciones de apramicina con plata (I) o nanopartículas de plata de 10 nm. Además, SC-ICP-MS complementada con procedimientos de digestión enzimática con lisozima ha permitido, al eliminar la membrana celular, estudiar la biodistribución de la plata y cuantificar la plata intracelular. En el caso de las bacterias incubadas con plata (I) se ha determinado que la plata captada por las bacterias se encuentra principalmente internalizada en las bacterias, mientras que, en el caso de la incubación con nanopartículas de plata de 10 nm solamente un 45% de la plata estaba internalizada. El análisis de los resultados de SC-ICP-MS, junto con la información complementaria proporcionada por TEM y SEM, ha permitido sugerir los mecanismos de acción bactericida asociados a los efectos sinérgicos surgidos al combinar apramicina con plata (I) y nanopartículas de plata de 10 nm. La presencia de apramicina en la combinación con plata (I) favorece la captación de plata, probablemente por la alteración de la membrana de las bacterias, de la cual un 70 - 80 % se encuentra internalizada. En combinación con nanopartículas de plata de 10 nm, la apramicina también favorece la captación de plata, de la cual el 30 - 60% estaría internalizada.

CONCLUSIONS

Considering the main objective of this PhD Thesis is the development and application of an analytical platform based on the use of ICP-MS for the detection of individual (bio)particles to obtain complementary information on the detection and quantification of silver nanoparticles and derived species in microbiological culture samples, the evaluation of results has allowed to draw the following conclusions:

- Detection of particles by SP-ICP-MS implies having robust criteria that allow the discrimination of their signals from the baseline. The selected criterion has been based on the application of a critical value equal to 5σ (σ: standard deviation of the baseline). This criterion allows, without compromising the detection of small particles, to remove or minimize the risk of false positives by ensuring the best limits of detection with respect to particle number concentration. In those situations, where particles are detected in a blank, the critical value for particle detection is based on a 2.33σ criterion (σ: standard deviation of the number of particles counted in the blanks).

- The evaluation and validation of SP-ICP-MS as a screening method has been based on the application of the concepts of critical values previously described and on the determination of analytical parameters, such as critical values in terms of particle number concentration and size, uncertainty regions, sensitivity or selectivity, among others. This method has made it possible to confirm the presence/absence of metallic particles (gold, silver or aluminum) in food samples.

- The validity of quantitative information (size and particle number concentration) provided by SP-ICP-MS has been assessed through the estimation of size critical values and the analysis of successive dilutions. Only if the size distribution obtained is above the size critical value, the information can be considered quantitative, whereas if it includes the critical value, the information must be considered qualitative or semiquantitative. This approach has been verified by different case studies and applied to the analysis of antimicrobial nanomaterials.

- Sample introduction in SC-ICP-MS has been studied by the use of two different nebulization systems, selecting the same optimal conditions for both of them (nebulizer gas flow rate of 0.3 L min^{-1} and make-up gas flow rate of 0.9 L min^{-1}). The application of these introduction systems in the analysis of bacteria samples previously incubated with silver (I) and silver

nanoparticles has made it possible to detect the presence of bioparticles containing silver and to quantify their individual content. The validity of the information obtained by SC-ICP-MS has been assessed through an analogous strategy to that applied in SP-ICP-MS.

- Analysis of zinc as an endogenous marker element of bacteria has allowed to detect the presence of bioparticles containing zinc by SC-ICP-MS. However, the information obtained has been considered semiquantitative due to the characteristics of the samples and the sensitivity of the instrument used. It has been concluded that zinc is not an appropriate element to be used as an endogenous marker for bacteria.

- The evaluation of bactericidal activity of silver (I) and silver nanoparticles of 10 and 60 nm has shown that silver (I) shows greater bacteriostatic and bactericidal effects against *E. coli* bacteria. The combination of apramycin with silver (I) and 10 nm silver nanoparticles has produced the appearance of synergistic effects against *E. coli* and *P. aeruginosa* bacteria, reducing antimicrobial concentrations and preserving their individual bactericidal effect. The combination of silver (I) with apramycin has led to a greater reduction in the concentration of both antimicrobials, than in the presence of nanoparticles. However, silver nanoparticles could become an effective way to deliver silver ions to microorganisms when the availability of ions is hindered by complexation or precipitation.

- The use of an analytical method based on SC-ICP-MS has made it possible to detect and directly quantify silver in *E. coli* bacteria exposed to silver (I) and silver nanoparticles of 10 and 60 nm. The use of an analytical platform based on SP-ICP-MS and HDC-ICP-MS, in combination with alkaline digestion with TMAH, has allowed the detection and identification of silver species present in bacteria, as well as in culture media. The analysis of these results, together with complementary information provided by transmission and scanning electron microscopy, has allowed to suggest the bactericidal mechanisms associated with silver (I) and silver nanoparticles. In the case of 10 nm silver nanoparticles, a combined ion-particle mechanism has been proposed. Nanoparticles are found in their original state in the culture medium, without observing the presence of silver ions. However, in the presence of bacteria, both silver nanoparticles and silver ions have been observed, the latter ones likely coming from the possible oxidation of the nanoparticles after their interaction with bacteria. Silver nanoparticles of 60 nm act through a mechanism associated with ions only.

After incubation in the culture medium, the presence of nanoparticles and silver ions has been observed, while in the presence of bacteria, only silver ions have been detected, indicating that 60 nm nanoparticles are not captured by bacteria, and ions would be responsible for the bactericidal activity.

- The use of an analytical method based on SC-ICP-MS has allowed to detect and directly quantify silver in *E. coli* bacteria exposed to different combinations of apramycin and silver (I) or 10 nm silver nanoparticles. In addition, SC-ICP-MS complemented with enzymatic digestion procedures with lysozyme has made it possible to study silver biodistribution and quantify intracellular silver, by the elimination of the bacterial cell wall. In the case of bacteria incubated with silver (I), silver taken by bacteria is mainly internalized in the bacteria, while in the case of incubation with 10 nm silver nanoparticles, only 45% of the silver taken was internalized. The analysis of SC-ICP-MS results, together with complementary information provided by TEM and SEM, has allowed to suggest the bactericidal mechanisms of associated with the synergistic effects arising from the combination of apramycin with silver (I) and 10 nm silver nanoparticles. The presence of apramycin with silver (I) favors the uptake of silver, probably due to the alteration of the bacterial membrane, being 70 - 80 % internalized. Apramycin in combination with 10 nm silver nanoparticles, also increases the silver uptake, with 30 - 60 % of silver internalized.

V. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

[1] Comisión Europea, Recomendación de la Comisión Europea de 10 de junio de 2022 relativa a la definición de nanomaterial (2022/C 229/01), 2022.

[2] F. Laborda, E. Bolea, Characterization of Engineered Nanomaterials, in: Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, Elsevier, 2018: pp. 108–116. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12677-0.

[3] A. Nel, T. Xia, L. Mädler, N. Li, Toxic potential of materials at the nanolevel, Science. 311 (2006) 622–7. https://doi.org/10.1126/science.1114397.

[4] A.D. Maynard, R.J. Aitken, T. Butz, V. Colvin, K. Donaldson, G. Oberdörster, M.A. Philbert, J. Ryan, A. Seaton, V. Stone, S.S. Tinkle, L. Tran, N.J. Walker, D.B. Warheit, Safe handling of nanotechnology, Nature. 444 (2006) 267–269. https://doi.org/10.1038/444267a.

[5] European Commission, SCENIHR/002/05. The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies, 2006.

[6] Environmental Protection Agency, EPA 100/B-07/001. Nanotechnology White Paper, 2007.

[7] S. Soares, J. Sousa, A. Pais, C. Vitorino, Nanomedicine: Principles, properties, and regulatory issues, Front Chem. 6 (2018) 360. https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00360.

[8] A. Gómez López, Nanomedicina y su impacto en la práctica médica, Repertorio de Medicina y Cirugía. 26 (2017) 129–130. https://doi.org/10.1016/j.reper.2017.06.003.

[9] P.D. Marcato, N. Durán, New aspects of nanopharmaceutical delivery systems, J Nanosci Nanotechnol. 8 (2008) 2216–2229. https://doi.org/10.1166/jnn.2008.274.

[10] R. Singh, H.S. Nalwa, Medical applications of nanoparticles in biological imaging, cell labeling, antimicrobial agents, and anticancer nanodrugs, J Biomed Nanotechnol. 7 (2011) 489–503. https://doi.org/10.1166/jbn.2011.1324.

[11] A.J. Huh, Y.J. Kwon, "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era, Journal of Controlled Release. 156 (2011) 128–145. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.002.

[12] L.J.V. Piddock, The crisis of no new antibiotics-what is the way forward?, Lancet Infect Dis. 12 (2012) 249–253. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70316-4.

[13] J. Davies, D. Davies, Origins and evolution of antibiotic resistance., Microbiology and Molecular Biology Reviews. 74 (2010) 417–433. https://doi.org/10.1128/mmbr.00016-10.

[14] World Health Organization, Resistencia a los antimicrobianos, (2020). https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance.

[15] G. V. Doern, K.P. Heilmann, H.K. Huynh, P.R. Rhomberg, S.L. Coffman, A.B. Brueggemann, Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States during 1999-2000, including a comparison of resistance rates since 1994-1995, Antimicrob Agents Chemother. 45 (2001) 1721–1729. https://doi.org/10.1128/AAC.45.6.1721-1729.2001.

[16] A. Coates, Y. Hu, R. Bax, C. Page, The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs, Nat Rev Drug Discov. 1 (2002) 895–910. https://doi.org/10.1038/nrd940.

[17] K. Zheng, M.I. Setyawati, D.T. Leong, J. Xie, Antimicrobial silver nanomaterials, Coord Chem Rev. 357 (2018) 1–17. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.11.019.

[18] World Health Organization, Antimicrobial resistance. Global report on surveillance, 2014.

[19] Centers for Disease Control and Prevention, Antibiotic resistance threats in the United States, 2013.

[20] European Center for Disease Prevention and Control, Antimicrobial resistance surveillance in Europe, 2011.

[21] Review on Antimicrobial Resistance (AMR), Tackling drug-resistante infectios globally: an overview of our work, 2016.

[22] World Health Organization, Resistencia a los antibióticos, (2020). https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibióticos.

[23] J.A. Lemire, J.J. Harrison, R.J. Turner, Antimicrobial activity of metals: Mechanisms, molecular targets and applications, Nat Rev Microbiol. 11 (2013) 371–384. https://doi.org/10.1038/nrmicro3028.

[24] A. Sirelkhatim, S. Mahmud, A. Seeni, N.H.M. Kaus, L.C. Ann, S.K.M. Bakhori, H. Hasan, D. Mohamad, Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism, Nanomicro Lett. 7 (2015) 219–242. https://doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x.

[25] A. Besinis, T. De Peralta, R.D. Handy, The antibacterial effects of silver, titanium dioxide and silica dioxide nanoparticles compared to the dental disinfectant chlorhexidine on *Streptococcus mutans* using a suite of bioassays, Nanotoxicology. 8 (2014) 1–16. https://doi.org/10.3109/17435390.2012.742935.

[26] J.T. Seil, T.J. Webster, Antimicrobial applications of nanotechnology: Methods and literature, Int J Nanomedicine. 7 (2012) 2767–2781. https://doi.org/10.2147/IJN.S24805.

[27] M.M. Mamun, A.J. Sorinolu, M. Munir, E.P. Vejerano, Nanoantibiotics: Functions and Properties at the Nanoscale to Combat Antibiotic Resistance, Front Chem. 9 (2021). https://doi.org/10.3389/fchem.2021.687660.

[28] M.J. Hajipour, K.M. Fromm, A. Akbar Ashkarran, D. Jimenez de Aberasturi, I.R. de Larramendi, T. Rojo, V. Serpooshan, W.J. Parak, M. Mahmoudi, Antibacterial properties of nanoparticles, Trends Biotechnol. 30 (2012) 499–511. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.06.004.

[29] Q. Li, S. Mahendra, D.Y. Lyon, L. Brunet, M. V Liga, D. Li, P.J.J. Alvarez, Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications, Water Res. 42 (2008) 4591–4602. https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.08.015.

[30] M.F. Gómez-Núñez, M. Castillo-López, F. Sevilla-Castillo, O.J. Roque-Reyes, F. Romero-Lechuga, D.I. Medina-Santos, R. Martínez-Daniel, A.N. Peón, Nanoparticle-Based Devices in the Control of Antibiotic Resistant Bacteria, Front Microbiol. 11 (2020). https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.563821.

[31] H. Gu, P.L. Ho, E. Tong, L. Wang, B. Xu, Presenting vancomycin on nanoparticles to enhance antimicrobial activities, Nano Lett. 3 (2003) 1261–1263. https://doi.org/10.1021/nl034396z.

[32] Z. Ahmad, R. Pandey, S. Sharma, G.K. Khuller, Alginate nanoparticles as antituberculosis drug carriers: formulation development, pharmacokinetics and therapeutic potential., Indian J Chest Dis Allied Sci. 48 (2006) 171–6.

[33] R. Cantón, J.E. García Sánchez, M.L. Gómez-Lus, C. Martínez Martínez, Luis Rodríguez-Avial, J. Vila, J.A. García Rodríguez, Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los microorganismos., in: Procedimientos En Microbiología Clínica. Recomendaciones de La Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2000: pp. 1–54.

[34] J.M. Andrews, Determination of minimum inhibitory concentrations, Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 48 (2001) 5–16. https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5.

[35] A.L. Leber, Clinical Microbiology Procedures Handbook, Washington, DC, USA, 2016. https://doi.org/10.1128/9781555818814.

[36] J. García-Rodríguez, E. Sánchez, M.L. Gomez-Lus, L. Martínez, C. Rodríguez, J. Vila, Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos, in: Procedimientos En Microbiología Clínica. Recomendaciones de La Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2008: pp. 1–40.

[37] J. Calvo, L. Martínez-Martínez, Mecanismos de acción de los antimicrobianos, Enferm Infecc Microbiol Clin. 27 (2009) 44–52. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001.

[38] S. Chernousova, M. Epple, Silver as antibacterial agent: Ion, nanoparticle, and metal, Angewandte Chemie - International Edition. 52 (2013) 1636–1653. https://doi.org/10.1002/anie.201205923.

[39] G. Franci, A. Falanga, S. Galdiero, L. Palomba, M. Rai, G. Morelli, M. Galdiero, Silver nanoparticles as potential antibacterial agents, Molecules. 20 (2015) 8856–8874. https://doi.org/10.3390/molecules20058856.

[40] C. Marambio-Jones, E.M.V. Hoek, A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment, Journal of Nanoparticle Research. 12 (2010) 1531–1551. https://doi.org/10.1007/s11051-010-9900-y.

[41] A. Canut Blasco, A. Collazos Blanco, M. DíezAguilar, M.I. Morosini Reilly, R.Gascón. Alicia, C. Seral García, Métodos microbiológicos para la determinación in vitro de la actividad de combinaciones de antimicrobianos, in: Procedimiento de Microbiología Clínica. Recomendaciones de La Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2020: pp. 1–61.

[42] A.M. Allahverdiyev, K.V. Kon, E.S. Abamor, M. Bagirova, M. Rafailovich, Coping with antibiotic resistance: Combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents, Expert Rev Anti Infect Ther. 9 (2011) 1035–1052. https://doi.org/10.1586/eri.11.121.

[43] P. Verma, Methods for Determining Bactericidal Activity and Antimicrobial Interactions, in: Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols, CRC Press, 2007: pp. 275–298. https://doi.org/10.1201/9781420014495.ch12.

[44] S. Gurunathan, Biologically synthesized silver nanoparticles enhances antibiotic activity against Gram-negative bacteria, Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 29 (2015) 217–226. https://doi.org/10.1016/j.jiec.2015.04.005.

[45] A.R. Shahverdi, A. Fakhimi, H.R. Shahverdi, S. Minaian, Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, Nanomedicine. 3 (2007) 168–171. https://doi.org/10.1016/j.nano.2007.02.001.

[46] A.M. Fayaz, K. Balaji, M. Girilal, R. Yadav, P.T. Kalaichelvan, R. Venketesan, Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria, Nanomedicine. 6 (2010) 103–109. https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.04.006.

[47] S.S. Birla, V. v. Tiwari, A.K. Gade, A.P. Ingle, A.P. Yadav, M.K. Rai, Fabrication of silver nanoparticles by Phoma glomerata and its combined effect against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, Lett Appl Microbiol. 48 (2009) 173–179. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02510.x.

[48] S.Z.H. Naqvi, U. Kiran, M.I. Ali, A. Jamal, A. Hameed, S. Ahmed, N. Ali, Combined efficacy of biologically synthesized silver nanoparticles and different antibiotics against multidrug-resistant bacteria, Int J Nanomedicine. 8 (2013) 3187–3195. https://doi.org/10.2147/IJN.S49284.

[49] S. Baker, A. Pasha, S. Satish, Biogenic nanoparticles bearing antibacterial activity and their synergistic effect with broad spectrum antibiotics: Emerging strategy to combat drug resistant pathogens, Saudi Pharmaceutical Journal. 25 (2017) 44–51. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.06.011.

[50] L. Heifets, Qualitative and quantitative drug-susceptibility tests in mycobacteriology, American Review of Respiratory Disease. 137 (1988) 1217–1222. https://doi.org/10.1164/ajrccm/137.5.1217.

[51] S. Ruden, K. Hilpert, M. Berditsch, P. Wadhwani, A.S. Ulrich, Synergistic interaction between silver nanoparticles and membrane-permeabilizing antimicrobial peptides, Antimicrob Agents Chemother. 53 (2009) 3538–3540. https://doi.org/10.1128/AAC.01106-08.

[52] G. Wan, L. Ruan, Y. Yin, T. Yang, M. Ge, X. Cheng, Effects of silver nanoparticles in combination with antibiotics on the resistant bacteria *Acinetobacter baumannii*, Int J Nanomedicine. 11 (2016) 3789–3800. https://doi.org/10.2147/IJN.S104166.

[53] M. Smekalova, V. Aragon, A. Panacek, R. Prucek, R. Zboril, L. Kvitek, Enhanced antibacterial effect of antibiotics in combination with silver nanoparticles against animal pathogens, Veterinary Journal. 209 (2016) 174–179. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.10.032.

[54] A. Panáček, M. Smékalová, R. Večeřová, K. Bogdanová, M. Röderová, M. Kolář, M. Kilianová, Š. Hradilová, J.P. Froning, M. Havrdová, R. Prucek, R. Zbořil, L. Kvítek, Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant *Enterobacteriaceae*, Colloids Surf B Biointerfaces. 142 (2016) 392–399. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.03.007.

[55] F. Shafiee, S.S. Naji Esfahani, A. Hakamifard, R. Soltani, In vitro synergistic effect of colistin and ampicillin/sulbactam with several antibiotics against clinical strains of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*, Indian J Med Microbiol. 39 (2021) 358–362. https://doi.org/10.1016/j.ijmmb.2021.04.006.

[56] S.O. Allend, M.O. Garcia, K.F. da Cunha, D.T.F. de Albernaz, M.E. da Silva, R.Y. Ishikame, L.A. Panagio, G. Nakazaro, G.F. Reis, D.B. Pereira, D.D. Hartwig, Biogenic silver nanoparticle (Bio-AgNP) has an antibacterial effect against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* with synergism and additivity when combined with polymyxin B, J Appl Microbiol. 132 (2022) 1036–1047. https://doi.org/10.1111/jam.15297.

[57] A. Pormohammad, R.J. Turner, Silver antibacterial synergism activities with eight other metal(Loid)-based antimicrobials against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*, Antibiotics. 9 (2020) 1–19. https://doi.org/10.3390/antibiotics9120853.

[58] I. sok Hwang, J.H. Hwang, H. Choi, K.J. Kim, D.G. Lee, Synergistic effects between silver nanoparticles and antibiotics and the mechanisms involved, J Med Microbiol. 61 (2012) 1719–1726. https://doi.org/10.1099/jmm.0.047100-0.

[59] R. Vazquez-Muñoz, A. Meza-Villezcas, P.G.J. Fournier, E. Soria-Castro, K. Juarez-Moreno, A.L. Gallego-Hernández, N. Bogdanchikova, R. Vazquez-Duhalt, A. Huerta-Saquero, Enhancement of antibiotics antimicrobial activity due to the silver nanoparticles impact on the cell membrane, PLoS One. 14 (2019). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224904.

[60] A.M. Alotaibi, N.B. Alsaleh, A.T. Aljasham, E.A. Tawfik, M.M. Almutairi, M.A. Assiri, M. Alkholief, M.M. Almutairi, Silver Nanoparticle-Based Combinations with Antimicrobial Agents against Antimicrobial-Resistant Clinical Isolates, Antibiotics. 11 (2022) 1219. https://doi.org/10.3390/antibiotics11091219.

[61] P. Li, J. Li, C. Wu, Q. Wu, J. Li, Synergistic antibacterial effects of β-lactam antibiotic combined with silver nanoparticles, Nanotechnology. 16 (2005) 1912–1917. https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/9/082.

[62] F. Laborda, E. Bolea, G. Cepriá, M.T. Gómez, M.S. Jiménez, J. Pérez-Arantegui, J.R. Castillo, Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples, Anal Chim Acta. 904 (2016) 10–32. https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.11.008.

[63] L. Calzolai, D. Gilliland, F. Rossi, Measuring nanoparticles size distribution in food and consumer products: A review, Food Additives and Contaminants - Part A. 29 (2012) 1183–1193. https://doi.org/10.1080/19440049.2012.689777.

[64] O.D. Hendrickson, I. V. Safenkova, A. V. Zherdev, B.B. Dzantiev, V.O. Popov, Methods of detection and identification of manufactured nanoparticles, Biophysics (Oxf). 56 (2011) 961–986. https://doi.org/10.1134/S0006350911060066.

[65] A. Lapresta-Fernández, A. Salinas-Castillo, S. Anderson De La Llana, J.M. Costa-Fernández, S. Domínguez-Meister, R. Cecchini, L.F. Capitán-Vallvey, M.C. Moreno-Bondi, M.P. Marco, J.C. Sánchez-López, I.S. Anderson, A general perspective of the characterization and quantification of nanoparticles: Imaging, spectroscopic, and separation techniques, Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences. 39 (2014) 423–458. https://doi.org/10.1080/10408436.2014.899890.

[66] O.A. Sadik, N. Du, V. Kariuki, V. Okello, V. Bushlyar, Current and emerging technologies for the characterization of nanomaterials, in: ACS Sustain Chem Eng, 2014: pp. 1707–1716. https://doi.org/10.1021/sc500175v.

[67] D. Hernández, J.C. Vidal, F. Laborda, J. Pérez-Arantegui, A.C. Giménez-Ingalaturre, J.R. Castillo, Detection, size characterization and quantification of silver nanoparticles in consumer products by particle collision coulometry, Microchimica Acta. 188 (2021) 12. https://doi.org/10.1007/s00604-020-04662-4.

[68] J.A. Nóbrega, M.C. Santos, R.A. de Sousa, S. Cadore, R.M. Barnes, M. Tatro, Sample preparation in alkaline media, Spectrochim Acta Part B At Spectrosc. 61 (2006) 465–495. https://doi.org/10.1016/j.sab.2006.02.006.

[69] J. Jiménez-Lamana, F. Laborda, E. Bolea, I. Abad-Álvaro, J.R. Castillo, J. Bianga, M. He, K. Bierla, S. Mounicou, L. Ouerdane, S. Gaillet, J.M. Rouanet, J. Szpunar, An insight into silver nanoparticles bioavailability in rats, Metallomics. 6 (2014) 2242–2249. https://doi.org/10.1039/c4mt00200h.

[70] N.J. Clark, R. Clough, D. Boyle, R.D. Handy, Development of a suitable detection method for silver nanoparticles in fish tissue using single particle ICP-MS, Environ Sci Nano. 6 (2019) 3388–3400. https://doi.org/10.1039/c9en00547a.

[71] J. Vidmar, T. Buerki-Thurnherr, K. Loeschner, Comparison of the suitability of alkaline or enzymatic sample pre-treatment for characterization of silver nanoparticles in human tissue by single particle ICP-MS, J Anal At Spectrom. 33 (2018) 752–761. https://doi.org/10.1039/c7ja00402h.

[72] M.V. Taboada-López, P. Herbello-Hermelo, R. Domínguez-González, P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Piñeiro, Enzymatic hydrolysis as a sample pre-treatment for titanium dioxide nanoparticles assessment in surimi (crab sticks) by single particle ICP-MS, Talanta. 195 (2019) 23–32. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.023.

[73] P. Krystek, A. Ulrich, C.C. Garcia, S. Manohar, R. Ritsema, Application of plasma spectrometry for the analysis of engineered nanoparticles in suspensions and products, J Anal At Spectrom. 26 (2011) 1701–1721. https://doi.org/10.1039/c1ja10071h.

[74] A.J. Bone, B.P. Colman, A.P. Gondikas, K.M. Newton, K.H. Harrold, R.M. Cory, J.M. Unrine, S.J. Klaine, C.W. Matson, R.T. Di Giulio, Biotic and abiotic interactions in aquatic microcosms determine fate and toxicity of Ag nanoparticles: Part 2-toxicity and Ag speciation, Environ Sci Technol. 46 (2012) 6925–6933. https://doi.org/10.1021/es204683m.

[75] L.M. Furtado, M.E. Hoque, D.F. Mitrano, J.F. Ranville, B. Cheever, P.C. Frost, M.A. Xenopoulos, H. Hintelmann, C.D. Metcalfe, The persistence and transformation of silver nanoparticles in littoral lake mesocosms monitored using various analytical techniques, Environmental Chemistry. 11 (2014) 419–430. https://doi.org/10.1071/EN14064.

[76] J. Liu, J. Chao, R. Liu, Z. Tan, Y. Yin, Y. Wu, G. Jiang, Cloud Point Extraction as an Advantageous Preconcentration Approach for Analysis of Trace Silver Nanoparticles in Environmental Waters, Anal Chem. 81 (2009) 6496–6502. https://doi.org/10.1021/ac900918e.

[77] L. Li, K. Leopold, M. Schuster, Effective and selective extraction of noble metal nanoparticles from environmental water through a noncovalent reversible reaction on an ionic exchange resin, Chemical Communications. 48 (2012) 9165–9167. https://doi.org/10.1039/c2cc34838a.

[78] A. Philippe, G.E. Schaumann, Evaluation of hydrodynamic chromatography coupled with uv-visible, fluorescence and inductively coupled plasma mass spectrometry detectors for sizing and quantifying colloids in environmental media, PLoS One. 9 (2014) 90559. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090559.

[79] B. Meermann, Field-flow fractionation coupled to ICP-MS: separation at the nanoscale, previous and recent application trends, Anal Bioanal Chem. 407 (2015) 2665–2674. https://doi.org/10.1007/s00216-014-8416-1.

[80] Perkin Elmer, Single Cell ICP-MS Analysis: Quantification of Metal Content at the Cellular Level, White Paper. (2017) 1–4.

[81] M. Resano, M. Aramendía, E. García-Ruiz, A. Bazo, E. Bolea-Fernandez, F. Vanhaecke, Living in a transient world: ICP-MS reinvented via time-resolved analysis for monitoring single events, Chem Sci. (2022). https://doi.org/10.1039/d1sc05452j.

[82] E. Bolea, M.S. Jimenez, J. Perez-Arantegui, J.C. Vidal, M. Bakir, K. Ben-Jeddou, A.C. Gimenez-Ingalaturre, D. Ojeda, C. Trujillo, F. Laborda, Analytical applications of single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: a comprehensive and critical review, Analytical Methods. 13 (2021) 2742–2795. https://doi.org/10.1039/D1AY00761K.

[83] F. Laborda, E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Nanoanalysis, Anal Chem. 86 (2014) 2270–2278. https://doi.org/10.1021/ac402980q.

[84] M.D. Montaño, J.W. Olesik, A.G. Barber, K. Challis, J.F. Ranville, Single Particle ICP-MS: Advances toward routine analysis of nanomaterials, Anal Bioanal Chem. 408 (2016) 5053–5074. https://doi.org/10.1007/s00216-016-9676-8.

[85] D. Mozhayeva, C. Engelhard, A critical review of single particle inductively coupled plasma mass spectrometry – A step towards an ideal method for nanomaterial characterization, J Anal At Spectrom. 35 (2020) 1740–1783. https://doi.org/10.1039/C9JA00206E.

[86] C. Degueldre, P.Y. Favarger, Colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectroscopy: A feasibility study, in: Colloids Surf A Physicochem Eng Asp, 2003: pp. 137–142. https://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00568-X.

[87] F. Laborda, J. Jiménez-Lamana, E. Bolea, J.R. Castillo, Selective identification, characterization and determination of dissolved silver(i) and silver nanoparticles based on single particle detection by inductively coupled plasma mass spectrometry, J Anal At Spectrom. 26 (2011) 1362–1371. https://doi.org/10.1039/c0ja00098a.

[88] H.E. Pace, N.J. Rogers, C. Jarolimek, V.A. Coleman, C.P. Higgins, J.F. Ranville, Determining Transport Efficiency for the Purpose of Counting and Sizing Nanoparticles via Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Anal Chem. 83 (2011) 9361–9369. https://doi.org/10.1021/ac201952t.

[89] A. Hineman, C. Stephan, Effect of dwell time on single particle inductively coupled plasma mass spectrometry data acquisition quality, J. Anal. At. Spectrom. 29 (2014) 1252–1257. https://doi.org/10.1039/C4JA00097H.

[90] P. Shaw, A. Donard, Nano-particle analysis using dwell times between 10 μs and 70 μs with an upper counting limit of greater than 3×10^7 cps and a gold nanoparticle detection limit of less than 10 nm diameter, J Anal At Spectrom. 31 (2016) 1234–1242. https://doi.org/10.1039/C6JA00047A.

[91] O. Borovinskaya, B. Hattendorf, M. Tanner, S. Gschwind, D. Günther, A prototype of a new inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometer providing temporally resolved, multi-element detection of short signals generated by single particles and droplets, J. Anal. At. Spectrom. 28 (2013) 226–233. https://doi.org/10.1039/C2JA30227F.

[92] F. Laborda, E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry for the analysis of inorganic engineered nanoparticles in environmental samples, Trends in Environmental Analytical Chemistry. 9 (2016) 15–23. https://doi.org/10.1016/j.teac.2016.02.001.

[93] F. Laborda, J. Jiménez-Lamana, E. Bolea, J.R. Castillo, Critical considerations for the determination of nanoparticle number concentrations, size and number size distributions by single particle ICP-MS, J Anal At Spectrom. 28 (2013) 1220–1232. https://doi.org/10.1039/c3ja50100k.

[94] F. Laborda, A.C. Gimenez-Ingalaturre, E. Bolea, Single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry for the analysis of inorganic engineered nanoparticles: Metrological and quality issues, in: Comprehensive Analytical Chemistry, Elsevier B.V., 2021: pp. 35–67. https://doi.org/10.1016/bs.coac.2021.02.012.

[95] S. Cuello-Nuñez, I. Abad-Álvaro, D. Bartczak, M.E. Del Castillo Busto, D.A. Ramsay, F. Pellegrino, H. Goenaga-Infante, The accurate determination of number concentration of inorganic nanoparticles using spICP-MS with the dynamic mass flow approach, J Anal At Spectrom. 35 (2020) 1832–1839. https://doi.org/10.1039/c9ja00415g.

[96] M. Thompson, Do we really need detection limits?, Analyst. 123 (1998) 405–407. https://doi.org/10.1039/a705702d.

[97] M. Thompson, S.L.R. Ellison, Towards an uncertainty paradigm of detection capability, Analytical Methods. 5 (2013) 5857–5861. https://doi.org/10.1039/c3ay41209a.

[98] L.A. Currie, Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities, Pure and Applied Chemistry. 67 (1995) 1699–1723. https://doi.org/10.1351/pac199567101699.

[99] ISO 11843-1:1997, Capability of detection – Part 1: Terms and definitions, International Standards Organisation, Geneva, 1997.

[100] L. v. Rajaković, D.D. Marković, V.N. Rajaković-Ognjanović, D.Z. Antanasijević, Review: The approaches for estimation of limit of detection for ICP-MS trace analysis of arsenic, Talanta. 102 (2012) 79–87. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.08.016.

[101] L.A. Currie, Limits for Qualitative Detection and Quantitative Determination: Application to Radiochemistry, Anal Chem. 40 (1968) 586–593. https://doi.org/10.1021/ac60259a007.

[102] IUPAC, Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis—II. Data interpretation analytical chemistry division, Spectrochim Acta Part B At Spectrosc. 33 (1978) 241–245. https://doi.org/10.1016/0584-8547(78)80044-5.

[103] B. Magnusson, Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Eurachem, 2014.

[104] L.A. Currie, On the detection of rare, and moderately rare, nuclear events, J Radioanal Nucl Chem. 276 (2008) 285–297. https://doi.org/10.1007/s10967-008-0501-5.

[105] RIKILT, Single Particle calculation Tool, (n.d.). https://www.wur.nl/en/show/Single-Particle-Calculation-tool.htm.

[106] I. Abad-Álvaro, E. Peña-Vázquez, E. Bolea, P. Bermejo-Barrera, J.R. Castillo, F. Laborda, Evaluation of number concentration quantification by single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry: microsecond vs. millisecond dwell times, Anal Bioanal Chem. 408 (2016) 5089–5097. https://doi.org/10.1007/s00216-016-9515-y.

[107] V. Geertsen, E. Barruet, F. Gobeaux, J.L. Lacour, O. Taché, Contribution to Accurate Spherical Gold Nanoparticle Size Determination by Single-Particle Inductively Coupled Mass Spectrometry: A Comparison with Small-Angle X-ray Scattering, Anal Chem. 90 (2018) 9742–9750. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01167.

[108] K. Newman, C. Metcalfe, J. Martin, H. Hintelmann, P. Shaw, A. Donard, Improved single particle ICP-MS characterization of silver nanoparticles at environmentally relevant concentrations, J Anal At Spectrom. 31 (2016) 2069–2077. https://doi.org/10.1039/C6JA00221H.

[109] F. Laborda, J. Medrano, J.R. Castillo, Quality of quantitative and semiquantitative results in inductively coupled plasma mass spectrometry, J Anal At Spectrom. 16 (2001) 732–738. https://doi.org/10.1039/b101814k.

[110] J. Tuoriniemi, G. Cornelis, M. Hassellöv, Improving the accuracy of single particle ICPMS for measurement of size distributions and number concentrations of nanoparticles by determining analyte partitioning during nebulisation, J. Anal. At. Spectrom. 29 (2014) 743–752. https://doi.org/10.1039/C3JA50367D.

[111] K. Loeschner, M.S.J. Brabrand, J.J. Sloth, E.H. Larsen, Use of alkaline or enzymatic sample pretreatment prior to characterization of gold nanoparticles in animal tissue by single-particle ICPMS Characterisation of Nanomaterials in Biological Samples, Anal Bioanal Chem. 406 (2014) 3845–3851. https://doi.org/10.1007/s00216-013-7431-y.

[112] J. Tuoriniemi, G. Cornelis, M. Hassellöv, Size discrimination and detection capabilities of single-particle ICPMS for environmental analysis of silver nanoparticles, Anal Chem. 84 (2012) 3965–3972. https://doi.org/10.1021/ac203005r.

[113] J. Tuoriniemi, G. Cornelis, M. Hassellöv, A new peak recognition algorithm for detection of ultra-small nano-particles by single particle ICP-MS using rapid time resolved data acquisition on a sector-field mass spectrometer, J Anal At Spectrom. 30 (2015) 1723–1729. https://doi.org/10.1039/c5ja00113g.

[114] M. Hadioui, C. Peyrot, K.J. Wilkinson, Improvements to single particle ICPMS by the online coupling of ion exchange resins, Anal Chem. 86 (2014) 4668–4674. https://doi.org/10.1021/ac5004932.

[115] B. Franze, I. Strenge, C. Engelhard, Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: evaluation of three different pneumatic and piezo-based sample introduction systems for the characterization of silver nanoparticles, J Anal At Spectrom. 27 (2012) 1074–1083. https://doi.org/10.1039/c2ja00003b.

[116] Y. Dan, H. Shi, C. Stephan, X. Liang, Rapid analysis of titanium dioxide nanoparticles in sunscreens using single particle inductively coupled plasma–mass spectrometry, Microchemical Journal. 122 (2015) 119–126. https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.04.018.

[117] Y. Dan, X. Ma, W. Zhang, K. Liu, C. Stephan, H. Shi, Single particle ICP-MS method development for the determination of plant uptake and accumulation of CeO2 nanoparticles, Anal Bioanal Chem. (2016) 5157–5167. https://doi.org/10.1007/s00216-016-9565-1.

[118] I. Kálomista, A. Kéri, G. Galbács, On the applicability and performance of the single particle ICP-MS nano-dispersion characterization method in cases complicated by spectral interferences, J Anal At Spectrom. 31 (2016) 1112–1122. https://doi.org/10.1039/C5JA00501A.

[119] J. Vidmar, R. Milačič, J. Ščančar, Sizing and simultaneous quantification of nanoscale titanium dioxide and a dissolved titanium form by single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, Microchemical Journal. 132 (2017) 391–400. https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.02.030.

[120] E. Bolea-Fernandez, D. Leite, A. Rua-Ibarz, L. Balcaen, M. Aramendía, M. Resano, F. Vanhaecke, Characterization of SiO_2 nanoparticles by single particle-inductively coupled plasma-tandem mass spectrometry (SP-ICP-MS/MS), J Anal At Spectrom. 32 (2017) 2140–2152. https://doi.org/10.1039/C7JA00138J.

[121] C. Degueldre, P. Favarger, S. Wold, Gold colloid analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry in a single particle mode, Anal Chim Acta. 555 (2006) 263–268. https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.09.021.

[122] C. Degueldre, P.-Y. Favarger, C. Bitea, Zirconia colloid analysis by single particle inductively coupled plasma–mass spectrometry, Anal Chim Acta. 518 (2004) 137–142. https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.04.015.

[123] C. Degueldre, P.-Y. Favarger, R. Rossé, S. Wold, Uranium colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry., Talanta. 68 (2006) 623–628. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.05.006.

[124] S. Gschwind, L. Flamigni, J. Koch, O. Borovinskaya, S. Groh, K. Niemax, D. Günther, Capabilities of inductively coupled plasma mass spectrometry for the detection of nanoparticles carried by monodisperse microdroplets, J Anal At Spectrom. 26 (2011) 1166–1174. https://doi.org/10.1039/c0ja00249f.

[125] D.M. Mitrano, A. Barber, A. Bednar, P. Westerhoff, C.P. Higgins, J.F. Ranville, Silver nanoparticle characterization using single particle ICP-MS (SP-ICP-MS) and asymmetrical flow field flow fractionation ICP-MS (AF4-ICP-MS), J Anal At Spectrom. 27 (2012) 1131–1142. https://doi.org/10.1039/c2ja30021d.

[126] S. Lee, X. Bi, R.B. Reed, J.F. Ranville, P. Herckes, P. Westerhoff, Nanoparticle Size Detection Limits by Single Particle ICP-MS for 40 Elements, Environ Sci Technol. 48 (2014) 10291–10300. https://doi.org/10.1021/es502422v.

[127] H.E. Pace, N.J. Rogers, C. Jarolimek, V. a Coleman, E.P. Gray, C.P. Higgins, J.F. Ranville, Single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry: a performance evaluation and method comparison in the determination of nanoparticle size., Environ Sci Technol. 46 (2012) 12272–80. https://doi.org/10.1021/es301787d.

[128] J. Liu, K.E. Murphy, R.I. MacCuspie, M.R. Winchester, Capabilities of single particle inductively coupled plasma mass spectrometry for the size measurement of nanoparticles: a case study on gold nanoparticles., Anal Chem. 86 (2014) 3405–14. https://doi.org/10.1021/ac403775a.

[129] A.R. Donovan, C.D. Adams, Y. Ma, C. Stephan, T. Eichholz, H. Shi, Single particle ICP-MS characterization of titanium dioxide, silver, and gold nanoparticles during drinking water treatment, Chemosphere. 144 (2016) 148–153. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.07.081.

[130] A.R. Donovan, C.D. Adams, Y. Ma, C. Stephan, T. Eichholz, H. Shi, Detection of zinc oxide and cerium dioxide nanoparticles during drinking water treatment by rapid single particle ICP-MS methods, Anal Bioanal Chem. 408 (2016) 5137–5145. https://doi.org/10.1007/s00216-016-9432-0.

[131] M.V. Taboada-López, N. Alonso-Seijo, P. Herbello-Hermelo, P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Piñeiro, Determination and characterization of silver nanoparticles in bivalve molluscs by ultrasound assisted enzymatic hydrolysis and sp-ICP-MS, Microchemical Journal. 148 (2019) 652–660. https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2019.05.023.

[132] A. Gundlach-Graham, L. Hendriks, K. Mehrabi, D. Günther, Monte Carlo Simulation of Low-Count Signals in Time-of-Flight Mass Spectrometry and Its

Application to Single-Particle Detection, Anal Chem. 90 (2018) 11847–11855. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01551.

[133] E. Bolea-Fernandez, D. Leite, A. Rua-Ibarz, T. Liu, G. Woods, M. Aramendia, M. Resano, F. Vanhaecke, On the effect of using collision/reaction cell (CRC) technology in single-particle ICP-mass spectrometry (SP-ICP-MS), Anal Chim Acta. 1077 (2019) 95–106. https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.05.077.

[134] F. Laborda, A.C. Gimenez-Ingalaturre, E. Bolea, J.R. Castillo, Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry as screening tool for detection of particles, Spectrochim Acta Part B At Spectrosc. 159 (2019) 105654. https://doi.org/10.1016/j.sab.2019.105654.

[135] R.J.B. Peters, G. van Bemmel, N.B.L. Milani, G.C.T. den Hertog, A.K. Undas, M. van der Lee, H. Bouwmeester, Detection of nanoparticles in Dutch surface waters, Science of The Total Environment. 621 (2018) 210–218. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.238.

[136] M.A. Gomez-Gonzalez, E. Bolea, P.A. O'Day, J. Garcia-Guinea, F. Garrido, F. Laborda, Combining single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry and X-ray absorption spectroscopy to evaluate the release of colloidal arsenic from environmental samples, Anal Bioanal Chem. 408 (2016) 5125–5135. https://doi.org/10.1007/s00216-016-9331-4.

[137] K. Loeschner, M. Correia, C. López Chaves, I. Rokkjær, J.J. Sloth, Detection and characterisation of aluminium-containing nanoparticles in Chinese noodles by single particle ICP-MS, Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 35 (2018) 86–93. https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1382728.

[138] B. Kollander, F. Widemo, E. Ågren, E.H. Larsen, K. Loeschner, Detection of lead nanoparticles in game meat by single particle ICP-MS following use of lead-containing bullets, Anal Bioanal Chem. 409 (2017) 1877–1885. https://doi.org/10.1007/s00216-016-0132-6.

[139] J. Farkas, H. Peter, P. Christian, J.A. Gallego Urrea, M. Hassellöv, J. Tuoriniemi, S. Gustafsson, E. Olsson, K. Hylland, K.V. Thomas, Characterization of the effluent from a nanosilver producing washing machine., Environ Int. 37 (2011) 1057–1062. https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.03.006.

[140] Y. Echegoyen, C. Nerín, Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers., Food Chem Toxicol. 62C (2013) 16–22. https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.08.014.

[141] I. Abad-Alvaro, E. Bolea, F. Laborda, J.R. Castillo, An ICP-MS-based platform for release studies on silver-based nanomaterials, J Anal At Spectrom. 32 (2017) 1101–1108. https://doi.org/10.1039/C7JA00059F.

[142] I. de la Calle, M. Menta, M. Klein, F. Séby, Screening of TiO2 and Au nanoparticles in cosmetics and determination of elemental impurities by multiple techniques (DLS, SP-ICP-MS, ICP-MS and ICP-OES), Talanta. 171 (2017) 291–306. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.05.002.

[143] R. Peters, Z. Herrera-Rivera, A. Undas, M. van der Lee, H. Marvin, H. Bouwmeester, S. Weigel, Single particle ICP-MS combined with a data evaluation tool as a routine technique for the analysis of nanoparticles in complex matrices, J Anal At Spectrom. 30 (2015) 1274–1285. https://doi.org/10.1039/C4JA00357H.

[144] T.P.J. Linsinger, R. Peters, S. Weigel, International interlaboratory study for sizing and quantification of Ag nanoparticles in food simulants by single-particle ICPMS Characterisation of Nanomaterials in Biological Samples, Anal Bioanal Chem. 406 (2014) 3835–3843. https://doi.org/10.1007/s00216-013-7559-9.

[145] T.P.J. Linsinger, Q. Chaudhry, V. Dehalu, P. Delahaut, A. Dudkiewicz, R. Grombe, F. von der Kammer, E.H. Larsen, S. Legros, K. Loeschner, R. Peters, R. Ramsch, G. Roebben, K. Tiede, S. Weigel, Validation of methods for the detection and quantification of engineered nanoparticles in food, Food Chem. 138 (2013) 1959–1966. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.074.

[146] M. Valcarcel, S. Cardenas, D. Barceló, L. Buydens, K. Heydorn, B. Karlberg, K. Klemm, B. Lendl, B. Milman, B. Neidhart, Á. Ríos, R. Stephany, A. Townshend, A. Zschunke, Metrology of Qualitative Chemical Analysis: Project report EUR 20605, BCR Information ed. European Commission, Luxembourg, 2002.

[147] E. Trullols, I. Ruisánchez, F.X. Rius, Validation of qualitative analytical methods, TrAC - Trends in Analytical Chemistry. 23 (2004) 137–145. https://doi.org/10.1016/S0165-9936(04)00201-8.

[148] M.I. López, M.P. Callao, I. Ruisánchez, A tutorial on the validation of qualitative methods: From the univariate to the multivariate approach, Anal Chim Acta. 891 (2015) 62–72. https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.06.032.

[149] Official Journal of the European Communities, COMMISSION DECISION of 12 August 2002 Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results, (2002).

[150] A. Pulido, I. Ruisánchez, R. Boqué, F.X. Rius, Uncertainty of results in routine qualitative analysis, TrAC - Trends in Analytical Chemistry. 22 (2003) 647–654. https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01104-X.

[151] S.R.L. Ellison, Uncertainties in qualitative testing and analysis, Accreditation and Quality Assurance. 5 (2000) 346–348. https://doi.org/10.1007/s007690050135.

[152] J. Vessman, R. Stefan, J.F. van Staden, K. Danzer, W. Lindner, D. Thorburn Burns, A. Fajgelj, H. Müller, Selectivity in analytical chemistry, Pure Appl. Chem. 73 (2001) 1381–1386. https://doi.org/10.1351/pac200173081381.

[153] European Parliament and Council, Commission Regulation (EU) Nº 1129/2011 of 11 November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) Nº 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives, Official Journal of the European Union. L295 (2011) 1–177. https://doi.org/10.3000/19770677.L_2011.295.eng.

[154] EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food, Scientific opinion on the re-evaluation of silver (E 174) as food additive, EFSA Journal. 14 (2016) 4364. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4364.

[155] EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food, Scientific Opinion on the re-evaluation of gold (E 175) as a food additive, EFSA Journal. 14 (2016) 4632. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4362.

[156] F. Loosli, J. Wang, M. Sikder, K. Afshinnia, M. Baalousha, Analysis of engineered nanomaterials (Ag, CeO2 and Fe2O3) in spiked surface waters at environmentally relevant particle concentrations, Science of the Total Environment. 715 (2020) 136927. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136927.

[157] F. Abdolahpur Monikh, L. Chupani, E. Zusková, R. Peters, M. Vancová, M.G. Vijver, P. Porcal, W.J.G.M. Peijnenburg, Method for Extraction and Quantification of Metal-Based Nanoparticles in Biological Media: Number-Based Biodistribution and Bioconcentration, Environ Sci Technol. 53 (2019) 946–953. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b03715.

[158] S. Salou, C. Cirtiu, D. Larivière, N. Fleury, Assessment of strategies for the formation of stable suspensions of titanium dioxide nanoparticles in aqueous media suitable for the analysis of biological fluids, Anal Bioanal Chem. 412 (2020) 1469–1481. https://doi.org/10.1007/s00216-020-02412-2.

[159] L. Torrent, M. Iglesias, M. Hidalgo, E. Marguí, Determination of silver nanoparticles in complex aqueous matrices by total reflection X-ray fluorescence spectrometry combined with cloud point extraction, J Anal At Spectrom. 33 (2018) 383–394. https://doi.org/10.1039/C7JA00335H.

[160] I. de la Calle, M. Menta, M. Klein, F. Séby, Study of the presence of micro- and nanoparticles in drinks and foods by multiple analytical techniques, Food Chem. 266 (2018) 133–145. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.107.

[161] J.-L. Wang, E. Alasonati, M. Tharaud, A. Gelabert, P. Fisicaro, M.F. Benedetti, Flow and fate of silver nanoparticles in small French catchments under different land-uses: The first one-year study, Water Res. 176 (2020) 115722. https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115722.

[162] E. Verleysen, N. Waegeneers, F. Brassinne, S. De Vos, I.O. Jimenez, S. Mathioudaki, J. Mast, Physicochemical Characterization of the Pristine E171 Food Additive by Standardized and Validated Methods, Nanomaterials. 10 (2020) 592. https://doi.org/10.3390/nano10030592.

[163] T.E. Lockwood, R. Gonzalez De Vega, D. Clases, An interactive Python-based data processing platform for single particle and single cell ICP-MS, J Anal At Spectrom. 36 (2021) 2536–2544. https://doi.org/10.1039/d1ja00297j.

[164] F. Laborda, A.C. Gimenez-Ingalaturre, E. Bolea, J.R. Castillo, About detectability and limits of detection in single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, Spectrochim Acta Part B At Spectrosc. 169 (2020) 105883. https://doi.org/10.1016/j.sab.2020.105883.

[165] D.M. Schwertfeger, J.R. Velicogna, A.H. Jesmer, R.P. Scroggins, J.I. Princz, Single Particle-Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy Analysis of Metallic Nanoparticles in Environmental Samples with Large Dissolved Analyte Fractions, Anal Chem. 88 (2016) 9908–9914. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02716.

[166] R. Aznar, F. Barahona, O. Geiss, J. Ponti, T. José Luis, J. Barrero-Moreno, Quantification and size characterisation of silver nanoparticles in environmental aqueous samples and consumer products by single particle-ICPMS, Talanta. 175 (2017) 200–208. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.048.

[167] L. Amable, C. Stephan, S. Smith, R. Merrifield, An Introduction to Single Cell ICP-MS Analysis, White Paper. (2017) 1–5.

[168] M. Corte-Rodríguez, R. Álvarez-Fernández, P. García-Cancela, M. Montes-Bayón, J. Bettmer, Single cell ICP-MS using on line sample introduction systems: Current developments and remaining challenges, TrAC - Trends in Analytical Chemistry. 132 (2020) 116042. https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116042.

[169] X. Wei, Y. Lu, X. Zhang, M.L. Chen, J.H. Wang, Recent advances in single-cell ultra-trace analysis, TrAC - Trends in Analytical Chemistry. 127 (2020) 115886. https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115886.

[170] F. Li, D.W. Armstrong, R.S. Houk, Behavior of bacteria in the inductively coupled plasma: Atomization and production of atomic ions for mass spectrometry, Anal Chem. 77 (2005) 1407–1413. https://doi.org/10.1021/ac049188l.

[171] T. Nomizu, S. Kaneco, T. Tanaka, D. Ito, H. Kawaguchi, B.T. Vallee, Determination of Calcium Content in Individual Biological Cells by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry, Anal Chem. 66 (1994) 3000–3004. https://doi.org/10.1021/ac00091a004.

[172] Q.X. Sun, X. Wei, S.Q. Zhang, M.L. Chen, T. Yang, J.H. Wang, Single cell analysis for elucidating cellular uptake and transport of cobalt curcumin complex with detection by time-resolved ICPMS, Anal Chim Acta. 1066 (2019) 13–20. https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.03.062.

[173] A. López-Serrano Oliver, S. Baumgart, W. Bremser, S. Flemig, D. Wittke, A. Grützkau, A. Luch, A. Haase, N. Jakubowski, Quantification of silver nanoparticles taken up by single cells using inductively coupled plasma mass spectrometry in the single cell measurement mode, J Anal At Spectrom. 33 (2018) 1256–1263. https://doi.org/10.1039/C7JA00395A.

[174] Perkin Elmer Inc., Patented Asperon Single Cell Spray Chamber Delivering Intact Individual Cells to the ICP-MS Plasma, PerkinElmer. (2017).

[175] Glass Expansion, High Sensitivity Single-Cell Sample Introduction System for ICP-MS, (2019) 6–7.

[176] R.C. Merrifield, C. Stephan, J.R. Lead, Quantification of Au Nanoparticle Biouptake and Distribution to Freshwater Algae Using Single Cell - ICP-MS, Environ Sci Technol. 52 (2018) 2271–2277. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04968.

[177] B. Gomez-Gomez, M. Corte-Rodríguez, M.T. Perez-Corona, J. Bettmer, M. Montes-Bayón, Y. Madrid, Combined single cell and single particle ICP-TQ-MS analysis to quantitatively evaluate the uptake and biotransformation of tellurium nanoparticles in bacteria, Anal Chim Acta. 1128 (2020) 116–128. https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.06.058.

[178] Y. ki Tanaka, R. Iida, S. Takada, T. Kubota, M. Yamanaka, N. Sugiyama, Y. Abdelnour, Y. Ogra, Quantitative Elemental Analysis of a Single Cell by Using Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry in Fast Time-Resolved Analysis Mode, ChemBioChem. 21 (2020) 3266–3272. https://doi.org/10.1002/cbic.202000358.

[179] T. Liu, E. Bolea-Fernandez, C. Mangodt, O. De Wever, F. Vanhaecke, Single-event tandem ICP-mass spectrometry for the quantification of chemotherapeutic drug-derived Pt and endogenous elements in individual human cells, Anal Chim Acta. 1177 (2021) 338797. https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338797.

[180] A.S. Groombridge, S.I. Miyashita, S.I. Fujii, K. Nagasawa, T. Okahashi, M. Ohata, T. Umemura, A. Takatsu, K. Inagaki, K. Chiba, High sensitive elemental analysis of single yeast cells (*saccharomyces cerevisiae*) by time-resolved inductively-coupled plasma mass spectrometry using a high efficiency cell introduction system, Analytical Sciences. 29 (2013) 597–603. https://doi.org/10.2116/analsci.29.597.

[181] S.I. Miyashita, A.S. Groombridge, S.I. Fujii, A. Minoda, A. Takatsu, A. Hioki, K. Chiba, K. Inagaki, Highly efficient single-cell analysis of microbial cells by time-resolved inductively coupled plasma mass spectrometry, J Anal At Spectrom. 29 (2014) 1598–1606. https://doi.org/10.1039/c4ja00040d.

[182] R. Álvarez-Fernández García, M. Corte-Rodríguez, M. Macke, K.L. LeBlanc, Z. Mester, M. Montes-Bayón, J. Bettmer, Addressing the presence of biogenic selenium nanoparticles in yeast cells: analytical strategies based on ICP-TQ-MS, Analyst. 145 (2020) 1457–1465. https://doi.org/10.1039/C9AN01565E.

[183] M. Corte-Rodríguez, E. Blanco-González, J. Bettmer, M. Montes-Bayón, Quantitative Analysis of Transferrin Receptor 1 (TfR1) in Individual Breast Cancer Cells by Means of Labeled Antibodies and Elemental (ICP-MS) Detection, Anal Chem. 91 (2019) 15532–15538. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03438.

[184] F. Laborda, I. Abad-Álvaro, M.S. Jiménez, E. Bolea, Catching particles by atomic spectrometry: Benefits and limitations of single particle - Inductively coupled plasma mass spectrometry, Spectrochim Acta Part B At Spectrosc. 199 (2022) 106570. https://doi.org/10.1016/j.sab.2022.106570.

[185] X. Tian, H. Jiang, M. Wang, W. Cui, Y. Guo, L. Zheng, L. Hu, G. Qu, Y. Yin, Y. Cai, G. Jiang, Exploring the performance of quadrupole, time-of-flight, and multi-collector ICP-MS for dual-isotope detection on single nanoparticles and cells, Anal Chim Acta. 1240 (2023) 340756. https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340756.

[186] J.T.S. Lum, K.S.Y. Leung, Quantifying silver nanoparticle association and elemental content in single cells using dual mass mode in quadrupole-based inductively coupled plasma-mass spectrometry, Anal Chim Acta. 1061 (2019) 50–59. https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.02.042.

[187] M. von der Au, O. Borovinskaya, L. Flamigni, K. Kuhlmeier, C. Büchel, B. Meermann, Single cell-inductively coupled plasma-time of flight-mass spectrometry approach for ecotoxicological testing, Algal Res. 49 (2020) 101964. https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101964.

[188] X. Tian, H. Jiang, L. Hu, M. Wang, W. Cui, J. Shi, G. Liu, Y. Yin, Y. Cai, G. Jiang, Simultaneous multi-element and multi-isotope detection in single-particle ICP-MS analysis: Principles and applications, TrAC Trends in Analytical Chemistry. 157 (2022) 116746. https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116746.

[189] X. Yu, M. He, B. Chen, B. Hu, Recent advances in single-cell analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry: A review, Anal Chim Acta. 1137 (2020) 191–207. https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.07.041.

[190] S. Miyashita, S. Fujii, K. Shigeta, K. Inagaki, Single Cell Analysis by Using ICP-MS, in: Metallomics, Springer Japan, Tokyo, 2017: pp. 107–124. https://doi.org/10.1007/978-4-431-56463-8_5.

[191] H. Wang, B. Wang, M. Wang, L. Zheng, H. Chen, Z. Chai, Y. Zhao, W. Feng, Time-resolved ICP-MS analysis of mineral element contents and distribution patterns in single cells, Analyst. 140 (2015) 523–531. https://doi.org/10.1039/c4an01610f.

[192] K.S. Ho, W.T. Chan, Time-resolved ICP-MS measurement for single-cell analysis and on-line cytometry, J Anal At Spectrom. 25 (2010) 1114–1122. https://doi.org/10.1039/c002272a.

[193] K. Shigeta, G. Koellensperger, E. Rampler, H. Traub, L. Rottmann, U. Panne, A. Okino, N. Jakubowski, Sample introduction of single selenized yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) by micro droplet generation into an ICP-sector field mass spectrometer for label-free detection of trace elements, J Anal At Spectrom. 28 (2013) 637. https://doi.org/10.1039/c3ja30370e.

[194] Z. Liu, A. Xue, H. Chen, S. Li, Quantitative determination of trace metals in single yeast cells by time-resolved ICP-MS using dissolved standards for calibration, Appl Microbiol Biotechnol. 103 (2019) 1475–1483. https://doi.org/10.1007/s00253-018-09587-w.

[195] H. Wang, M. Wang, B. Wang, L. Zheng, H. Chen, Z. Chai, W. Feng, Interrogating the variation of element masses and distribution patterns in single cells using ICP-MS with a high efficiency cell introduction system, Anal Bioanal Chem. 409 (2017) 1415–1423. https://doi.org/10.1007/s00216-016-0075-y.

[196] W. Qin, H.-J. Stärk, S. Müller, T. Reemtsma, S. Wagner, Determination of elemental distribution and evaluation of elemental concentration in single *Saccharomyces cerevisiae* cells using single cell-inductively coupled plasma mass spectrometry, Metallomics. 13 (2021) 32. https://doi.org/10.1093/mtomcs/mfab032.

[197] C.N. Tsang, K.S. Ho, H. Sun, W.T. Chan, Tracking bismuth antiulcer drug uptake in single *helicobacter pylori* cells, J Am Chem Soc. 133 (2011) 7355–7357. https://doi.org/10.1021/ja2013278.

[198] J. Shi, X. Ji, Q. Wu, H. Liu, G. Qu, Y. Yin, L. Hu, G. Jiang, Tracking Mercury in Individual Tetrahymena Using a Capillary Single-Cell Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Online System, Anal Chem. 92 (2020) 622–627. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03719.

[199] E. Mavrakis, L. Mavroudakis, N. Lydakis-Simantiris, S.A. Pergantis, Investigating the uptake of arsenate by *chlamydomonas reinhardtii* cells and its effect on their lipid profile using single cell ICP-MS and Easy Ambient Sonic-Spray Ionization-MS, Anal Chem. 91 (2019) 9590–9598. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00917.

[200] S. Meyer, A. López-Serrano, H. Mitze, N. Jakubowski, T. Schwerdtle, Single-cell analysis by ICP-MS/MS as a fast tool for cellular bioavailability studies of arsenite, Metallomics. 10 (2018) 73–76. https://doi.org/10.1039/c7mt00285h.

[201] X. Wei, L.L. Hu, M.L. Chen, T. Yang, J.H. Wang, Analysis of the distribution pattern of chromium species in single cells, Anal Chem. 88 (2016) 12437–12444. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03810.

[202] Y. Cao, J. Feng, L. Tang, C. Yu, G. Mo, B. Deng, A highly efficient introduction system for single cell- ICP-MS and its application to detection of copper in single human red blood cells, Talanta. 206 (2020) 120174. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120174.

[203] X. Shen, H. Zhang, X. He, H. Shi, C. Stephan, H. Jiang, C. Wan, T. Eichholz, Evaluating the treatment effectiveness of copper-based algaecides on toxic algae *Microcystis aeruginosa* using single cell-inductively coupled plasma-mass spectrometry, Anal Bioanal Chem. 411 (2019) 5531–5543. https://doi.org/10.1007/s00216-019-01933-9.

[204] X. Wei, D.H. Zheng, Y. Cai, R. Jiang, M.L. Chen, T. Yang, Z.R. Xu, Y.L. Yu, J.H. Wang, High-Throughput/High-Precision Sampling of Single Cells into ICP-MS for Elucidating Cellular Nanoparticles, Anal Chem. 90 (2018) 14543–14550. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04471.

[205] H. Wang, B. Chen, M. He, X. Li, P. Chen, B. Hu, Study on uptake of gold nanoparticles by single cells using droplet microfluidic chip-inductively coupled plasma mass spectrometry, Talanta. 200 (2019) 398–407. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.03.075.

[206] H. Wang, B. Chen, M. He, B. Hu, A Facile Droplet-Chip-Time-Resolved Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Online System for Determination of Zinc in Single Cell, Anal Chem. 89 (2017) 4931–4938. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00134.

[207] X. Yu, B. Chen, M. He, H. Wang, B. Hu, 3D Droplet-Based Microfluidic Device Easily Assembled from Commercially Available Modules Online Coupled with ICPMS for Determination of Silver in Single Cell, Anal Chem. 91 (2019) 2869–2875. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04844.

[208] L.N. Zheng, M. Wang, B. Wang, H.Q. Chen, O. Hong, Y.L. Zhao, Z.F. Chai, W.Y. Feng, Determination of quantum dots in single cells by inductively coupled plasma mass spectrometry, Talanta. 116 (2013) 782–787. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.07.075.

[209] D. Turiel-Fernández, L. Gutiérrez-Romero, M. Corte-Rodriguez, J. Bettmer, M. Montes-Bayón, Ultrasmall iron oxide nanoparticles cisplatin (IV) prodrug nanoconjugate: ICP-MS based strategies to evaluate the formation and drug delivery capabilities in single cells, Anal Chim Acta. 1159 (2021) 338356. https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338356.

[210] L.N. Zheng, M. Wang, L.C. Zhao, B.Y. Sun, B. Wang, H.Q. Chen, Y.L. Zhao, Z.F. Chai, W.Y. Feng, Quantitative analysis of Gd@C82(OH)22 and cisplatin uptake in single cells by inductively coupled plasma mass spectrometry, Anal Bioanal Chem. 407 (2015) 2383–2391. https://doi.org/10.1007/s00216-014-8422-3.

[211] Y. Zhou, H. Li, H. Sun, Cytotoxicity of arsenic trioxide in single leukemia cells by time-resolved ICP-MS together with lanthanide tags, Chemical Communications. 53 (2017) 2970–2973. https://doi.org/10.1039/c7cc00143f.

[212] Y. Zhou, H. Wang, E. Tse, H. Li, H. Sun, Cell Cycle-Dependent Uptake and Cytotoxicity of Arsenic-Based Drugs in Single Leukemia Cells, Anal Chem. 90 (2018) 10465–10471. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02444.

[213] T. Hilberath, A. Raffaele, L.M. Windeln, V.B. Urlacher, Evaluation of P450 monooxygenase activity in lyophilized recombinant *E. coli* cells compared to resting cells, AMB Express. 11 (2021) 162. https://doi.org/10.1186/s13568-021-01319-0.

[214] R. Thavarajah, V.K. Mudimbaimannar, J. Elizabeth, U.K. Rao, K. Ranganathan, Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation, Journal of Oral and Maxillofacial Pathology. 16 (2012) 400–405. https://doi.org/10.4103/0973-029X.102496.

[215] L. Amable, S. Smith, C. Stephan, New Research Evaluating Cisplatin Uptake in Ovarian Cancer Cells by Single Cell ICP-MS, PerkinElmer. (2017) 1–6.

[216] S. Wilhelm, R.C. Bensen, N. Rama Kothapalli, A.W.G. Burgett, R. Merrifield, C. Stephan, Quantification of Gold Nanoparticle Uptake into Cancer Cells using Single Cell ICP-MS, PerkinElmer. (2017) 1–4.

[217] L. Rasmussen, H. Shi, W. Liu, K.B. Shannon, Quantification of silver nanoparticle interactions with yeast *Saccharomyces cerevisiae* studied using single-cell ICP-MS, Anal Bioanal Chem. 414 (2022) 3077–3086. https://doi.org/10.1007/s00216-022-03937-4.

[218] F. Laborda, C. Trujillo, R. Lobinski, Analysis of microplastics in consumer products by single particle-inductively coupled plasma mass spectrometry using the carbon-13 isotope, Talanta. 221 (2021) 121486. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121486.

[219] W. Qin, H.-J. Stärk, S. Müller, T. Reemtsma, Exploring the Extent of Phosphorus and Heavy Metal Uptake by Single Cells of *Saccharomyces cerevisiae* and Their Effects on Intrinsic Elements by SC-ICP-TOF-MS, Front Microbiol. 13 (2022). https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.870931.

[220] A. Arakawa, N. Jakubowski, G. Koellensperger, S. Theiner, A. Schweikert, S. Flemig, D. Iwahata, H. Traub, T. Hirata, Quantitative imaging of silver nanoparticles and essential elements in thin sections of fibroblast multicellular spheroids by high resolution laser ablation inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry, Anal Chem. 91 (2019) 10197–10203. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02239.

[221] W.Y. Lau, K.H. Chun, W.T. Chan, Correlation of single-cell ICP-MS intensity distributions for the study of heterogeneous cellular responses to environmental stresses, J Anal At Spectrom. 32 (2017) 807–815. https://doi.org/10.1039/c6ja00348f.

[222] M. von der Au, M. Schwinn, K. Kuhlmeier, C. Büchel, B. Meermann, Development of an automated on-line purification HPLC single cell-ICP-MS approach for fast diatom analysis, Anal Chim Acta. 1077 (2019) 87–94. https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.05.045.

[223] K. Löhr, H. Traub, A.J. Wanka, U. Panne, N. Jakubowski, Quantification of metals in single cells by LA-ICP-MS: Comparison of single spot analysis and imaging, J Anal At Spectrom. 33 (2018) 1579–1587. https://doi.org/10.1039/c8ja00191j.

[224] J.W. Alexander, History of the medical use of silver, Surg Infect (Larchmt). 10 (2009) 289–292. https://doi.org/10.1089/sur.2008.9941.

[225] H.J. Klasen, Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses, Burns. 26 (2000) 117–130. https://doi.org/10.1016/S0305-4179(99)00108-4.

[226] H.J. Klasen, A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver, Burns. 26 (2000) 131–138. https://doi.org/10.1016/S0305-4179(99)00116-3.

[227] A.B.G. Lansdown, Silver in Healthcare: Its Antimicrobial Efficacy and Safety in Use, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2010. https://doi.org/10.1039/9781849731799.

[228] F. Barras, L. Aussel, B. Ezraty, Silver and antibiotic, new facts to an old story, Antibiotics. 7 (2018). https://doi.org/10.3390/antibiotics7030079.

[229] M. Catauro, M.G. Raucci, F. De Gaetano, A. Marotta, Antibacterial and bioactive silver-containing Na 2O·CaO·2SiO 2 glass prepared by sol-gel method, J Mater Sci Mater Med. 15 (2004) 831–837. https://doi.org/10.1023/B:JMSM.0000032825.51052.00.

[230] J.H. Crabtree, R.J. Burchette, R.A. Siddiqi, I.T. Huen, L.L. Hadnott, A. Fishman, The efficacy of silver-ion implanted catheters in reducing peritoneal dialysis-related infections, Peritoneal Dialysis International. 23 (2003) 368–374. https://doi.org/10.1177/089686080302300410.

[231] J.R. Morones-Ramirez, J.A. Winkler, C.S. Spina, J.J. Collins, Silver Enhances Antibiotic Activity Against Gram-Negative Bacteria, Sci Transl Med. 5 (2013). https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006276.

[232] M. Herisse, Y. Duverger, I. Martin-Verstraete, F. Barras, B. Ezraty, Silver potentiates aminoglycoside toxicity by enhancing their uptake, Mol Microbiol. 105 (2017) 115–126. https://doi.org/10.1111/mmi.13687.

[233] A.R. Brochado, A. Telzerow, J. Bobonis, M. Banzhaf, A. Mateus, J. Selkrig, E. Huth, S. Bassler, J. Zamarreño Beas, M. Zietek, N. Ng, S. Foerster, B. Ezraty, B. Py, F. Barras, M.M. Savitski, P. Bork, S. Göttig, A. Typas, Species-specific activity of antibacterial drug combinations, Nature. 559 (2018) 259–263. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0278-9.

[234] J.S. Kim, E. Kuk, K.N. Yu, J.-H. Kim, S.J. Park, H.J. Lee, S.H. Kim, Y.K. Park, Y.H. Park, C.-Y. Hwang, Y.-K. Kim, Y.-S. Lee, D.H. Jeong, M.-H. Cho, Antimicrobial effects of silver nanoparticles, Nanomedicine. 3 (2007) 95–101. https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001.

[235] M.K. Rai, S.D. Deshmukh, A.P. Ingle, A.K. Gade, Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria, J Appl Microbiol. 112 (2012) 841–852. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05253.x.

[236] C. Suárez, F. Gudiol, Antibióticos betalactámicos, Enferm Infecc Microbiol Clin. 27 (2009) 116–129. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001.

[237] A. William, J. Petri, Penicilinas, cefalosporinas y otros antibióticos inhibidores de la síntesis de proteinas, in: Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de La Terapéutica, 12th ed., 2012: pp. 1477–1503.

[238] M. Godoy-Gallardo, U. Eckhard, L.M. Delgado, Y.J.D. de Roo Puente, M. Hoyos-Nogués, F.J. Gil, R.A. Perez, Antibacterial approaches in tissue engineering using metal ions and nanoparticles: From mechanisms to applications, Bioact Mater. 6 (2021) 4470–4490. https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.04.033.

[239] T. Schirmer, J.P. Rosenbusch, Prokaryotic and eukaryotic porins, Curr Opin Struct Biol. 1 (1991) 539–545. https://doi.org/10.1016/S0959-440X(05)80075-2.

[240] R.E.W. Hancock, Bacterial outer membranes: evolving concepts, ASM News. 57 (1991) 175–182.

[241] K.J. Woo, C.K. Hye, W.K. Ki, S. Shin, H.K. So, H.P. Yong, Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, Appl Environ Microbiol. 74 (2008) 2171–2178. https://doi.org/10.1128/AEM.02001-07.

[242] Q.L. Feng, J. Wu, G.Q. Chen, F.Z. Cui, T.N. Kim, J.O. Kim, A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, J Biomed Mater Res. 52 (2000) 662–8. https://doi.org/10.1002/1097-4636(20001215)52:4<662::aid-jbm10>3.0.co;2-3.

[243] K. Soo-Hwan, H.-S. Lee, D.-S. Ryu, S.-J. Choi, D.-S. Lee, Antibacterial Activity of Silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in: Korean J. Microbiol. Biotechnol, 2011: pp. 77–85.

[244] N. Aziz, M. Faraz, R. Pandey, M. Shakir, T. Fatma, A. Varma, I. Barman, R. Prasad, Facile Algae-Derived Route to Biogenic Silver Nanoparticles: Synthesis, Antibacterial, and Photocatalytic Properties, Langmuir. 31 (2015) 11605–11612. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b03081.

[245] Universidad de Granada, Microbiología. Bacterias, (2018). https://cursos-0-fc-ugr.github.io/Biologia/Tema5/bloqueII_parte2.html.

[246] H.D. Betts, C. Whitehead, H.H. Harris, Silver in biology and medicine: opportunities for metallomics researchers, Metallomics. 13 (2021) 1. https://doi.org/10.1093/mtomcs/mfaa001.

[247] A. Hamad, K.S. Khashan, A. Hadi, Silver Nanoparticles and Silver Ions as Potential Antibacterial Agents, J Inorg Organomet Polym Mater. 30 (2020) 4811–4828. https://doi.org/10.1007/s10904-020-01744-x.

[248] E.M. del R. Coutiño, L.Á. Lagunes, O.A. Helguera, Las nanopartículas de plata: mecanismos de entrada, toxicidad y estrés oxidativo, Revista de Educación Bioquímica. 36 (2017) 39–54.

[249] O. McNeilly, R. Mann, M. Hamidian, C. Gunawan, Emerging Concern for Silver Nanoparticle Resistance in Acinetobacter baumannii and Other Bacteria, Front Microbiol. 12 (2021) 894. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.652863.

[250] H. Arakawa, J.F. Neault, H.A. Tajmir-Riahi, Silver(I) complexes with DNA and RNA studied by fourier transform infrared spectroscopy and capillary electrophoresis, Biophys J. 81 (2001) 1580–1587. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75812-2.

[251] C. Barros, S. Fulaz, D. Stanisic, L. Tasic, Biogenic Nanosilver against Multidrug-Resistant Bacteria (MDRB), Antibiotics. 7 (2018) 69. https://doi.org/10.3390/antibiotics7030069.

[252] B. Buszewski, V. Railean-Plugaru, P. Pomastowski, K. Rafińska, M. Szultka-Mlynska, P. Golinska, M. Wypij, D. Laskowski, H. Dahm, Antimicrobial activity of biosilver nanoparticles produced by a novel *Streptacidiphilus durhamensis* strain, Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 51 (2018) 45–54. https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.03.002.

[253] I. Sondi, B. Salopek-Sondi, Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria, J Colloid Interface Sci. 275 (2004) 177–182. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012.

[254] L. Biao, S. Tan, Y. Wang, X. Guo, Y. Fu, F. Xu, Y. Zu, Z. Liu, Synthesis, characterization and antibacterial study on the chitosan-functionalized Ag nanoparticles, Materials Science and Engineering C. 76 (2017) 73–80. https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.154.

[255] R. Zhao, M. Lv, Y. Li, M. Sun, W. Kong, L. Wang, S. Song, C. Fan, L. Jia, S. Qiu, Y. Sun, H. Song, R. Hao, Stable Nanocomposite Based on PEGylated and Silver Nanoparticles Loaded Graphene Oxide for Long-Term Antibacterial Activity, ACS Appl Mater Interfaces. 9 (2017) 15328–15341. https://doi.org/10.1021/acsami.7b03987.

[256] W.R. Li, T.L. Sun, S.L. Zhou, Y.K. Ma, Q.S. Shi, X.B. Xie, X.M. Huang, A comparative analysis of antibacterial activity, dynamics, and effects of silver ions and silver nanoparticles against four bacterial strains, Int Biodeterior Biodegradation. 123 (2017) 304–310. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.07.015.

[257] P. Korshed, L. Li, Z. Liu, A. Mironov, T. Wang, Antibacterial mechanisms of a novel type picosecond laser-generated silver-titanium nanoparticles and their toxicity to human cells, Int J Nanomedicine. 13 (2018) 89–101. https://doi.org/10.2147/IJN.S140222.

[258] L.M. Stabryla, K.A. Johnston, J.E. Millstone, L.M. Gilbertson, Emerging investigator series: It's not all about the ion: Support for particle-specific contributions to silver nanoparticle antimicrobial activity, Environ Sci Nano. 5 (2018) 2047–2068. https://doi.org/10.1039/c8en00429c.

[259] N. Durán, M. Durán, M.B. de Jesus, A.B. Seabra, W.J. Fávaro, G. Nakazato, Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity, Nanomedicine. 12 (2016) 789–799. https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.016.

[260] A. Pal, R. Goswami, D.N. Roy, A critical assessment on biochemical and molecular mechanisms of toxicity developed by emerging nanomaterials on important microbes, Environ Nanotechnol Monit Manag. 16 (2021) 100485. https://doi.org/10.1016/j.enmm.2021.100485.

[261] S. Anees Ahmad, S. Sachi Das, A. Khatoon, M. Tahir Ansari, M. Afzal, M. Saquib Hasnain, A. Kumar Nayak, Bactericidal activity of silver nanoparticles: A mechanistic review, Mater Sci Energy Technol. 3 (2020) 756–769. https://doi.org/10.1016/j.mset.2020.09.002.

[262] N. Durán, C.P. Silveira, M. Durán, D.S.T. Martinez, Silver nanoparticle protein corona and toxicity: a mini-review, J Nanobiotechnology. 13 (2015) 55. https://doi.org/10.1186/s12951-015-0114-4.

[263] S. Vishnupriya, K. Chaudhari, R. Jagannathan, T. Pradeep, Single-cell investigations of silver nanoparticle-bacteria interactions, Particle and Particle Systems Characterization. 30 (2013) 1056–1062. https://doi.org/10.1002/ppsc.201300165.

[264] J.R. Morones, J.L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J.B. Kouri, J.T. Ramírez, M.J. Yacaman, The bactericidal effect of silver nanoparticles, Nanotechnology. 16 (2005) 2346–2353. https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059.

[265] C. Baker, A. Pradhan, L. Pakstis, D.J. Pochan, S.I. Shah, Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles, J Nanosci Nanotechnol. 5 (2005) 244–249. https://doi.org/10.1166/jnn.2005.034.

[266] S. Agnihotri, S. Mukherji, S. Mukherji, Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy, RSC Adv. 4 (2014) 3974–3983. https://doi.org/10.1039/c3ra44507k.

[267] A. Abbaszadegan, Y. Ghahramani, A. Gholami, B. Hemmateenejad, S. Dorostkar, M. Nabavizadeh, H. Sharghi, The Effect of Charge at the Surface of Silver Nanoparticles on Antimicrobial Activity against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria: A Preliminary Study, J Nanomater. 2015 (2015) 1–8. https://doi.org/10.1155/2015/720654.

[268] C.Y. San, M.M. Don, Biosynthesis of silver nanoparticles from *Schizophyllum commune* and in-vitro antibacterial and antifungal activity studies, Journal of Physical Science. 24 (2013) 83–96.

[269] J.J. Naddeo, M. Ratti, S.M. O'Malley, J.C. Griepenburg, D.M. Bubb, E.A. Klein, Antibacterial Properties of Nanoparticles: A Comparative Review of Chemically Synthesized and Laser-Generated Particles, Adv Sci Eng Med. 7 (2015) 1044–1057. https://doi.org/10.1166/asem.2015.1811.

[270] N. Hachicho, P. Hoffmann, K. Ahlert, H.J. Heipieper, Effect of silver nanoparticles and silver ions on growth and adaptive response mechanisms of *Pseudomonas putida* mt-2, FEMS Microbiol Lett. 355 (2014) 71–77. https://doi.org/10.1111/1574-6968.12460.

[271] K. Zawadzka, K. Kądzioła, A. Felczak, N. Wrońska, I. Piwoński, A. Kisielewska, K. Lisowska, Surface area or diameter - Which factor really determines the antibacterial activity of silver nanoparticles grown on TiO2 coatings?, New Journal of Chemistry. 38 (2014) 3275–3281. https://doi.org/10.1039/c4nj00301b.

[272] A. Ivask, A. ElBadawy, C. Kaweeteerawat, D. Boren, H. Fischer, Z. Ji, C.H. Chang, R. Liu, T. Tolaymat, D. Telesca, J.I. Zink, Y. Cohen, P.A. Holden, H.A. Godwin, Toxicity Mechanisms in *Escherichia coli* Vary for Silver Nanoparticles and Differ from Ionic Silver, ACS Nano. 8 (2014) 374–386. https://doi.org/10.1021/nn4044047.

[273] A. Ivask, I. Kurvet, K. Kasemets, I. Blinova, V. Aruoja, S. Suppi, H. Vija, A. Käkinen, T. Titma, M. Heinlaan, M. Visnapuu, D. Koller, V. Kisand, A. Kahru, Size-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles to Bacteria, Yeast, Algae, Crustaceans and Mammalian Cells In Vitro, PLoS One. 9 (2014) 102108. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102108.

[274] H. Palza, Antimicrobial polymers with metal nanoparticles, Int J Mol Sci. 16 (2015) 2099–2116. https://doi.org/10.3390/ijms16012099.

[275] B. Sadeghi, F.S. Garmaroudi, M. Hashemi, H.R. Nezhad, A. Nasrollahi, S. Ardalan, S. Ardalan, Comparison of the anti-bacterial activity on the nanosilver shapes: Nanoparticles, nanorods and nanoplates, Advanced Powder Technology. 23 (2012) 22–26. https://doi.org/10.1016/j.apt.2010.11.011.

[276] Y.J. Lee, J. Kim, J. Oh, S. Bae, S. Lee, I.S. Hong, S.H. Kim, Ion-release kinetics and ecotoxicity effects of silver nanoparticles, Environ Toxicol Chem. 31 (2012) 155–159. https://doi.org/10.1002/etc.717.

[277] S. Pal, Y.K. Tak, J.M. Song, Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*, Appl Environ Microbiol. 73 (2007) 1712–1720. https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06.

[278] M. Kujda, M. Oćwieja, Z. Adamczyk, O. Bocheńska, G. Braš, A. Kozik, E. Bielańska, J. Barbasz, Charge stabilized silver nanoparticles applied as antibacterial agents, J Nanosci Nanotechnol. 15 (2015) 3574–3583. https://doi.org/10.1166/jnn.2015.9727.

[279] A.M. El Badawy, R.G. Silva, B. Morris, K.G. Scheckel, M.T. Suidan, T.M. Tolaymat, Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles, Environ Sci Technol. 45 (2011) 283–287. https://doi.org/10.1021/es1034188.

[280] G.A. Sotiriou, A. Meyer, J.T.N. Knijnenburg, S. Panke, S.E. Pratsinis, Quantifying the Origin of Released Ag+ Ions from Nanosilver, Langmuir. 28 (2012) 15929–15936. https://doi.org/10.1021/la303370d.

[281] B. Molleman, T. Hiemstra, Surface Structure of Silver Nanoparticles as a Model for Understanding the Oxidative Dissolution of Silver Ions, Langmuir. 31 (2015) 13361–13372. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b03686.

[282] E. Bae, H.J. Park, J. Lee, Y. Kim, J. Yoon, K. Park, K. Choi, J. Yi, Bacterial cytotoxicity of the silver nanoparticle related to physicochemical metrics and agglomeration properties, Environ Toxicol Chem. 29 (2010) 2154–2160. https://doi.org/10.1002/etc.278.

[283] M. Baalousha, Y. Nur, I. Römer, M. Tejamaya, J.R. Lead, Effect of monovalent and divalent cations, anions and fulvic acid on aggregation of citrate-coated silver nanoparticles, Science of The Total Environment. 454–455 (2013) 119–131. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.093.

[284] C.N. Lok, C.M. Ho, R. Chen, Q.Y. He, W.Y. Yu, H. Sun, P.K.H. Tam, J.F. Chiu, C.M. Che, Silver nanoparticles: Partial oxidation and antibacterial activities, Journal of Biological Inorganic Chemistry. 12 (2007) 527–534. https://doi.org/10.1007/s00775-007-0208-z.

[285] M. Millour, K. Doiron, K. Lemarchand, J.P. Gagné, Does the bacterial media culture chemistry affect the stability of nanoparticles in nanotoxicity assays?, J Xenobiot. 5 (2015) 34–36. https://doi.org/10.4081/xeno.2015.5772.

[286] N. Yekeen, E. Padmanabhan, A.K. Idris, Synergistic effects of nanoparticles and surfactants on n-decane-water interfacial tension and bulk foam stability at high temperature, J Pet Sci Eng. 179 (2019) 814–830. https://doi.org/10.1016/j.petrol.2019.04.109.

[287] F. Ordóñez, F. Chejne, E. Pabón, K. Cacua, Synthesis of ZrO2 nanoparticles and effect of surfactant on dispersion and stability, Ceram Int. 46 (2020) 11970–11977. https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.01.236.

[288] T. Tran, M.E. Gonzalez Perdomo, M. Haghighi, K. Amrouch, Study of the synergistic effects between different surfactant types and silica nanoparticles on the stability of liquid foams at elevated temperature, Fuel. 315 (2022) 122818. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.122818.

[289] L. Kvítek, A. Panáček, J. Soukupová, M. Kolář, R. Večeřová, R. Prucek, M. Holecová, R. Zbořil, Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs), Journal of Physical Chemistry C. 112 (2008) 5825–5834. https://doi.org/10.1021/jp711616v.

[290] W.-R. Li, X.-B. Xie, Q.-S. Shi, H.-Y. Zeng, Y.-S. OU-Yang, Y.-B. Chen, Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*, Appl Microbiol Biotechnol. 85 (2010) 1115–1122. https://doi.org/10.1007/s00253-009-2159-5.

[291] X.H.N. Xu, W.J. Brownlow, S. V Kyriacou, Q. Wan, J.J. Viola, Real-time probing of membrane transport in living microbial cells using single nanoparticle optics and living cell imaging, Biochemistry. 43 (2004) 10400–10413. https://doi.org/10.1021/bi036231a.

[292] Y.M. Long, L.G. Hu, X.T. Yan, X.C. Zhao, Q.F. Zhou, Y. Cai, G. Bin Jiang, Surface ligand controls silver ion release of nanosilver and its antibacterial activity against *Escherichia coli*, Int J Nanomedicine. 12 (2017) 3193–3206. https://doi.org/10.2147/IJN.S132327.

[293] Y. Guo, S. Baumgart, H.-J. Stärk, H. Harms, S. Müller, Mass Cytometry for Detection of Silver at the Bacterial Single Cell Level, Front Microbiol. 8 (2017) 1326. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01326.

[294] A. Delgado-Gonzalez, R.M. Sanchez-Martin, Mass Cytometry Tags: Where Chemistry Meets Single-Cell Analysis, Anal Chem. 93 (2021) 657–664. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03560.

[295] M.S. Jiménez, M. Bakir, D. Isábal, M.T. Gómez, J. Pérez-Arantegui, J.R. Castillo, F. Laborda, Evaluation of hydrodynamic chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry for speciation of dissolved and nanoparticulate gold and silver, Anal Bioanal Chem. 413 (2021) 1689–1699. https://doi.org/10.1007/s00216-020-03132-3.

[296] L. V. Stebounova, E. Guio, V.H. Grassian, Silver nanoparticles in simulated biological media: A study of aggregation, sedimentation, and dissolution, Journal of Nanoparticle Research. 13 (2011) 233–244. https://doi.org/10.1007/s11051-010-0022-3.

[297] H. Bouwmeester, J. Poortman, R.J. Peters, E. Wijma, E. Kramer, S. Makama, K. Puspitaninganindita, H.J.P. Marvin, A.A.C.M. Peijnenburg, P.J.M. Hendriksen, Characterization of translocation of silver nanoparticles and effects on whole-genome gene expression using an in vitro intestinal epithelium coculture model, ACS Nano. 5 (2011) 4091–4103. https://doi.org/10.1021/nn2007145.

[298] Y.-J. Yang, A. V Kelkar, X. Zhu, G. Bai, H.T. Ng, D.S. Corti, E.I. Franses, Effect of sodium dodecylsulfate monomers and micelles on the stability of aqueous dispersions of titanium dioxide pigment nanoparticles against agglomeration and sedimentation, J Colloid Interface Sci. 450 (2015) 434–445. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.02.051.

[299] E.J.W. Verwey, Theory of the stability of lyophobic colloids, Journal of Physical and Colloid Chemistry. 51 (1947) 631–636. https://doi.org/10.1021/j150453a001.

[300] B. Derjaguin, L. Landau, Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes, Prog Surf Sci. 43 (1993) 30–59. https://doi.org/10.1016/0079-6816(93)90013-L.

[301] J.H. Adair, E. Suvaci, J. Sindel, Surface and Colloid Chemistry, in: Encyclopedia of Materials: Science and Technology, Elsevier, 2001: pp. 1–10. https://doi.org/10.1016/b0-08-043152-6/01622-3.

[302] H. Acay, M.F. Baran, A. Eren, Investigating antimicrobial activity of silver nanoparticles produced through green synthesis using leaf extract of common grape (*Vitis Vinifera*), Appl Ecol Environ Res. 17 (2019) 4539–4546. https://doi.org/10.15666/aeer/1702_45394546.

[303] A.A. El-Kheshen, S.F.G. El-Rab, Effect of reducing and protecting agents on size of silver nanoparticles and their anti-bacterial activity, Der Pharma Chemica. 4 (2012) 53–65.

[304] V.H. Toledo, T.M. Yoshimura, S.T. Pereira, C.E. Castro, F.F. Ferreira, M.S. Ribeiro, P.S. Haddad, Methylene blue-covered superparamagnetic iron oxide nanoparticles combined with red light as a novel platform to fight non-local bacterial infections: A proof of concept study against *Escherichia coli*, J Photochem Photobiol B. 209 (2020) 111956. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111956.

[305] M. Ravichandran, N.S. Hettiarachchy, V. Ganesh, S.C. Ricke, S. Singh, Enhancement of antimicrobial activities of naturally occurring phenolic compounds by nanoscale delivery against listeria monocytogenes, *Escherichia Coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* in broth and chicken meat system, J Food Saf. 31 (2011) 462–471. https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2011.00322.x.

[306] C. Callon, A.M. Ndob, A. Savignard, E. Rifa, M.-C. Montel, *Escherichia coli* O26:H11 growth in co-culture with an antagonistic strain of Hafnia alvei according to pH and temperature, Food Control. 62 (2016) 117–124. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.022.

[307] I. Fernando, T. Qian, Y. Zhou, Long term impact of surfactants & polymers on the colloidal stability, aggregation and dissolution of silver nanoparticles, Environ Res. 179 (2019) 108781. https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108781.

[308] V. Pareek, R. Gupta, J. Panwar, Do physico-chemical properties of silver nanoparticles decide their interaction with biological media and bactericidal action? A review, Materials Science and Engineering: C. 90 (2018) 739–749. https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.093.

[309] P.É. Fernandes, R.B.T. Alves, N. de J. Pimentel-Filho, J.P.N. de Sá, H.C. Mantovani, W.E.L. Peña, N.J. de Andrade, Subinhibitory concentrations of silver nanoparticles and silver nitrate on the adaptative and cross-resistance to antibiotics on bovine mastitis pathogens, Ciência Rural. 51 (2021). https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200672.

[310] K.O. Lima, A.A. Vasconcelos, J.J.V. de Sousa Júnior, S.K.S. Escher, G. Nakazato, P.S. Taube Júnior, Green synthesis of silver nanoparticles using Amazon fruits, International Journal of Nanoscience and Nanotechnology. 15 (2019) 179–188.

[311] E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, F. Laborda, I. Abad-Álvaro, C. Bladé, L. Arola, J.R. Castillo, Detection and characterization of silver nanoparticles and dissolved species of silver in culture medium and cells by AsFlFFF-UV-Vis-ICPMS: Application to nanotoxicity tests, Analyst. 139 (2014) 914–922. https://doi.org/10.1039/c3an01443f.

[312] Z.V. Feng, I.L. Gunsolus, T.A. Qiu, K.R. Hurley, L.H. Nyberg, H. Frew, K.P. Johnson, A.M. Vartanian, L.M. Jacob, S.E. Lohse, M.D. Torelli, R.J. Hamers, C.J. Murphy, C.L. Haynes, Impacts of gold nanoparticle charge and ligand type on surface binding and toxicity to Gram-negative and Gram-positive bacteria, Chem Sci. 6 (2015) 5186–5196. https://doi.org/10.1039/C5SC00792E.

[313] T. Silva, L.R. Pokhrel, B. Dubey, T.M. Tolaymat, K.J. Maier, X. Liu, Particle size, surface charge and concentration dependent ecotoxicity of three organo-coated silver nanoparticles: Comparison between general linear model-predicted and observed toxicity, Science of The Total Environment. 468–469 (2014) 968–976. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.006.

[314] E. Amato, Y.A. Diaz-Fernandez, A. Taglietti, P. Pallavicini, L. Pasotti, L. Cucca, C. Milanese, P. Grisoli, C. Dacarro, J.M. Fernandez-Hechavarria, V. Necchi, Synthesis, characterization and antibacterial activity against gram positive and gram negative bacteria of biomimetically coated silver nanoparticles, Langmuir. 27 (2011) 9165–9173. https://doi.org/10.1021/la201200r.

[315] K.A. Johnston, L.M. Stabryla, A.M. Smith, X.Y. Gan, L.M. Gilbertson, J.E. Millstone, Impacts of broth chemistry on silver ion release, surface chemistry composition, and bacterial cytotoxicity of silver nanoparticles, Environ Sci Nano. 5 (2018) 304–312. https://doi.org/10.1039/c7en00974g.

[316] M.A. Doody, D. Wang, H.P. Bais, Y. Jin, Differential antimicrobial activity of silver nanoparticles to bacteria *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*, and toxicity to crop plant Zea mays and beneficial *B. subtilis*-inoculated Z. mays, Journal of Nanoparticle Research. 18 (2016) 290. https://doi.org/10.1007/s11051-016-3602-z.

[317] A. Georgantzopoulou, Y.L. Balachandran, P. Rosenkranz, M. Dusinska, A. Lankoff, M. Wojewodzka, M. Kruszewski, C. Guignard, J.-N. Audinot, S. Girija, L. Hoffmann, A.C. Gutleb, Ag nanoparticles: size- and surface-dependent effects on model aquatic organisms and uptake evaluation with NanoSIMS, Nanotoxicology. 7 (2013) 1168–1178. https://doi.org/10.3109/17435390.2012.715312.

[318] A.D. Burchardt, R.N. Carvalho, A. Valente, P. Nativo, D. Gilliland, C.P. Garcìa, R. Passarella, V. Pedroni, F. Rossi, T. Lettieri, Effects of silver nanoparticles in diatom *Thalassiosira pseudonana* and *cyanobacterium Synechococcus* sp., Environ Sci Technol. 46 (2012) 11336–11344. https://doi.org/10.1021/es300989e.

[319] A. Ivask, O. Bondarenko, N. Jepihhina, A. Kahru, Profiling of the reactive oxygen species-related ecotoxicity of CuO, ZnO, TiO2, silver and fullerene nanoparticles using a set of recombinant luminescent *Escherichia coli* strains: Differentiating the impact of particles and solubilised metals, Anal Bioanal Chem. 398 (2010) 701–716. https://doi.org/10.1007/s00216-010-3962-7.

[320] Z.M. Xiu, J. Ma, P.J.J. Alvarez, Differential effect of common ligands and molecular oxygen on antimicrobial activity of silver nanoparticles versus silver ions, Environ Sci Technol. 45 (2011) 9003–9008. https://doi.org/10.1021/es201918f.

[321] Z.M. Xiu, Q.B. Zhang, H.L. Puppala, V.L. Colvin, P.J.J. Alvarez, Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles, Nano Lett. 12 (2012) 4271–4275. https://doi.org/10.1021/nl301934w.

[322] M. Visnapuu, U. Joost, K. Juganson, K. Künnis-Beres, A. Kahru, V. Kisand, A. Ivask, Dissolution of Silver Nanowires and Nanospheres Dictates Their Toxicity to *Escherichia coli*, Biomed Res Int. 2013 (2013) 1–9. https://doi.org/10.1155/2013/819252.

[323] M.A. Maurer-Jones, M.P.S. Mousavi, L.D. Chen, P. Bühlmann, C.L. Haynes, Characterization of silver ion dissolution from silver nanoparticles using fluorous-phase ion-selective electrodes and assessment of resultant toxicity to *Shewanella oneidensis*, Chem Sci. 4 (2013) 2564–2572. https://doi.org/10.1039/c3sc50320h.

[324] T.S. Radniecki, D.P. Stankus, A. Neigh, J.A. Nason, L. Semprini, Influence of liberated silver from silver nanoparticles on nitrification inhibition of *Nitrosomonas europaea*, Chemosphere. 85 (2011) 43–49. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.039.

[325] A.B. Smetana, K.J. Klabunde, G.R. Marchin, C.M. Sorensen, Biocidal activity of nanocrystalline silver powders and particles, Langmuir. 24 (2008) 7457–7464. https://doi.org/10.1021/la800091y.

[326] C.L. Arnaout, C.K. Gunsch, Impacts of silver nanoparticle coating on the nitrification potential of N*itrosomonas europaea*, Environ Sci Technol. 46 (2012) 5387–5395. https://doi.org/10.1021/es204540z.

[327] J.S. McQuillan, H. Groenaga Infante, E. Stokes, A.M. Shaw, Silver nanoparticle enhanced silver ion stress response in *Escherichia coli* K12, Nanotoxicology. 6 (2012) 857–866. https://doi.org/10.3109/17435390.2011.626532.

[328] N.T. Giao, T. Limpiyakorn, P. Kunapongkiti, P. Thuptimdang, S. Siripattanakul-Ratpukdi, Influence of silver nanoparticles and liberated silver ions on nitrifying sludge: ammonia oxidation inhibitory kinetics and mechanism, Environmental Science and Pollution Research. 24 (2017) 9229–9240. https://doi.org/10.1007/s11356-017-8561-0.

[329] H. Deng, D. McShan, Y. Zhang, S.S. Sinha, Z. Arslan, P.C. Ray, H. Yu, Mechanistic Study of the Synergistic Antibacterial Activity of Combined Silver Nanoparticles and Common Antibiotics, Environ Sci Technol. 50 (2016) 8840–8848. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00998.

[330] A. de Souza, D. Mehta, R.W. Leavitt, Bactericidal activity of combinations of Silver-Water Dispersion™ with 19 antibiotics against seven microbial strains, Curr Sci. 91 (2006) 926–929.

[331] S. Gurunathan, J.W. Han, D.N. Kwon, J.H. Kim, Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria, Nanoscale Res Lett. 9 (2014) 1–17. https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-373.

[332] A. Kaur, S. Preet, V. Kumar, R. Kumar, R. Kumar, Synergetic effect of vancomycin loaded silver nanoparticles for enhanced antibacterial activity, Colloids Surf B Biointerfaces. 176 (2019) 62–69. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.12.043.

[333] N. Durán, P.D. Marcato, R. de Conti, O.L. Alves, F.T.M. Costa, M. Brocchi, Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action, J Braz Chem Soc. 21 (2010) 949–959. https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000600002.

[334] E.C. Böttger, D. Crich, Aminoglycosides: Time for the Resurrection of a Neglected Class of Antibacterials?, ACS Infect Dis. 6 (2020) 168–172. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00441.

[335] J. Molina, E. Cordero, J. Palomino, J. Pachón, Aminoglucósidos y polimixinas, Enferm Infecc Microbiol Clin. 27 (2009) 178–188. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.02.001.

[336] H.W. Taber, J.P. Mueller, P.F. Miller, A.S. Arrow, Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics, Microbiol Rev. 51 (1987) 439–457. https://doi.org/10.1128/mmbr.51.4.439-457.1987.

[337] C. MacDougall, H.F. Chambers, Aminoglucósidos, in: Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de La Terapéutica, 12th ed., 2012: pp. 1505–1520.

[338] M. Juhas, E. Widlake, J. Teo, D.L. Huseby, J.M. Tyrrell, Y.S. Polikanov, O. Ercan, A. Petersson, S. Cao, A.F. Aboklaish, A. Rominski, D. Crich, E.C. Böttger, T.R. Walsh, D. Hughes, S.N. Hobbie, In vitro activity of apramycin against multidrug-, carbapenem- and aminoglycoside-resistant *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii,* Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 74 (2019) 944–952. https://doi.org/10.1093/jac/dky546.

[339] E. Bordeleau, P.J. Stogios, E. Evdokimova, K. Koteva, A. Savchenko, G.D. Wright, ApmA is a unique aminoglycoside antibiotic acetyltransferase that inactivates apramycin, MBio. 12 (2021) 1–11. https://doi.org/10.1128/mBio.02705-20.

[340] H.R. Ali, A.N. Emam, E.G. Hefny, N.F. Koraney, A.S. Mansour, A.M. Salama, S.F. Ali, S.H. Aboolo, M.A. Shahein, Silver nanoparticles enhance the effectiveness of traditional antibiotics against *S. aureus* causing bovine mastitis within the safety limit, Journal of Nanoparticle Research. 23 (2021) 1–18. https://doi.org/10.1007/s11051-021-05349-4.

[341] J.L. Kadurugamuwa, A.J. Clarke, T.J. Beveridge, Surface action of gentamicin on *Pseudomonas aeruginosa*, J Bacteriol. 175 (1993) 5798–5805. https://doi.org/10.1128/jb.175.18.5798-5805.1993.

[342] N.L. Martin, T.J. Beveridge, Gentamicin interaction with *Pseudomonas aeruginosa* cell envelope, Antimicrob Agents Chemother. 29 (1986) 1079–1087. https://doi.org/10.1128/AAC.29.6.1079.

[343] M.B. Habash, M.C. Goodyear, A.J. Park, M.D. Surette, E.C. Vis, R.J. Harris, C.M. Khursigara, Potentiation of Tobramycin by Silver Nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms, Antimicrob Agents Chemother. 61 (2017). https://doi.org/10.1128/AAC.00415-17.

[344] M.B. Habash, A.J. Park, E.C. Vis, R.J. Harris, C.M. Khursigara, Synergy of silver nanoparticles and aztreonam against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilms., Antimicrob Agents Chemother. 58 (2014) 5818–30. https://doi.org/10.1128/AAC.03170-14.

[345] H.O. Hallander, K. Dornbusch, L. Gezelius, K. Jacobson, I. Karlsson, Synergism between aminoglycosides and cephalosporins with antipseudomonal activity: Interaction index and killing curve method, Antimicrob Agents Chemother. 22 (1982) 743–752. https://doi.org/10.1128/AAC.22.5.743.

[346] A.M. Horrevorts, M.F. Michel, K.F. Kerrebijn, Antibiotic interaction: Interpretation of fractional inhibitory and fractional bactericidal concentration indices, Eur J Clin Microbiol. 6 (1987) 502–503. https://doi.org/10.1007/BF02013128.

[347] M.J. Anderson, M.E. Horn, Y.C. Lin, P.J. Parks, M.L. Peterson, Efficacy of concurrent application of chlorhexidine gluconate and povidone iodine against six nosocomial pathogens, Am J Infect Control. 38 (2010) 826–831. https://doi.org/10.1016/j.ajic.2010.06.022.

[348] M.A. Radzig, V.A. Nadtochenko, O.A. Koksharova, J. Kiwi, V.A. Lipasova, I.A. Khmel, Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: Influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action, Colloids Surf B Biointerfaces. 102 (2013) 300–306. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.07.039.

[349] B.A. Glišić, L. Senerovic, P. Comba, H. Wadepohl, A. Veselinovic, D.R. Milivojevic, M.I. Djuran, J. Nikodinovic-Runic, Silver(I) complexes with phthalazine and quinazoline as effective agents against pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* strains, J Inorg Biochem. 155 (2016) 115–128. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.11.026.

[350] M. Hundáková, M. Valášková, V. Tomášek, E. Pazdziora, K. Matějová, Silver and/or copper vermiculites and their antibacterial effect, Acta Geodynamica et Geomaterialia. 10 (2013) 97–104. https://doi.org/10.13168/AGG.2013.0009.

[351] O.M. Bondarenko, M. Sihtmäe, J. Kuzmičiova, L. Ragelienė, A. Kahru, R. Daugelavičius, Plasma membrane is the target of rapid antibacterial action of silver nanoparticles in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, Int J Nanomedicine. Volume 13 (2018) 6779–6790. https://doi.org/10.2147/IJN.S177163.

[352] P.P. Desai, C. Prabhurajeshwar, K.R. Chandrakanth, Hydrothermal assisted biosynthesis of silver nanoparticles from *Streptomyces sp*. GUT 21 (KU500633) and its therapeutic antimicrobial activity, J Nanostructure Chem. 6 (2016) 235–246. https://doi.org/10.1007/s40097-016-0197-y.

[353] A.D. Kang, K.P. Smith, G.M. Eliopoulos, A.H. Berg, C. McCoy, J.E. Kirby, In vitro Apramycin Activity against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*, Diagn Microbiol Infect Dis. 88 (2017) 188–191. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.03.006.

[354] G. Di Bonaventura, V. Lupetti, F. Verginelli, S. Giancristofaro, R. Barbieri, G. Gherardi, A. Pompilio, Repurposing the Veterinary Antibiotic Apramycin for Antibacterial and Antibiofilm Activity Against *Pseudomonas aeruginosa* From Cystic Fibrosis Patients, Front Microbiol. 12 (2022) 4140. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.801152.

[355] M. Gysin, P.Y. Hon, P. Tan, A. Sengduangphachanh, M. Simmalavong, P. Hinfonthong, N. Kaewphanderm, T.D. Pham, T.H. Nguyen, K. Haldimann, K. Becker, H.R. van Doorn, J. Hopkins, A.J.H. Simpson, E.A. Ashley, T. Kesteman, H.H. Tran, S. Vasoo, C.L. Ling, T. Roberts, P. Turner, S.N. Hobbie, Apramycin susceptibility of multidrug-resistant Gram-negative blood culture isolates in five countries in Southeast Asia, Int J Antimicrob Agents. 60 (2022) 106659. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2022.106659.

[356] Y. Yang, T. Xiao, J. Li, P. Cheng, F. Li, H. Yu, R. Liu, I. Muhammad, X. Zhang, Wild-type cutoff for Apramycin against *Escherichia coli*, BMC Vet Res. 16 (2020) 309. https://doi.org/10.1186/s12917-020-02522-0.

[357] E. Tian, I. Muhammad, W. Hu, Z. Wu, R. Li, X. Lu, C. Chen, J. Li, Tentative epidemiologic cut-off value and resistant characteristic detection of apramycin against *Escherichia coli* from chickens, FEMS Microbiol Lett. 366 (2019) 196. https://doi.org/10.1093/femsle/fnz196.

[358] A. Kobe, A. Ebrecht, R. Fries, Minimum inhibitory concentrations of intestinal *Escherichia coli* from broiler chickens after oral administration of apramycin, Journal of Applied Bacteriology. 80 (1996) 26–30. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03185.x.

[359] A. Kazemnia, M. Ahmadi, K. Mardani, M. Moradi, R. Darvishzadeh, Combined efficacy of silver nanoparticles and commercial antibiotics on different phylogenetic groups of *Escherichia coli*, Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society. 70 (2019) 1647–1654. https://doi.org/10.12681/jhvms.21788.

[360] H. Baskin, Y. Dogan, I. Hakki Bahar, N. Yulug, Effect of subminimal inhibitory concentrations of gentamicin, penicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole on adherence of uropathogenic *Escherichia coli* strains, Journal of Chemotherapy. 14 (2002) 161–165. https://doi.org/10.1179/joc.2002.14.2.161.

[361] R.J. Fass, J. Barnishan, Minimal inhibitory concentrations of 34 antimicrobial agents for control strains *Escherichia coli* ATCC 25922 and Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, Antimicrob Agents Chemother. 16 (1979) 622–624. https://doi.org/10.1128/AAC.16.5.622.

[362] R. Soltani, H. Fazeli, R.B. Najafi, A. Jelokhanian, Evaluation of the synergistic effect of tomatidine with several antibiotics against standard and clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*, Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 16 (2017) 290–296.

[363] D. Dundar, M. Otkun, In-Vitro Efficacy of Synergistic Antibiotic Combinations in Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains, Yonsei Med J. 51 (2010) 111–116. https://doi.org/10.3349/ymj.2010.51.1.111.

[364] A.J. Kora, L. Rastogi, Enhancement of Antibacterial Activity of Capped Silver Nanoparticles in Combination with Antibiotics, on Model Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria, Bioinorg Chem Appl. 2013 (2013) 1–7. https://doi.org/10.1155/2013/871097.

[365] L.-J. Dong, Y.-J. Lai, S.-J. Yu, J.-F. Liu, Speciation Analysis of the Uptake and Biodistribution of Nanoparticulate and Ionic Silver in *Escherichia coli*, Anal Chem. 91 (2019) 12525–12530. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03359.

[366] T. Perez Urena, M. Espinosa, I. Barasoain, A. Portoles, Estudio microbiológico de esferoplastos de *Pseudomonas* patógenas producidos por antibiosis a nivel de pared y membrana, Microbiol Esp. 27 (1974) 235–255.

[367] J.B. Bulitta, N.S. Ly, C.B. Landersdorfer, N.A. Wanigaratne, T. Velkov, R. Yadav, A. Oliver, L. Martin, B.S. Shin, A. Forrest, B.T. Tsuji, Two mechanisms of killing of *Pseudomonas aeruginosa* by tobramycin assessed at multiple inocula via mechanism-based modeling, Antimicrob Agents Chemother. 59 (2015) 2315–2327. https://doi.org/10.1128/AAC.04099-14.

VI. ANEXOS

ANEXO 1. DETECCIÓN DE PARTÍCULAS INDIVIDUALES MEDIANTE ICP-MS

A1.1. Validación del método de SP-ICP-MS como método de *screening*

Cuando SP-ICP-MS se usa como método de *screening* cualitativo para la detección de partículas, las respuestas deben ser binarias (presencia/ausencia, positivo/negativo). Por tanto, los parámetros analíticos se establecen en las probabilidades que surgen de cuatro posibles respuestas binarias:

- Verdadero positivo (VP): cuando el método da un resultado positivo para una muestra de análisis que es positiva (contiene partículas a concentraciones por encima del valor crítico).

- Falso positivo (FP): cuando el método da un resultado positivo para una muestra de análisis que es negativa (contiene partículas a concentraciones igual o por debajo del valor crítico).

- Verdadero negativo (VN): cuando el método da un resultado negativo para una muestra de análisis que es negativa (contiene partículas a concentraciones igual o por debajo del valor crítico).

- Falso negativo (FN): cuando el método da un resultado negativo para una muestra de análisis que es positiva (contiene partículas a concentraciones por encima del valor crítico).

Las tablas de contingencia se construyeron a partir del análisis de una serie de suspensiones con concentraciones en número por encima y por debajo del valor crítico ($1x10^5$ L^{-1} para el experimento considerado). Se midieron 10 alícuotas para cada concentración y se clasificaron como positivos si el número de eventos de partículas detectados era mayor que el valor crítico determinado de las medidas del blanco y de la ecuación $Y_{C,N} = Y_{N,B} + 2{,}33\sqrt{Y_{N,B}}$. De lo contrario, las muestras de análisis se clasificaron como negativas.

Las Tabla A1.1.1 y Tabla A1.1.2 recogen los resultados obtenidos para los experimentos con nanopartículas de plata y de oro de 100 nm, respectivamente. Las Tabla A1.1.3 y Tabla A1.1.4 son tablas de contingencia de 2x2 obtenidas de los datos de las Tabla A1.1.1 y Tabla A1.1.2, respectivamente.

La Tabla A1.1.5 muestra las expresiones usadas para el cálculo de los siguientes parámetros analíticos: sensibilidad, especificidad, falsos positivos y falsos negativos [1,2].

Tabla A1.1.1. *Análisis de screening de suspensiones de AgNPs de 100 nm.*

Concentración en número de AgNPs L^{-1}	**Respuesta verdadera**	**VP**	**FN**	**VN**	**FP**
$6{,}68 \times 10^5$	Positivo	10	0		
$3{,}28 \times 10^5$	Positivo	10	0		
$1{,}49 \times 10^5$	Positivo	4	6		
$9{,}04 \times 10^4$	Negativo			9	1
$5{,}18 \times 10^4$	Negativo			10	0
$2{,}21 \times 10^4$	Negativo			10	0
$8{,}29 \times 10^3$	Negativo			10	0

Tabla A1.1.2. *Análisis de screening de suspensiones de AuNPs de 100 nm.*

Concentración en número de AuNPs L^{-1}	**Respuesta verdadera**	**VP**	**FN**	**VN**	**FP**
$7{,}68 \times 10^5$	Positivo	10	0		
$3{,}84 \times 10^5$	Positivo	10	0		
$2{,}09 \times 10^5$	Positivo	8	2		
$1{,}31 \times 10^5$	Positivo	5	5		
$7{,}30 \times 10^4$	Negativo			9	1
$1{,}12 \times 10^4$	Negativo			10	0
$1{,}13 \times 10^3$	Negativo			10	0

Tabla A1.1.3. *Tablas de contingencia para el análisis de screening de las suspensiones de AgNPs de 100 nm de la Tabla A1.1.1.*

	Concentración en número de partícula		**Total**
Resultado	$\geq Y_{C,N}$	$< Y_{C,N}$	
Positivo	VP=24	FP=1	VP+FP=25
Negativo	FN=6	VN=39	VN+FN=45
Total	VP+FN=30	VN+FP=40	70

Tabla A1.1.4. *Tablas de contingencia para el análisis de screening de las suspensiones de AuNPs de 100 nm de la Tabla A1.1.2.*

Resultado	Concentración en número de partícula		Total
	$\geq Y_{C,N}$	$< Y_{C,N}$	
Positivo	VP=33	FP=1	VP+FP=34
Negativo	FN=7	VN=29	VN+FN=36
Total	VP+FN=30	VN+FP=40	70

Tabla A1.1.5. *Expresiones para calcular los parámetros analíticos asociados a las tablas de contingencia)* [1,2].

Sensibilidad = $\frac{\text{Número de resultados verdaderos positivos}}{\text{Número total de positivos reales}} = \frac{\text{VP}}{\text{VP+FN}} \times 100$

Tasa de falsos negativos = $\frac{\text{Número de resultados falsos negativos}}{\text{Número total de positivos reales}} =$

$$= 100 - \text{sensibilidad} = \frac{\text{FN}}{\text{VP+FN}} \times 100$$

Especificidad= $\frac{\text{Número de resultados verdaderos negativos}}{\text{Número total de negativos reales}} = \frac{\text{VN}}{\text{VN+FP}} \times 100$

Tasa de falsos positivos = $\frac{\text{Número de resultados falsos positivos}}{\text{Número total de positivos reales}} =$

$$= 100 - \text{especificidad} = \frac{\text{FP}}{\text{VN+FP}} \times 100$$

A1.2. Efecto del valor crítico de tamaño en las distribuciones de tamaño

Los datos brutos de las medidas de las suspensiones de nanopartículas de plata de 40 nm a las que se les adicionó concentraciones crecientes de plata iónica se procesaron usando el *software* de acceso abierto SPCal versión 0.7.1. Los datos brutos se procesaron usando un filtro de Poisson, el valor del parámetro de épsilon se fijó en 0, debido a que no se observaron efectos significativos cuando se varió de 0 a 1. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla A1.2.1 y las distribuciones de tamaño se presentan en la Figura A1.2.1.

Tabla A1.2.1. *Tamaño promedio, concentración en número de nanopartículas, valores críticos de tamaño ($X_C^{tamaño}$) y recuperaciones para suspensiones de AgNPs de 40 nm a las que se les adicionó concentraciones crecientes de Ag(I). Tiempo de lectura: 100 µs. Tiempo total de adquisición: 60 s. Media ± desviación estándar (n=3).*

Suspensión	Intensidad línea base cuentas	$X_C^{tamaño}$ nm	Tamaño promedio nm	Concentración en número L^{-1}	Recuperación %
AgNPs 40 nm	0,06	20,6	38,1 ± 0,2	(1,51 ± 0,03)x10^8	101 ± 2
AgNPs 40 nm + 0,02 µg L^{-1} Ag(I)	0,1	20,8	38,6 ± 0,2	(1,36 ± 0,01)x10^8	96 ± 1
AgNPs 40 nm + 0,15 µg L^{-1} Ag(I)	0,5	22,7	38,3 ± 0,2	(1,29 ± 0,01)x10^8	89 ± 1
AgNPs 40 nm + 0,26 µg L^{-1} Ag(I)	1	24,5	39,7 ± 0,1	(1,19 ± 0,03)x10^8	82 ± 2
AgNPs 40 nm + 1,34 µg L^{-1} Ag(I)	5	31,4	43,8 ± 0,1	(7,9± 0,4)x10^7	55 ± 3
AgNPs 40 nm + 2,44 µg L^{-1} Ag(I)	11	36,0	47,6 ± 0,1	(4,4± 0,1)x10^7	30 ± 1

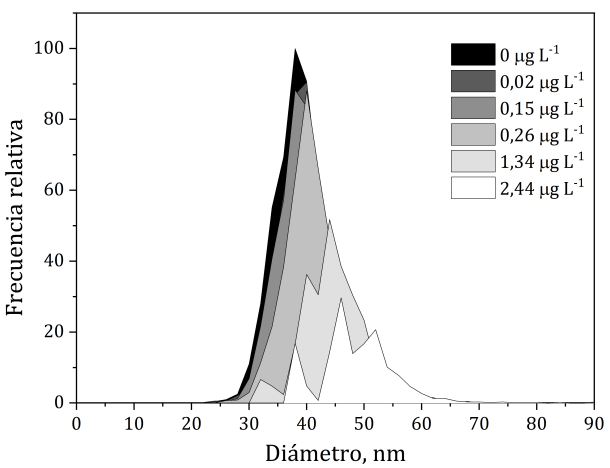


Figura A1.2.1. *Distribuciones de tamaño de AgNPs de 40 nm con concentraciones crecientes de Ag(I). Tiempo de lectura: 100 µs. La leyenda muestra la concentración de Ag(I) adicionada a las suspensiones de AgNPs.*

A1.3. Aplicación del procedimiento en nanomateriales bactericidas

Los dos nanomateriales antimicrobianos (M1 y M2) se analizaron mediante cromatografía hidrodinámica acoplada a ICP-MS (HDC-ICP-MS) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) para su caracterización detallada. Estos análisis fueron realizados por otros miembros del grupo de investigación. HDC permite la separación y cuantificación directa de las formas particuladas y disueltas de la plata [3], mientras que la microscopía electrónica se utilizó para visualizar las nanopartículas en las muestras y obtener información relacionada con su tamaño y forma.

Los resultados obtenidos de plata total cuantificada mediante espectrometría de absorción atómica (EAA), así como los contenidos de plata disuelta y nanopartículas determinados mediante HDC-ICP-MS se recogen en la Tabla A1.3.1. La concentración en masa de las nanopartículas de plata y la plata disuelta determinada mediante HDC-ICP-MS representaron el 29 y 71 %, respectivamente, en ambas muestras. Por otro lado, la plata total cuantificada mediante HDC-ICP-MS concordaba con la plata total medida mediante EAA (recuperaciones del 97 y 101 % en M1 y M2, respectivamente).

Tabla A1.3.1. *Caracterización de tamaño promedio y concentración en masa de los nanomateriales antimicrobianos analizados mediante HDC-ICP-MS, espectrometría de absorción atómica (EAA) y TEM. Media ± desviación estándar (n = 3 réplicas para HDC y EAA; n = aproximadamente 400 partículas para TEM).*

	HDC-ICP-MS			**EAA**	**TEM**
	AgNPs		**Ag(I)**	**Ag total**	
Nanomaterial	**Tamaño promedio nm**	**Concentración en masa mg L^{-1}**	**Concentración en masa mg L^{-1}**	**Concentración en masa mg L^{-1}**	**Tamaño promedio nm**
M1	10 ± 2	43 ± 5	104 ± 5	143 ± 4	9 ± 3
M2	12 ± 2	213 ± 14	515 ± 46	736 ± 25	15 ± 8

La Figura A1.3.1 muestra las imágenes de TEM obtenidas de las muestras y las distribuciones de tamaño tras medir unas 400 partículas por muestra. Los tamaños promedio y las desviaciones estándar de las distribuciones se recogen en la Tabla A1.3.1.

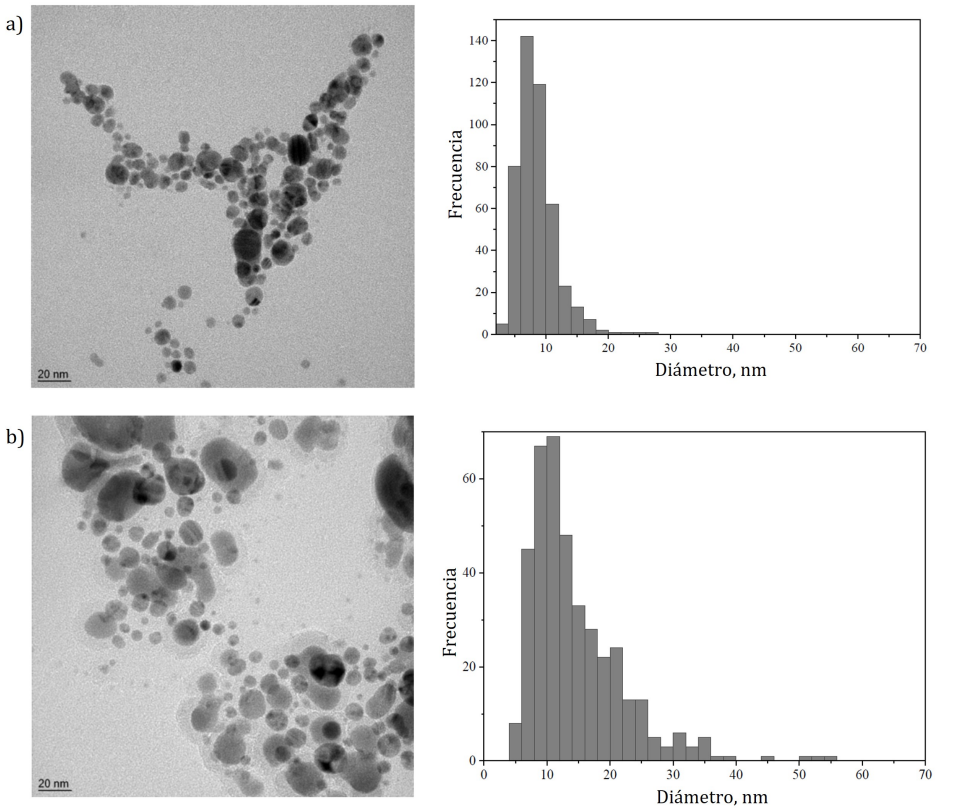


Figura A1.3.1. *Imágenes de TEM y distribuciones de tamaño de los nanomateriales antimicrobianos a) M1 y b) M2.*

Bibliografía

[1] A. Pulido, I. Ruisánchez, R. Boqué, F.X. Rius, Uncertainty of results in routine qualitative analysis, TrAC - Trends in Analytical Chemistry. 22 (2003) 647–654. https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01104-X.

[2] M.I. López, M.P. Callao, I. Ruisánchez, A tutorial on the validation of qualitative methods: From the univariate to the multivariate approach, Anal Chim Acta. 891 (2015) 62–72. https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.06.032.

[3] M.S. Jiménez, M. Bakir, D. Isábal, M.T. Gómez, J. Pérez-Arantegui, J.R. Castillo, F. Laborda, Evaluation of hydrodynamic chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry for speciation of dissolved and nanoparticulate gold and silver, Anal Bioanal Chem. 413 (2021) 1689–1699. https://doi.org/10.1007/s00216-020-03132-3.

ANEXO 2. DETECCIÓN DE CÉLULAS INDIVIDUALES MEDIANTE ICP-MS

A2.1. Optimización de los parámetros instrumentales para la detección de zinc en SC-ICP-MS

Una vez seleccionado el zinc como elemento endógeno marcador de bacterias, se optimizaron los parámetros instrumentales para su detección en SC-ICP-MS. La medida de algunos isótopos en ICP-MS está dificultada por la presencia de interferencias espectrales causadas por isótopos isobáricos o especies poliatómicas originadas por el argón o la matriz de la muestra [1]. En la determinación de zinc pueden interferir varias especies poliatómicas de azufre, titanio, fósforo, calcio, cloro y argón, así como el níquel (isótopo 64) cuando se usa el isótopo más abundante ^{64}Zn [1–4]. Estos elementos se encuentran normalmente en muestras biológicas, como se puede comprobar en la Tabla 2.6 del Capítulo 2. En la Tabla A2.1.1 se recogen las interferencias más importantes que hay que tener en cuenta en la determinación de zinc en función del isótopo medido [5].

Tabla A2.1.1. *Interferencias espectrales isobáricas y poliatómicas en la determinación de zinc mediante ICP-MS.*

Isótopo	Abundancia	Interferencias
^{64}Zn	48,89 %	^{64}Ni, $^{32}S^{16}O_2^+$, $^{48}Ti^{16}O^+$, $^{31}P^{16}O_2{}^1H^+$, $^{48}Ca^{16}O^+$, $^{32}S_2^+$, $^{31}P^{16}O^{17}O^+$, $^{34}S^{16}O_2^+$, $^{36}Ar^{14}N_2^+$
^{66}Zn	27,89 %	$^{50}Ti^{16}O^+$, $^{34}S^{16}O_2^+$, $^{33}S^{16}O_2{}^1H^+$, $^{32}S^{16}O^{18}O^+$, $^{32}S^{17}O_2^+$, $^{33}S^{16}O^{17}O^+$, $^{32}S^{34}S^+$, $^{33}S_2^+$
^{67}Zn	4,11 %	$^{35}Cl^{16}O_2^+$, $^{33}S^{34}S^+$, $^{34}S^{16}O_2{}^1H^+$, $^{32}S^{16}O^{18}O^1H^+$, $^{33}S^{34}S^+$, $^{34}S^{16}O^{17}O^+$, $^{33}S^{16}O^{18}O^+$, $^{32}S^{17}O^{18}O^+$, $^{33}S^{17}O_2^+$, $^{35}Cl^{16}O_2^+$
^{68}Zn	18,57 %	$^{36}S^{16}O_2^+$, $^{34}S^{16}O^{18}O^+$, $^{40}Ar^{14}N_2^+$, $^{35}Cl^{16}O^{17}O^+$, $^{34}S_2^+$, $^{36}Ar^{32}S^+$, $^{34}S^{17}O_2^+$, $^{33}S^{17}O^{18}O^+$, $^{32}S^{18}O_2^+$, $^{32}S^{36}S^+$
^{70}Zn	0,62 %	^{70}Ge, $^{35}Cl^{35}Cl^+$, $^{40}Ar^{14}N^{16}O^+$, $^{35}Cl^{17}O^{18}O^+$, $^{37}Cl^{16}O^{17}O^+$, $^{34}S^{18}O_2^+$, $^{36}S^{16}O^{18}O^+$, $^{36}S^{17}O_2^+$, $^{34}S^{36}S^+$, $^{36}Ar^{34}S^+$, $^{38}Ar^{32}S^+$

El efecto de las interferencias espectrales en ICP-MS puede reducirse mediante el uso de celdas de colisión/reacción. En concreto, el uso de He [1,2] y NH_3 [3,4] como gases de colisión y reacción, respectivamente, ha sido estudiado y comparado con el

modo convencional (sin gas) para la determinación de zinc. A la vista de estos estudios, se evaluó la sensibilidad obtenida para una disolución de zinc en modo de análisis convencional (sin gas) y en modo de celda de colisión/reacción utilizando H_2, He y NH_3 para eliminar posibles interferencias.

En modo de celda de colisión/reacción, los iones que pasan a través de la celda pierden energía cinética debido a múltiples colisiones con las moléculas del gas, lo que resulta en una reducción de la sensibilidad. Con el fin de acelerar aquellos iones generados en la celda de colisión/reacción, algunos instrumentos incluyen un sistema de aceleración axial para aumentar la energía cinética de estos iones, mejorando el transporte desde la celda hasta el analizador de cuadrupolo [6]. Vidmar *et al.* [2] utilizaron esta opción para la determinación de zinc en diferentes productos alimentarios. Cuello-Nuñez *et al*. optimizaron el parámetro de la aceleración axial para el análisis de nanopartículas de TiO_2 [7]. Debido a esto, el parámetro de la aceleración axial ha sido estudiado en este trabajo junto con el flujo de los gases de H_2 y He o el porcentaje de NH_3.

En las Tabla A2.1.2 - Tabla A2.1.4 se muestran los resultados de las intensidades obtenidas para un blanco instrumental y la concentración equivalente de fondo (BEC). Cuanto menor sea esta concentración equivalente de fondo, mayor será la sensibilidad y menores las interferencias de matriz. En el caso del modo de H_2, se estudiaron dos valores de aceleración axial (0 y 1,5 V) y se observó que para flujos pequeños de H_2, las intensidades de ^{66}Zn en el blanco aumentaban ligeramente para una aceleración axial de 1,5 V, mientras que la concentración equivalente de fondo se mantenía constante; mientras que a flujos de H_2 por encima de 1,50 mL min^{-1}, la concentración equivalente de fondo aumentaba en mayor proporción que en el caso de la aceleración axial de 0 V, y por tanto, aumentaban los límites de detección. En el caso del modo de NH_3, se estudiaron los mismos valores de aceleración axial y en este caso se observó que, para un rango de valores de 5 - 17 % de NH_3 y 1 mL min^{-1} de He, conforme mayor era la proporción de NH_3, las interferencias espectrales se eliminaban más eficazmente debido a que la concentración equivalente de fondo disminuía, aunque la sensibilidad se deterioraba considerablemente cuando la aceleración axial era 0 V. Este comportamiento era similar al observado por Suárez-Oubiña *et al.*, quienes observaron este efecto a partir de 2,0 mL min^{-1} de NH_3 para el isótopo 64 del zinc [4]. Por el contrario, cuando la aceleración axial era 1,5 V, en el rango de 5 - 15 % de NH_3, la sensibilidad aumentaba considerablemente al aumentar la proporción de NH_3, mientras que la concentración equivalente de fondo era constante. Debido a que el amoníaco es un gas corrosivo, se utiliza un mezcla de NH_3 y He para evitar o minimizar los daños por corrosión en el instrumento. Por último, en el caso del modo de He, las mejores condiciones de intensidades y la menor

concentración equivalente de fondo se obtuvo para flujos de He de 2,0, 2,5 y 5 mL min^{-1}. Estas condiciones son comparables con las utilizadas por Kálomista *et al.*, quienes estudiaron las interferencias espectrales para el análisis de zinc y fijaron un flujo de He de 5 mL min^{-1} [1]; y con las utilizadas por Vidmar *et al.*, las cuales fueron 4 mL min^{-1} de He y una aceleración axial de 1 V [2].

Tabla A2.1.2. *Intensidades de ^{66}Zn obtenidas para un blanco y la concentración equivalente de fondo (BEC) en función del flujo de H_2 y de la aceleración axial para el modo de gas H_2. Tiempo de integración: 0,1 s.*

Flujo de gas H_2 mL min^{-1}	**Intensidad ^{66}Zn**			
	Aceleración axial: 0 V		**Aceleración axial: 1,5 V**	
	Blanco cps	**BEC µg L^{-1}**	**Blanco cps**	**BEC µg L^{-1}**
0,5	263	0,062	326	0,074
1,0	304	0,056	447	0,081
1,5	375	0,051	632	0,102
2,0	642	0,081	814	0,115
2,5	1193	0,144	1258	0,166
3,0	1495	0,184	1778	0,221
3,5	1437	0,158	2114	0,265
4,0	1294	0,140	2078	0,267
4,5	1317	0,173	1941	0,253
5,0	1167	0,182	1497	0,231

Tabla A2.1.3. *Intensidades de ^{66}Zn obtenidas para un blanco y la concentración equivalente de fondo (BEC) en función del porcentaje de NH_3 y de la aceleración axial para el modo de gas NH_3. Tiempo de integración: 0,1 s.*

Flujo de gas NH_3 mL min^{-1}	**Intensidad ^{66}Zn**			
	Aceleración axial: 0 V		**Aceleración axial: 1,5 V**	
	Blanco cps	**BEC µg L^{-1}**	**Blanco cps**	**BEC µg L^{-1}**
5,0	672	0,284	360	0,069
7,0	857	0,230	728	0,064
9,0	642	0,200	941	0,068
11,0	483	0,202	998	0,064
13,0	315	0,171	1007	0,061
15,0	191	0,145	1073	0,059
17,0	105	0,110	2672	0,189
19,0	75	0,115	2529	0,180
21,0	54	0,126	1979	0,155
23,0	61	0,196	1600	0,130

Tabla A2.1.4. *Intensidades de ^{66}Zn obtenidas para un blanco y la concentración equivalente de fondo (BEC) en función del flujo de He para el modo de gas He. Aceleración axial: 0 V. Tiempo de integración: 0,1 s.*

Flujo de gas He mL min^{-1}	**Intensidad ^{66}Zn**	
	Aceleración axial: 0 V	
	Blanco cps	**BEC µg L^{-1}**
0,5	584	0,157
1,0	716	0,153
1,5	765	0,139
2,0	774	0,132
2,5	680	0,124
3,0	628	0,134
3,5	533	0,141
4,0	428	0,147
4,5	298	0,139
5,0	170	0,110

Tras determinar las condiciones óptimas de cada uno de los modos de gases, éstas se compararon con el modo convencional sin gas para el isótopo 66 del zinc. En todos los modos de gases, la aceleración axial fue 1,5 V y los flujos de gases fueron 1 y 2 mL min^{-1} de H_2 y He, respectivamente, y 10% de NH_3 y 1 mL min^{-1} de He. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla A2.1.5 y se observa que las mejores condiciones de sensibilidad y la menor concentración equivalente de fondo se obtuvo en el modo convencional sin gas, excepto en el caso del modo de NH_3, donde se obtuvo la concentración equivalente de fondo más baja, pero a su vez, la sensibilidad disminuyó considerablemente. Suárez-Oubiña *et al.* estudiaron las interferencias de fósforo y calcio en la determinación de zinc en modo de análisis convencional y con gas de reacción NH_3 (*on-mass* y *mass-shift*). Los resultados mostraron que el modo *on-mass* era más adecuado que el modo *mass-shift* debido a la ineficiencia de formación de los productos Zn-amonio; al igual que tenía más sensibilidad que el modo convencional. Además, en el modo *on-mass* se obtuvieron límites de detección y de cuantificación menores que en los otros dos modos. En cualquier caso, los tres modos fueron adecuados para reducir las interferencias espectrales de Ca y P en un

rango de 0,05 - 50 mg L^{-1} en la determinación de ^{64}Zn [4]. En el presente estudio, el fósforo se encontraba en un rango de concentraciones de 40 - 220 mg L^{-1}, y el calcio de 0,1 - 0,3 mg L^{-1}. Por otro lado, Rujido-Santos *et al.*, estudiaron las interferencias de titanio y compararon las intensidades del Zn en modo convencional y en modo de reacción usando gas NH_3. Por un lado, en el modo de reacción determinaron que la intensidad del zinc era muy baja y había interferencias con el titanio incluso a concentraciones bajas, por lo que descartaron el uso del gas NH_3. Por otro lado, en la determinación del ^{66}Zn en modo convencional observaron que no se producían interferencias con el titanio hasta concentraciones muy altas de titanio (500 µg L^{-1}) [3]. En el presente estudio, el titanio se encontraba a concentraciones entre 5 - 25 µg L^{-1}.

Tabla A2.1.5. *Intensidades de ^{66}Zn obtenidas para un blanco y la concentración equivalente de fondo (BEC) en función del modo de análisis convencional o modo de celda de reacción/colisión. Tiempo de integración: 0,1 s.*

Modo de análisis	**Intensidad ^{66}Zn**	
	Blanco cps	**BEC µg L^{-1}**
Sin gas[a]	3979	0,119
Gas H_2[b]	2920	0,134
Gas He[c]	713	0,118
Gas NH_3[d]	157	0,073

[a] Aceleración axial: 0V

[b] Aceleración axial: 1,5 V / 1 mL min^{-1} H_2

[c] Aceleración axial: 1,5 V / 2 mL min^{-1} He

[d] Aceleración axial: 1,5 V / 10% NH_3 y 1 mL min^{-1} He

Adicionalmente, y como se ha comentado anteriormente, Suárez-Oubiña *et al.* demostraron que el uso de gases de reacción como el amoníaco produce un ensanchamiento de señales cuando se analizan nanopartículas de ZnO [8]. A la vista de los resultados y teniendo en cuenta esta dependencia de las señales, se decidió analizar las muestras de bacterias en las condiciones de modo convencional sin gas.

Bibliografía

[1] I. Kálomista, A. Kéri, G. Galbács, On the applicability and performance of the single particle ICP-MS nano-dispersion characterization method in cases complicated by spectral interferences, J Anal At Spectrom. 31 (2016) 1112–1122. https://doi.org/10.1039/C5JA00501A.

[2] J. Vidmar, L. Hässmann, K. Loeschner, Single-Particle ICP-MS as a Screening Technique for the Presence of Potential Inorganic Nanoparticles in Food, J Agric Food Chem. 69 (2021) 9979–9990. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07363.

[3] I. Rujido-Santos, P. Herbello-Hermelo, M.C. Barciela-Alonso, P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Piñeiro, spICP-MS assessment of ZnONPs and TiO2NPs in moisturisers after a tip sonication sample pre-treatment, Spectrochim Acta Part B At Spectrosc. 193 (2022) 106450. https://doi.org/10.1016/j.sab.2022.106450.

[4] C. Suárez-Oubiña, P. Herbello-Hermelo, P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Piñeiro, Exploiting dynamic reaction cell technology for removal of spectral interferences in the assessment of Ag, Cu, Ti, and Zn by inductively coupled plasma mass spectrometry, Spectrochim Acta Part B At Spectrosc. 187 (2022) 106330. https://doi.org/10.1016/j.sab.2021.106330.

[5] T.W. May, R.H. Wiedmeyer, A Table of Polyatomic Interferences in ICP-MS, At Spectrosc. 19 (1998) 150–155.

[6] F. Laborda, I. Abad-Álvaro, M.S. Jiménez, E. Bolea, Catching particles by atomic spectrometry: Benefits and limitations of single particle - inductively coupled plasma mass spectrometry, Spectrochim Acta Part B At Spectrosc. 199 (2023) 106570. https://doi.org/10.1016/j.sab.2022.106570.

[7] S. Cuello-Nuñez, I. Abad-Álvaro, D. Bartczak, M.E. Del Castillo Busto, D.A. Ramsay, F. Pellegrino, H. Goenaga-Infante, The accurate determination of number concentration of inorganic nanoparticles using spICP-MS with the dynamic mass flow approach, J Anal At Spectrom. 35 (2020) 1832–1839. https://doi.org/10.1039/c9ja00415g.

[8] C. Suárez-Oubiña, P. Herbello-Hermelo, P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Piñeiro, Single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry using ammonia reaction gas as a reliable and free-interference determination of metallic nanoparticles, Talanta. 242 (2022) 123286. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123286.

ANEXO 3. ESTUDIO DEL EFECTO BACTERICIDA DE LAS ESPECIES DE PLATA Y ANTIBIÓTICOS

A3.1. Optimización de la composición de los medios de cultivo

Para obtener el tamaño hidrodinámico de las nanopartículas mediante DLS, es necesario determinar, previamente, la densidad y la viscosidad de los diferentes medios de cultivo. Las densidades (ρ) de los medios de cultivo con y sin surfactantes fueron medidas a 25^{0}C con un densímetro de tubo vibrante Anton Paar DSA 5000. La incertidumbre estándar para la temperatura era 0,005 K y la incertidumbre de la densidad puede ser estimada en 10^{-4} g cm^{-3}.

Las viscosidades cinemáticas (ν) fueron determinadas a 25^{0}C usando un viscosímetro capilar de flujo Ubbelohde Schott Geräte y unidad automática de medida AVS-440 Schott Geräte. La temperatura se controló con un termostato CT52 Schott-Geräte. La incertidumbre estándar para la temperatura era 0,01 K y la incertidumbre de la viscosidad cinemática fue 0,005 mm^2 s^{-1}. Las densidades dinámicas, $\eta = \rho\nu$, se calcularon a partir de las viscosidades cinemáticas y de las densidades experimentales. La incertidumbre estimada de la viscosidad dinámica fue 0,005 mPa s.

En la Tabla A3.1.1 se recogen los valores experimentales y calculados de densidad, viscosidad cinemática y viscosidad dinámica obtenidos para cada uno de los medios de cultivo. En aquellos medios con determinadas concentraciones de surfactantes en los que no se midió la densidad y la viscosidad cinemática, la viscosidad dinámica se calculó por ajuste de una función polinomial de grado 3 a partir de las viscosidades dinámicas obtenidas para el conjunto del mismo medio y surfactante.

Tabla A3.1.1. *Propiedades fisicoquímicas experimentales y calculadas a una T=25^{0}C para mezclas de medios de cultivo y surfactantes a diferentes concentraciones.*

Medio de cultivo	ρ (g cm^{-3})	ν (mm^2 s^{-1})	η (mPa s)	Medio de cultivo	ρ (g cm^{-3})	ν (mm^2 s^{-1})	η (mPa s)
MH + Triton X-100				**MH + Tween 80**			
0%	1,0063	0,9578	0,9638	0%	1,0063	0,9578	0,9638
0,1%	1,0055	0,9636	0,9689	0,1%	1,0062	0,9750	0,9810
0,5%	1,0060	0,9953	1,0013	0,5%			1,0233
1%	1,0075	1,0162	1,0238	1%	1,0069	1,0344	1,0416
1,5%	1,0070	1,0344	1,0417	1,5%			1,0608
2%	1,0086	1,1218	1,1314	2%	1,0092	1,1125	1,1228
MH + SDS				**MH + CTAB**			
0%	1,0063	0,9578	0,9638	0%	1,0063	0,9578	0,9638
0,1%	1,0055	0,9717	0,9770	0,1%	1,0066	0,9766	0,9830
0,5%			1,0104	0,5%			1,0240
1%	1,0071	1,0156	1,0229	1%	1,0056	1,0209	1,0267
1,5%			1,0272	1,5%			1,0282
2%	1,0091	1,0388	1,0483	2%	1,0141	1,0684	1,0834
LB + Triton X-100				**LB + Tween 80**			
0%	1,0086	0,9434	0,9516	0%	1,0086	0,9434	0,9516
0,1%	1,0090	0,9796	0,9884	0,1%	1,0089	0,9834	0,9921
0,5%			1,0669	0,5%			1,0505
1%	1,0103	1,0690	1,0690	1%	1,0096	1,0557	1,0659
1,5%			1,1056	1,5%			1,0752
2%	1,0116	1,1184	1,1314	2%	1,0115	1,0714	1,0837
LB + SDS				**LB + CTAB**			
0%	1,0086	0,9434	0,9516	0%	1,0086	0,9434	0,9516
0,1%	1,0091	0,9674	0,9762	0,1%	1,0087	0,9766	0,9851
0,5%			1,0226	0,5%			0,9950
1%	1,0102	1,0148	1,0252	1%	1,0089	0,9963	1,0052
1,5%			1,0303	1,5%			1,0393
2%	1,0118	1,0241	1,0362	2%	1,0171	1,0735	1,0918
BHI + Triton X-100				**BHI + Tween 80**			
0%	1,0123	1,0124	1,0249	0%	1,0123	1,0124	1,0249
0,1%	1,0119	1,0332	1,0455	0,1%	1,0119	1,0347	1,0470
0,5%			1,0982	0,5%			1,0967
1%	1,0128	1,1091	1,1233	1%	1,0126	1,0932	1,1069
1,5%			1,1440	1,5%			1,1138
2%	1,0138	1,1869	1,2033	2%	1,0147	1,1587	1,1758
BHI + SDS				**BHI + CTAB**			
0%	1,0123	1,0124	1,0249	0%	1,0123	1,0124	1,0249
0,1%	1,0118	1,0259	1,0380	0,1%	1,0115	1,0384	1,0504
0,5%			1,0644	0,5%			1,0600
1%	1,0132	1,0516	1,0655	1%	1,0119	1,0507	1,0631
1,5%			1,0726	1,5%			1,0905
2%	1,0151	1,1142	1,1310	2%	1,0199	1,1182	1,1404

A3.2. Determinación de la concentración de plata total en las bacterias mediante digestión alcalina

Como paso previo a la determinación de la concentración de la plata total en las bacterias, se evaluó el método de digestión alcalina mediante unos ensayos en los que se determinaron las especies de plata resultantes tras la digestión por SP-ICP-MS.

En primer lugar, se realizó una adición de Ag(I) y de nanopartículas de plata estabilizadas con citrato de 60 nm y seguidamente, la digestión alcalina con TMAH, cisteína y Triton X-100. En la Figura A3.2.1 se muestran los barridos de tiempo obtenidos para el blanco de digestión y las muestras adicionadas.

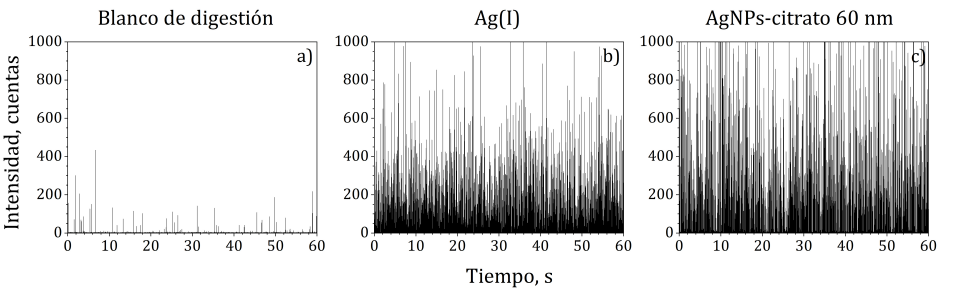


Figura A3.2.1. *Barridos de tiempo para las muestras digeridas con TMAH, cisteína y Triton X-100. a) Blanco de digestión, b) Adición de Ag(I), c) Adición de AgNPs-citrato de 60 nm.*

En el caso de la digestión con TMAH y $CaCl_2$, los barridos de tiempo obtenidos para el blanco de digestión y las muestras adicionadas con Ag(I) y de nanopartículas de plata estabilizadas con citrato de 60 nm se recogen en la Figura A3.2.2. La distribución de tamaño correspondiente con la muestra de nanopartículas adicionadas y digeridas, así como las mismas nanopartículas control suspendidas en el mismo medio de TMAH y $CaCl_2$ se observan en la Figura A3.2.3.

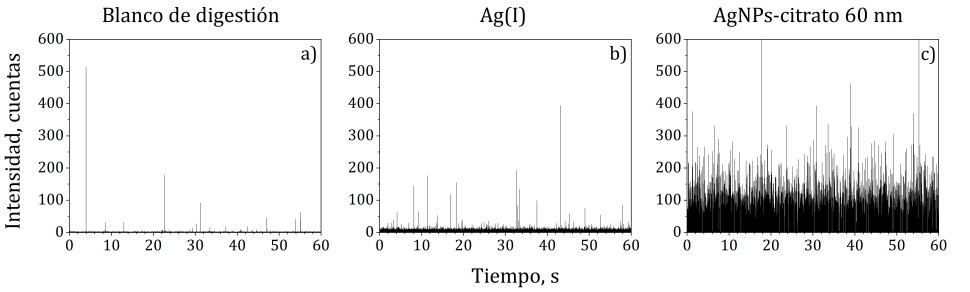


Figura A3.2.2. *Barridos de tiempo para las muestras digeridas con TMAH y $CaCl_2$. a) Blanco de digestión, b) Adición de Ag(I), c) Adición de AgNPs-citrato de 60 nm.*

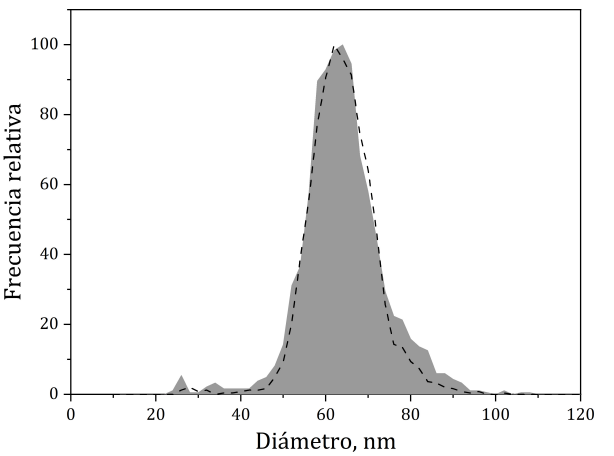


Figura A3.2.3. *Distribuciones de tamaño para la muestra de AgNPs-citrato de 60 nm adicionadas y digeridas con TMAH y $CaCl_2$ (área gris); y para las AgNPs-citrato de 60 nm control en medio de TMAH y $CaCl_2$ (línea discontinua).*

Por último, la Figura A3.2.4 recoge la distribución de tamaño correspondiente con la adición de nanopartículas de plata estabilizadas con citrato de 60 nm a bacterias control *E. coli* J62, así como la distribución de las mismas nanopartículas control suspendidas en el mismo medio de TMAH y $CaCl_2$.

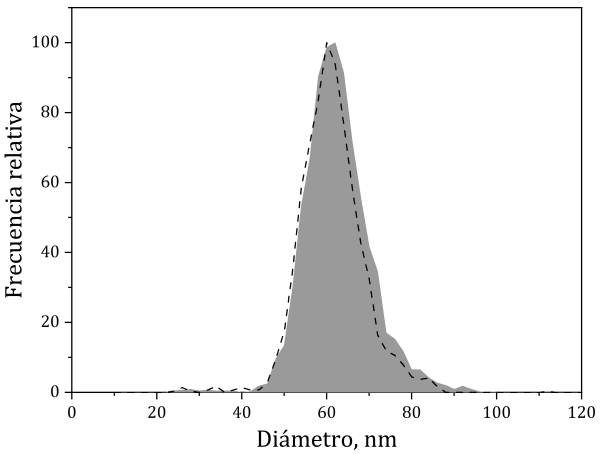


Figura A3.2.4. *Distribuciones de tamaño para la muestra de AgNPs-citrato de 60 nm adicionadas en bacterias* E. coli *J62 control y digeridas con TMAH y $CaCl_2$ (área gris); y para las AgNPs-citrato de 60 nm control en medio de TMAH y $CaCl_2$ (línea discontinua).*

A3.3. Evaluación de la actividad bactericida de las combinaciones antibiótico convencional - plata e identificación de efectos sinérgicos. Método de difusión.

Uno de los métodos para evaluar la actividad bactericida de las combinaciones antibiótico convencional – plata e identificar los efectos sinérgicos es el método de difusión. En este método se cargan los distintos antimicrobianos en una placa de Petri y se estudia la aparición de los halos de inhibición que se obtienen tras la incubación (Apartado 3.2.2.5.3).

En las siguientes figuras se muestran los resultados obtenidos para las distintas combinaciones de antimicrobianos estudiadas, donde se cuantifican los halos de inhibición obtenidos para cada situación.

La Figura A3.3.1 recoge los resultados de los halos de inhibición obtenidos para la combinación de penicilina G + nanopartículas de plata frente a las bacterias *E. coli* y *P. aeruginosa*.

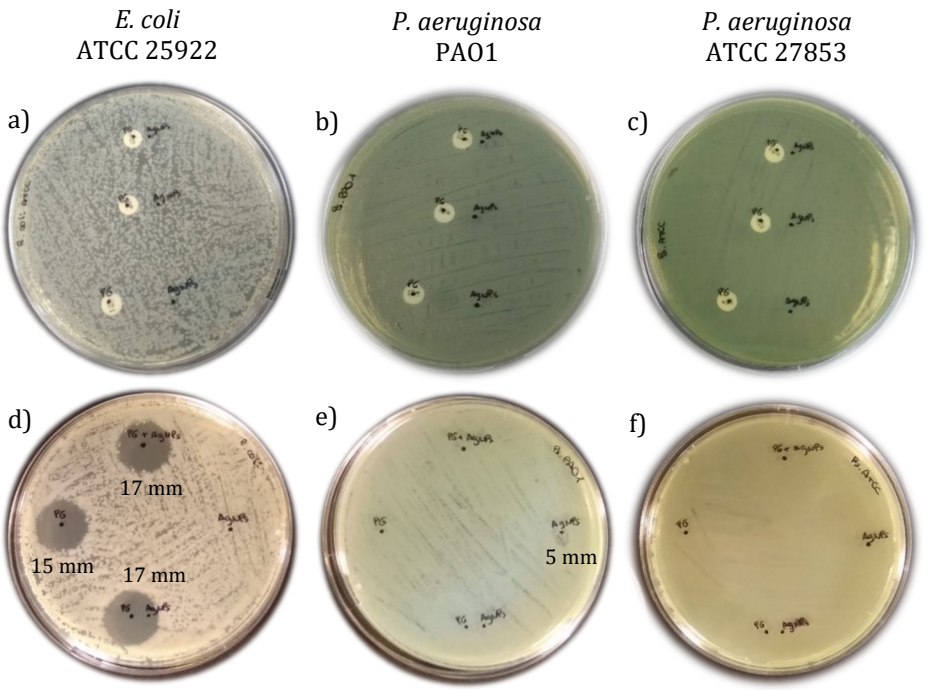


Figura A3.3.1. *Placas Petri con los halos de inhibición para la combinación de penicilina G + AgNPs frente a las bacterias a) y d)* E. coli *ATCC 25922, b) y e)* P. aeruginosa *PAO1 y c) y f) P. aeruginosa ATCC 27853. Placas con esquema 1: a, b y c. Placas con esquema 2: d, e y f.*

En la Figura A3.3.2 se recogen los resultados de los halos de inhibición obtenidos para la combinación de apramicina + nanopartículas de plata frente a las bacterias *E. coli* y *P. aeruginosa*. Las flechas rojas muestran la deformación de los halos que demuestran la presencia de efectos sinérgicos.

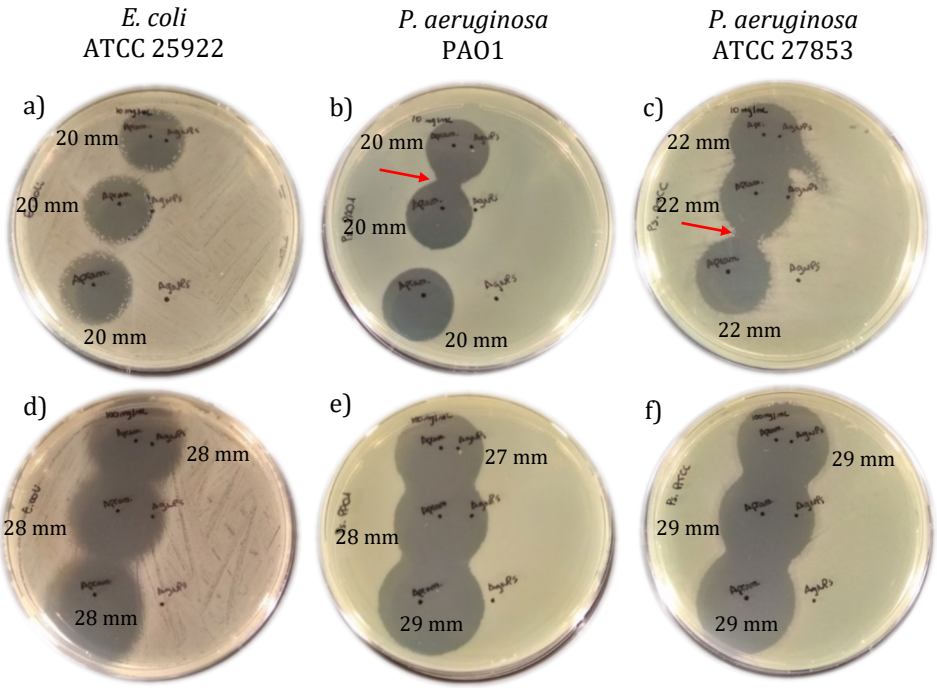


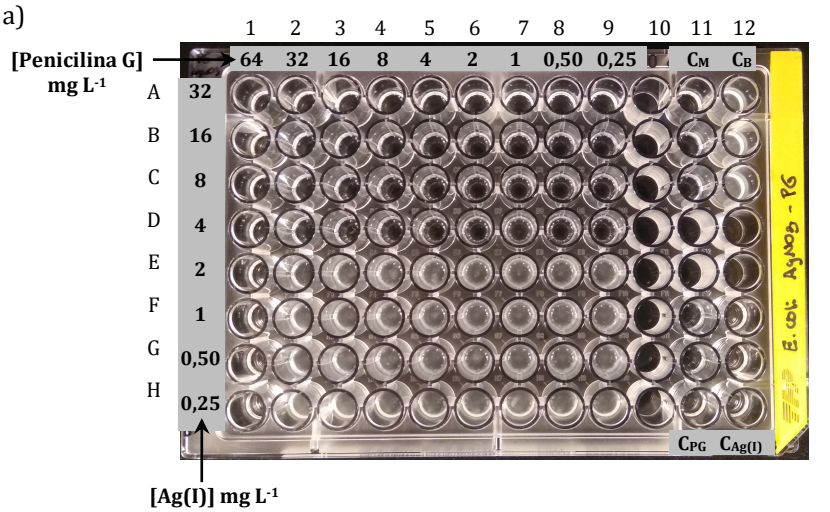
Figura A3.3.2. *Placas Petri (esquema 1) con los halos de inhibición para la combinación de apramicina + nanopartículas de plata frente a las bacterias a) y d)* E. coli *ATCC 25922, b) y e)* P. aeruginosa *PAO1 y c) y f)* P. aeruginosa *ATCC 27853. Concentración de 10 g* L^{-1} *de apramicina: a, b y c. Concentración de 100 g* L^{-1} *de apramicina: d, e y f. Flechas rojas: presencia de sinergias.*

A3.4. Evaluación de la actividad bactericida de las combinaciones antibiótico convencional - plata e identificación de efectos sinérgicos. Método del tablero.

Otro de los métodos para evaluar la actividad bactericida de las combinaciones antibiótico convencional – plata e identificar los efectos sinérgicos es el método del tablero. En este método se combinan múltiples diluciones de los antimicrobianos en concentraciones superiores o inferiores a la CIM de cada uno de ellos frente al microorganismo a estudiar y se estudia la ausencia o presencia de turbidez o de crecimiento del microorganismo (Apartado 3.2.2.5.3).

En la Figura A3.4.1 se muestran dos ejemplos del resultado de las placas utilizadas en la evaluación de la actividad bactericida de las combinaciones de antimicrobianos mediante el método del tablero, así como la nomenclatura de los pocillos (A - H y 1 - 9) utilizada en las Tabla A3.4.4 - Tabla A3.4.27. En el primer ejemplo se representa la combinación penicilina G + Ag(I) frente a bacterias *E. coli*. En el eje X se colocaron concentraciones decrecientes de penicilina G y en el eje Y, concentraciones de Ag(I). En el segundo ejemplo se representa la combinación apramicina + AgNPs frente a bacterias *P. aeruginosa* PAO1. En el eje X se colocaron concentraciones decrecientes de apramicina y en el eje Y, concentraciones de nanopartículas de plata.

a)



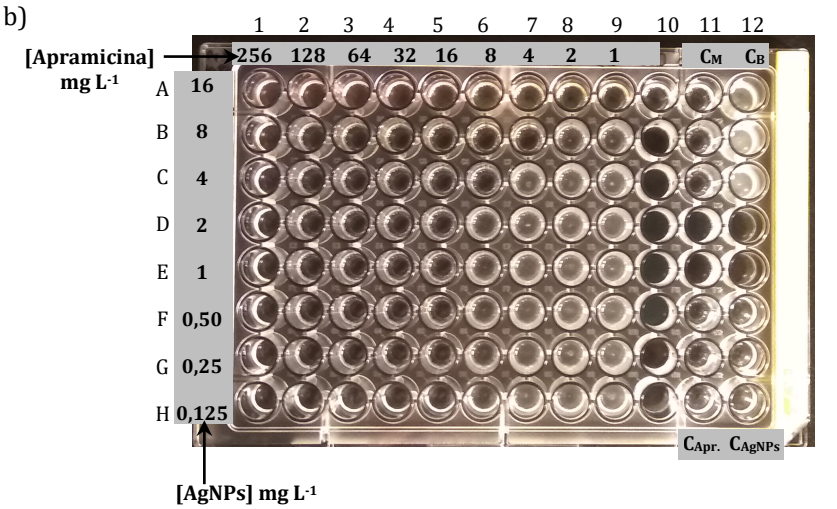


Figura A3.4.1. *Placa para la evaluación de la actividad bactericida combinada de a) penicilina G y Ag(I) frente a* E. coli *y b) apramicina y AgNPs frente a* P. aeruginosa *PAO1.*

Estudio de los efectos bacteriostáticos: determinación de la CIF y el índice CIF

Se calcularon las concentraciones inhibitorias fraccionales (CIF) y el índice CIF para estudiar los efectos bacteriostáticos de las combinaciones de antimicrobianos, mediante las ecuaciones (37), (38) y (39) (Apartado 3.2.2.5.3). Los cálculos y la interpretación del índice CIF, asociados a cada combinación, se recogen en la Tabla A3.4.4 - Tabla A3.4.14 de este anexo. Solamente se estudiaron los efectos bacteriostáticos de aquellos pocillos cuyas concentraciones de antimicrobianos eran menores que la CIM de los antimicrobianos individuales, debido a que, por encima de la CIM los efectos bacteriostáticos son debidos a la acción del antimicrobiano individual, sin importar la concentración añadida del otro antimicrobiano en la combinación.

En primer lugar, se evaluaron los efectos bacteriostáticos de las combinaciones de antimicrobianos para la cepa *E. coli* ATCC 25922. En la Tabla A3.4.1 se recogen los resultados de estos efectos para cada combinación estudiada. Primero, se determinó la actividad bacteriostática de las combinaciones en función de la presencia o ausencia de turbidez en los pocillos. Aquellos pocillos con ausencia de turbidez y por tanto, sin crecimiento bacteriano visible, se muestran en las siguientes tablas con la celda en gris oscuro, mientras que las celdas en blanco corresponden a la presencia de crecimiento bacteriano y por tanto, esas combinaciones no presentan efectos bacteriostáticos.

Tabla A3.4.1. *Efectos bacteriostáticos de las combinaciones de antimicrobianos frente a* E. coli *ATCC 25922: a) penicilina G + Ag(I); b) penicilina G + AgNPs; c) apramicina + Ag(I); d) apramicina + AgNPs. Ausencia de turbidez: gris. Turbidez: blanco. Efectos sinérgicos: gris + S. Efectos indiferentes: gris + I.*

a)

	Concentración de Ag(I), mg L^{-1}	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		Concentración de penicilina G, mg L^{-1}								
		64	32	16	8	4	2	1	0,50	0,25
A	32									
B	16									
C	8									
D	4		I	I	I	I	I		I	I
E	2									
F	1									
G	0,50									
H	0,25									

b)

	Concentración de AgNPs, mg L^{-1}	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		Concentración de penicilina G, mg L^{-1}								
		64	32	16	8	4	2	1	0,50	0,25
A	16									
B	8		I							
C	4									
D	2									
E	1									
F	0,50									
G	0,25									
H	0,125									

c)

	Concentración de Ag(I), mg L^{-1}	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		Concentración de apramicina, mg L^{-1}								
		64	32	16	8	4	2	1	0,50	0,25
A	32									
B	16									
C	8									
D	4				I	I	I		I	
E	2				I	S	S			
F	1				I	S				
G	0,50				I	S				
H	0,25				I					

d)

	Concentración de AgNPs, mg L^{-1}	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		Concentración de apramicina, mg L^{-1}								
		64	32	16	8	4	2	1	0,50	0,25
A	16									
B	8				I	I	I			
C	4				I	S				
D	2				I	S				
E	1				I	S				
F	0,50				I					
G	0,25				I					
H	0,125				I	S				

En el caso de la combinación penicilina G + Ag(I) (Tabla A3.4.1.a) se observó que en combinaciones con concentraciones iguales o mayores de la CIM de la penicilina (64 mg L^{-1}) y de la CIM de Ag(I) (8 mg L^{-1}) no hubo crecimiento bacteriano, debido al efecto individual de cada uno de los antimicrobianos. Por otro lado, en los pocillos D2 - D6 y D8 - D9, también se observó ausencia de turbidez y en este caso, debido a que las concentraciones de los antimicrobianos eran menores de las CIM individuales de cada uno de ellos, los efectos bacteriostáticos se deben a la acción combinada de ambos antimicrobianos. Las combinaciones de estos pocillos al tener una concentración de Ag(I) sólo una dilución menor que la CIM, presentaron efectos bacteriostáticos indiferentes. En el resto de los pocillos se observó una gran turbidez

en todos ellos, excepto en los pocillos D7 y E2 donde se observó una ligera turbidez, lo que indicaba que las combinaciones presentaban ciertos efectos bacteriostáticos.

En el caso de la combinación penicilina G + nanopartículas de plata (Tabla A3.4.1b) se observó ausencia de turbidez para las combinaciones con concentraciones iguales a la CIM de la penicilina G (64 mg L^{-1}) y de las nanopartículas de plata (16 mg L^{-1}), como consecuencia del efecto bacteriostático de los antimicrobianos individuales. Además, tampoco se observó crecimiento a simple vista en la combinación del pocillo B2, la cual tenía unas concentraciones una dilución menor de la CIM de ambos antimicrobianos. Debido a esto, el efecto bacteriostático de esta combinación era indiferente.

En el caso de la combinación apramicina + Ag(I) (Tabla A3.4.1.c) se obtuvo que en combinaciones con concentraciones iguales o mayores de la CIM de la apramicina (16 mg L^{-1}) y de la CIM de Ag(I) (8 mg L^{-1}) había ausencia de turbidez, lo que concordaba con los resultados de la CIM individuales. Los pocillos de las combinaciones con concentraciones de una dilución menor de las CIM individuales (D4 - D6, D8 y E4 - H4) presentaron ausencia de turbidez y efectos bacteriostáticos indiferentes. Adicionalmente, se observaron combinaciones con concentraciones de más de una dilución menor que las CIM individuales (E5, E6, F5 y G5). Estas combinaciones presentaron efectos bacteriostáticos debido a la sinergia surgida por la acción combinada de ambos antimicrobianos. Con esto se demostró que, disminuyendo hasta 16 veces la concentración de Ag(I) (de 8 a 0,50 mg L^{-1}), y 8 veces la concentración de apramicina (de 16 a 2 mg L^{-1}) se obtenían los mismos efectos bacteriostáticos que utilizando uno de los antimicrobianos individualmente a la concentración de la CIM.

En el caso de la combinación apramicina + nanopartículas de plata (Tabla A3.4.1.d) se observó ausencia de turbidez en las combinaciones con concentraciones iguales o mayores de las CIM de la apramicina (16 mg L^{-1}) y de la CIM de las AgNPs (16 mg L^{-1}). Aquellas con concentraciones de una dilución menor que las CIM de cada antimicrobiano (pocillos B4 - B6 y C4 - H4) presentaron efectos bacteriostáticos indiferentes. Las combinaciones con concentraciones de más de una dilución menor que la CIM de los antimicrobianos (pocillos C5 - E5 y H5) presentaron ausencia de turbidez debido a los efectos bacteriostáticos sinérgicos como consecuencia de la combinación de ambos antimicrobianos. En este caso también se demostró una disminución significativa de las concentraciones de los antimicrobianos en combinación frente a la actividad bacteriostática que presentan individualmente.

Por tanto, se concluyó que las combinaciones de penicilina G con materiales de plata no presentaron efectos bacteriostáticos sinérgicos frente a *E. coli* ATCC 25922;

mientras que las combinaciones de apramicina con Ag(I) y nanopartículas de plata sí que presentaron efectos sinérgicos frente a las mismas bacterias, permitiendo reducir las concentraciones de apramicina hasta 8 veces (de 16 a 2 mg L^{-1}) y las de Ag(I) y nanopartículas de plata hasta 16 veces (de 8 a 0,50 mg L^{-1} y de 16 a 1 mg L^{-1}, respectivamente).

En la Tabla A3.4.2 se recogen los resultados de los efectos bacteriostáticos de las cuatro combinaciones de antimicrobianos frente a la cepa *P. aeruginosa* PAO1.

Tabla A3.4.2. *Efectos bacteriostáticos de las combinaciones de antimicrobianos frente a* P. aeruginosa *PAO1: a) penicilina G + Ag(I); b) penicilina G + AgNPs; c) apramicina + Ag(I); d) apramicina + AgNPs. Ausencia de turbidez: gris. Turbidez: blanco. Efectos sinérgicos: gris + S. Efectos indiferentes: gris + I.*

a)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
		Concentración de penicilina G, mg L^{-1}								
		64	32	16	8	4	2	1	0,50	0,25
A	32									
B	16									
C	8									
D	4	I	I	I	I	I	I	I		I
E	2									
F	1									
G	0,50									
H	0,25									

Concentración de Ag(I), mg L^{-1}

b)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
		Concentración de penicilina G, mg L^{-1}								
		64	32	16	8	4	2	1	0,50	0,25
A	16									
B	8	I	I	I	I	I	I	I	I	I
C	4	I	I	S	S	S	S	S	S	S
D	2									
E	1									
F	0,50									
G	0,25									
H	0,125									

Concentración de AgNPs, mg L^{-1}

c)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
		Concentración de apramicina, mg L^{-1}								
		256	128	64	32	16	8	4	2	1
A	32									
B	16									
C	8									
D	4						I	I	I	I
E	2						I	S	S	S
F	1						I	S		
G	0,50						I	S		
H	0,25						I			

Concentración de Ag(I), mg L^{-1}

d)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
		Concentración de apramicina, mg L^{-1}								
		256	128	64	32	16	8	4	2	1
A	16									
B	8						I	I		
C	4						I	S		
D	2									
E	1									
F	0,50									
G	0,25									
H	0,125									

Concentración de AgNPs, mg L^{-1}

En el caso de la combinación penicilina G + Ag(I) (Tabla A3.4.2.a) se observó que en combinaciones con concentraciones iguales o mayores de la CIM de la Ag(I) (8 mg L^{-1}) no hubo crecimiento bacteriano visible debido al efecto individual de la Ag(I). En los pocillos de las combinaciones con concentraciones de una dilución menor que la CIM de Ag(I) (D1 - D7 y D9) también se observó ausencia de turbidez. Esto se debió a la adición de los efectos bacteriostáticos individuales de cada antimicrobiano, aunque los efectos se clasificaron como indiferentes. En el resto de los pocillos se observó una gran turbidez en todos ellos, al igual que en el control positivo de bacterias, lo que indicaba que esas combinaciones no presentaban ningún efecto bacteriostático. Para el cálculo de la CIF de la penicilina se consideró una CIM de la penicilina de 64 mg L^{-1}, aunque el valor real sea mayor de 64 mg L^{-1}.

En el caso de la combinación penicilina G + nanopartículas de plata (Tabla A3.4.2.b) se observó ausencia de turbidez para las combinaciones con concentraciones iguales a la CIM de las nanopartículas de plata (16 mg L^{-1}), como consecuencia del efecto bacteriostático de estos nanomateriales. Además, tampoco se observó turbidez en las combinaciones con concentraciones una dilución menor de la CIM de ambos antimicrobianos, considerando que la CIM de la penicilina tiene un valor de 64 mg L^{-1}, aunque el valor real sea mayor. Debido a esto, el efecto bacteriostático de estas combinaciones (B1 - B9 y C1 - C2) era indiferente. A diferencia de las bacterias *E. coli*, se observaron combinaciones con concentraciones de más de una dilución menor que las CIM de los antimicrobianos individuales (C3 - C9), lo que permitió identificar estos efectos bacteriostáticos como sinérgicos, debido a la acción combinada de ambos antimicrobianos. En este caso se consiguió disminuir la concentración de nanopartículas hasta 4 veces (de 16 a 4 mg L^{-1}) y hasta 256 veces la de penicilina G (de 64 a 0,25 mg L^{-1}). En el resto de los pocillos se observó una gran turbidez, sin diferencias con el control de bacterias, excepto en el pocillo D1 en el que se observó una disminución de la turbidez, indicando que a esa concentración había cierto efecto bacteriostático.

En el caso de la combinación apramicina + Ag(I) (Tabla A3.4.2.c) se obtuvo que la mayoría de las combinaciones presentaron ausencia de turbidez, entre ellas aquellas con concentraciones iguales o mayores de la CIM de apramicina (16 mg L^{-1}) y de la CIM de Ag(I) (8 mg L^{-1}), lo que concordaba con los resultados de las CIM individuales. En los pocillos de las combinaciones con concentraciones de una dilución menor de las CIM individuales (D6 - D9 y E6 - H6) tampoco se observó turbidez y presentaron efectos bacteriostáticos indiferentes. Para algunas combinaciones con concentraciones de más de una dilución menor que las CIM individuales (E7 - E9 y F7 - G7) se observó una ausencia de turbidez y los efectos bacteriostáticos fueron sinérgicos. En los pocillos que presentaban turbidez se

observó una disminución de la turbidez en comparación con el control de bacterias. Por tanto, en este ensayo se produjo una disminución significativa de las concentraciones necesarias para producir un efecto bacteriostático al combinar ambos antimicrobianos, de hasta 16 veces la concentración de apramicina y de Ag(I) (de 16 a 1 mg L^{-1} y de 8 a 0,50 mg L^{-1}, respectivamente)

En el caso de la combinación apramicina + nanopartículas de plata (Tabla A3.4.2.d) se observó ausencia de turbidez en aquellas con concentraciones iguales o mayores de las CIM de la apramicina (16 mg L^{-1}) y de las AgNPs (16 mg L^{-1}). Aquellas con concentraciones de una dilución menor que las CIM de cada antimicrobiano (B6 - B7 y C6) presentaron efectos bacteriostáticos indiferentes. Solamente una combinación con concentraciones de más de una dilución menor que la CIM de los antimicrobianos (C7) presentó ausencia de turbidez debido a los efectos bacteriostáticos sinérgicos. En este caso también se demostró una disminución de 4 veces de la concentración de apramicina y de nanopartículas de plata (de 16 a 4 mg L^{-1}). En los pocillos en los que había turbidez se observó una ligera disminución respecto al control de bacterias, lo que indicaba la aparición de ciertos efectos bacteriostáticos.

Por tanto, se concluyó que la combinación de penicilina G con Ag(I) no presentó efectos bacteriostáticos sinérgicos frente a *P. aeruginosa* PAO1; mientras que las combinaciones de penicilina G y apramicina con nanopartículas de plata y de apramicina con Ag(I) presentaron efectos sinérgicos frente a las mismas bacterias, permitiendo reducir las concentraciones de apramicina hasta 4 y 16, la de Ag(I) hasta 16 veces y la de nanopartículas de plata hasta 4 veces.

En la Tabla A3.4.3 se recogen los resultados de los efectos bacteriostáticos de las cuatro combinaciones de antimicrobianos frente a la cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Tabla A3.4.3. *Efectos bacteriostáticos de las combinaciones de antimicrobianos frente a* P. aeruginosa *ATCC 27853: a) penicilina G + Ag(I); b) penicilina G + AgNPs; c) apramicina + Ag(I); d) apramicina + AgNPs. Ausencia de turbidez: gris. Turbidez: blanco. Efectos sinérgicos: gris + S. Efectos indiferentes: gris + I.*

a)

	Concentración de Ag(I), mg L^{-1}	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		Concentración de penicilina G, mg L^{-1}								
		64	32	16	8	4	2	1	0,50	0,25
A	32									
B	16									
C	8									
D	4			I			I	I		
E	2									
F	1									
G	0,50									
H	0,25									

b)

	Concentración de AgNPs, mg L^{-1}	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		Concentración de penicilina G, mg L^{-1}								
		64	32	16	8	4	2	1	0,50	0,25
A	16									
B	8									
C	4									
D	2									
E	1									
F	0,50									
G	0,25									
H	0,125									

c)

	Concentración de Ag(I), mg L^{-1}	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		Concentración de apramicina, mg L^{-1}								
		256	128	64	32	16	8	4	2	1
A	32									
B	16									
C	8									
D	4						I	I	I	I
E	2						I	S	S	S
F	1						I	S	S	S
G	0,50						I	S	S	S
H	0,25						I	S	S	S

d)

	Concentración de AgNPs, mg L^{-1}	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		Concentración de apramicina, mg L^{-1}								
		256	128	64	32	16	8	4	2	1
A	16									
B	8						I	I	I	I
C	4						I	S	S	S
D	2						I	S	S	S
E	1						I	S	S	S
F	0,50						I	S	S	
G	0,25						I	S	S	
H	0,125						I	S	S	

En el caso de la combinación penicilina G + Ag(I) (Tabla A3.4.3.a) se observó que en combinaciones con concentraciones iguales o mayores de la CIM de la Ag(I) (8 mg L^{-1}) no hubo turbidez debido al efecto individual del Ag(I). En ciertas combinaciones con concentraciones de una dilución menor que la CIM de Ag(I) tampoco se observó turbidez y los efectos bacteriostáticos fueron indiferentes. El resto de las combinaciones estudiadas presentaron una turbidez similar al control de bacterias. En este caso también se consideró para los cálculos una CIM de la penicilina de 64 mg L^{-1}, aunque el valor real sea mayor de 64 mg L^{-1}.

En el caso de la combinación penicilina G + nanopartículas de plata (Tabla A3.4.3.b) solamente se observó ausencia de turbidez en las combinaciones con una

concentración igual a la CIM de las nanopartículas (16 mg L^{-1}). En el resto de las combinaciones se observó una gran turbidez, por lo que se determinó que ninguna de ellas presentaba efectos bacteriostáticos.

En el caso de la combinación apramicina + Ag(I) (Tabla A3.4.3.c) se obtuvo que todas las combinaciones presentaron ausencia de turbidez, lo que indicaba que todas presentaban efectos bacteriostáticos y permitía reducir significativamente las concentraciones necesarias para producir un efecto bacteriostático similar al de los antimicrobianos individualmente a concentraciones de la CIM. Los pocillos de las combinaciones con concentraciones de una dilución menor de las CIM individuales (D6 - D9 y E6 - H6) presentaron efectos bacteriostáticos indiferentes; mientras que las combinaciones con concentraciones de más de una dilución menor que las CIM individuales (E7 - E9, F7 - F9, G7 - G9 y H7 - H9) presentaron efectos bacteriostáticos sinérgicos. Por lo tanto, en este ensayo se produjo una disminución de hasta 16 veces la concentración de apramicina (de 16 a 1 mg L^{-1}) y de hasta 32 veces la de Ag(I) (de 8 a 0,25 mg L^{-1})

En el caso de la combinación apramicina + nanopartículas de plata (Tabla A3.4.3.d) se observó ausencia de turbidez en casi todas las combinaciones estudiadas. Aquellas con concentraciones iguales o mayores de las CIM de la apramicina (16 mg L^{-1}) y de la CIM de las AgNPs (16 mg L^{-1}) presentaron efectos debidos a la actividad individual de los antimicrobianos. Aquellas con concentraciones de una dilución menor que las CIM de cada antimicrobiano (B6-B9 y C6-H6) presentaron efectos bacteriostáticos indiferentes. En el caso de las combinaciones con concentraciones de más de una dilución menor que la CIM de los antimicrobianos (C7 - C9, D7 - D9, E7 - E9, F7 - F8, G7 - G8 y H7 - H8) presentaron ausencia de turbidez debido a los efectos bacteriostáticos sinérgicos. En este caso también se demostró una disminución de 16 veces de la concentración de apramicina (de 16 a 1 mg L^{-1}), así como una disminución muy significativa de las nanopartículas de plata.

Por tanto, se concluyó que las combinaciones de penicilina G con Ag(I) y nanopartículas de plata no presentaron efectos bacteriostáticos sinérgicos frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853; mientras que las combinaciones de apramicina con Ag(I) y nanopartículas de plata presentaron efectos sinérgicos frente a las mismas bacterias, permitiendo reducir la concentración de apramicina hasta 16 veces, la de Ag(I) hasta 32 veces y la de nanopartículas de plata hasta 128 veces.

En las siguientes tablas (Tabla A3.4.4 - Tabla A3.4.14) se recogen los resultados obtenidos para las distintas combinaciones de antimicrobianos estudiadas donde se muestran las concentraciones inhibitorias fraccionales (CIF) de cada antimicrobiano, así como el índice CIF (ΣCIF) y la interpretación de este índice.

Tabla A3.4.4. *Concentraciones inhibitorias fraccionales (CIF) de la penicilina G (PG) y Ag(I), índices CIF (ΣCIF) y sus interpretaciones para cada una de las combinaciones de penicilina G + Ag(I) frente a* E. coli *ATCC 25922.*

Pocillo	[PG] mg L^{-1}	CIF_{PG}	[Ag(I)] mg L^{-1}	$CIF_{Ag(I)}$	ΣCIF	Interpretación
D2	32	0,50	4	0,50	1	Indiferencia
D3	16	0,25	4	0,50	0,75	Indiferencia
D4	8	0,125	4	0,50	0,63	Indiferencia
D5	4	0,063	4	0,50	0,56	Indiferencia
D6	2	0,031	4	0,50	0,53	Indiferencia
D8	0,5	0,008	4	0,50	0,51	Indiferencia
D9	0,25	0,004	4	0,50	0,50	Indiferencia

Tabla A3.4.5. *Concentraciones inhibitorias fraccionales (CIF) de la penicilina G (PG) y AgNPs, índices CIF (ΣCIF) y sus interpretaciones para cada una de las combinaciones de penicilina G + AgNPs frente a* E. coli *ATCC 25922.*

Pocillo	[PG] mg L^{-1}	CIF_{PG}	[AgNPs] mg L^{-1}	CIF_{AgNPs}	ΣCIF	Interpretación
B2	32	0,50	8	0,50	1	Indiferencia

Tabla A3.4.6. *Concentraciones inhibitorias fraccionales (CIF) de la apramicina y Ag(I), índices CIF (ΣCIF) y sus interpretaciones para cada una de las combinaciones de apramicina + Ag(I) frente a* E. coli *ATCC 25922.*

Pocillo	[Apram.] mg L^{-1}	CIF_{Apr}	[Ag(I)] mg L^{-1}	$CIF_{Ag(I)}$	ΣCIF	Interpretación
D4	8	0,50	4	0,50	1	Indiferencia
D5	4	0,25	4	0,50	0,75	Indiferencia
D6	2	0,125	4	0,50	0,63	Indiferencia

D8	0,50	0,031	4	0,50	0,53	Indiferencia
E4	8	0,50	2	0,25	0,75	Indiferencia
E5	4	0,25	2	0,25	0,50	Sinergia
E6	2	0,125	2	0,25	0,38	Sinergia
F4	8	0,50	1	0,125	0,63	Indiferencia
F5	4	0,25	1	0,125	0,38	Sinergia
G4	8	0,50	0,50	0,063	0,56	Indiferencia
G5	4	0,25	0,50	0,063	0,31	Sinergia
H4	8	0,50	0,25	0,031	0,53	Indiferencia

Tabla A3.4.7. *Concentraciones inhibitorias fraccionales (CIF) de la apramicina y AgNPs, índices CIF (ΣCIF) y sus interpretaciones para cada una de las combinaciones de apramicina + AgNPs frente a* E. coli *ATCC 25922.*

Pocillo	**[Apram.] mg L^{-1}**	**CIF_{Apr}**	**[AgNPs] mg L^{-1}**	**CIF_{AgNPs}**	**ΣCIF**	**Interpretación**
B4	8	0,50	8	0,50	1	Indiferencia
B5	4	0,25	8	0,50	0,75	Indiferencia
B6	2	0,125	8	0,50	0,63	Indiferencia
C4	8	0,50	4	0,25	0,75	Indiferencia
C5	4	0,25	4	0,25	0,50	Sinergia
D4	8	0,50	2	0,125	0,63	Indiferencia
D5	4	0,25	2	0,125	0,38	Sinergia
E4	8	0,50	1	0,063	0,56	Indiferencia
E5	4	0,25	1	0,063	0,31	Sinergia
F4	8	0,50	0,50	0,031	0,53	Indiferencia
G4	8	0,50	0,25	0,016	0,52	Indiferencia
H4	8	0,50	0,125	0,008	0,51	Indiferencia
H5	4	0,25	0,125	0,008	0,26	Sinergia

Tabla A3.4.8. *Concentraciones inhibitorias fraccionales (CIF) de la penicilina G (PG) y Ag(I), índices CIF (ΣCIF) y sus interpretaciones para cada una de las combinaciones de penicilina G + Ag(I) frente a* P. aeruginosa *PAO1.*

Pocillo	[PG] mg L^{-1}	CIF_{PG}	[Ag(I)] mg L^{-1}	$CIF_{Ag(I)}$	ΣCIF	Interpretación
D1	64	1,0	4	0,50	1,5	Indiferencia
D2	32	0,50	4	0,50	1	Indiferencia
D3	16	0,25	4	0,50	0,75	Indiferencia
D4	8	0,125	4	0,50	0,63	Indiferencia
D5	4	0,063	4	0,50	0,56	Indiferencia
D6	2	0,031	5	0,63	0,66	Indiferencia
D7	1	0,016	4	0,50	0,52	Indiferencia
D9	0,25	0,004	4	0,50	0,504	Indiferencia

Tabla A3.4.9. *Concentraciones inhibitorias fraccionales (CIF) de la penicilina G (PG) y AgNPs, índices CIF (ΣCIF) y sus interpretaciones para cada una de las combinaciones de penicilina G + AgNPs frente a* P. aeruginosa *PAO1.*

Pocillo	[PG] mg L^{-1}	CIF_{PG}	[AgNPs] mg L^{-1}	CIF_{AgNPs}	ΣCIF	Interpretación
B1	64	1	8	0,50	1,5	Indiferencia
B2	32	0,50	8	0,50	1	Indiferencia
B3	16	0,25	8	0,50	0,75	Indiferencia
B4	8	0,125	8	0,50	0,63	Indiferencia
B5	4	0,063	8	0,50	0,56	Indiferencia
B6	2	0,031	8	0,50	0,53	Indiferencia
B7	1	0,016	8	0,50	0,52	Indiferencia
B8	0,50	0,008	8	0,50	0,51	Indiferencia
B9	0,25	0,004	8	0,50	0,504	Indiferencia
C1	64	1	4	0,25	1,25	Indiferencia
C2	32	0,50	4	0,25	0,75	Indiferencia
C3	16	0,25	4	0,25	0,50	Sinergia
C4	8	0,125	4	0,25	0,38	Sinergia
C5	4	0,063	4	0,25	0,31	Sinergia
C6	2	0,031	4	0,25	0,28	Sinergia

C7	1	0,016	4	0,25	0,27	Sinergia
C8	0,50	0,008	4	0,25	0,26	Sinergia
C9	0,25	0,004	4	0,25	0,25	Sinergia

Tabla A3.4.10. *Concentraciones inhibitorias fraccionales (CIF) de la apramicina y Ag(I), índices CIF (ΣCIF) y sus interpretaciones para cada una de las combinaciones de apramicina + Ag(I) frente a* P. aeruginosa *PAO1.*

Pocillo	**[Apram.] mg L^{-1}**	**CIF_{Apr}**	**[Ag(I)] mg L^{-1}**	**$CIF_{Ag(I)}$**	**ΣCIF**	**Interpretación**
D6	8	0,50	4	0,50	1	Indiferencia
D7	4	0,25	4	0,50	0,75	Indiferencia
D8	2	0,125	4	0,50	0,63	Indiferencia
D9	1	0,063	4	0,50	0,56	Indiferencia
E6	8	0,50	2	0,25	0,75	Indiferencia
E7	4	0,25	2	0,25	0,50	Sinergia
E8	2	0,125	2	0,25	0,38	Sinergia
E9	1	0,063	2	0,25	0,31	Sinergia
F6	8	0,50	1	0,125	0,63	Indiferencia
F7	4	0,25	1	0,125	0,38	Sinergia
G6	8	0,50	0,50	0,063	0,56	Indiferencia
G7	4	0,25	0,50	0,063	0,31	Sinergia
H6	8	0,50	0,25	0,031	0,53	Indiferencia

Tabla A3.4.11. *Concentraciones inhibitorias fraccionales (CIF) de la apramicina y AgNPs, índices CIF (ΣCIF) y sus interpretaciones para cada una de las combinaciones de apramicina + AgNPs frente a* P. aeruginosa *PAO1.*

Pocillo	**[Apram.] mg L^{-1}**	**CIF_{Apr}**	**[AgNPs] mg L^{-1}**	**CIF_{AgNPs}**	**ΣCIF**	**Interpretación**
B6	8	0,50	8	0,50	1	Indiferencia
B7	4	0,25	8	0,50	0,75	Indiferencia
C6	8	0,50	4	0,25	0,75	Indiferencia
C7	4	0,25	4	0,25	0,50	Sinergia

Tabla A3.4.12. *Concentraciones inhibitorias fraccionales (CIF) de la penicilina G (PG) y Ag(I), índices CIF (ΣCIF) y sus interpretaciones para cada una de las combinaciones de penicilina G + Ag(I) frente a* P. aeruginosa *ATCC 27853.*

Pocillo	[PG] mg L^{-1}	CIF_{PG}	[Ag(I)] mg L^{-1}	$CIF_{Ag(I)}$	ΣCIF	Interpretación
D3	16	0,3	4	0,50	0,75	Indiferencia
D6	2	0,03	4	0,50	0,53	Indiferencia
D7	1	0,02	4	0,50	0,52	Indiferencia

Tabla A3.4.13. *Concentraciones inhibitorias fraccionales (CIF) de la apramicina y Ag(I), índices CIF (ΣCIF) y sus interpretaciones para cada una de las combinaciones de apramicina + Ag(I) frente a* P. aeruginosa *ATCC 27853.*

Pocillo	[Apram.] mg L^{-1}	CIF_{Apr}	[Ag(I)] mg L^{-1}	$CIF_{Ag(I)}$	ΣCIF	Interpretación
D6	8	0,50	4	0,50	1	Indiferencia
D7	4	0,25	4	0,50	0,75	Indiferencia
D8	2	0,125	4	0,50	0,63	Indiferencia
D9	1	0,063	4	0,50	0,56	Indiferencia
E6	8	0,50	2	0,25	0,75	Indiferencia
E7	4	0,25	2	0,25	0,50	Sinergia
E8	2	0,125	2	0,25	0,38	Sinergia
E9	1	0,063	2	0,25	0,31	Sinergia
F6	8	0,50	1	0,125	0,63	Indiferencia
F7	4	0,25	1	0,125	0,38	Sinergia
F8	2	0,125	1	0,125	0,25	Sinergia
F9	1	0,063	1	0,125	0,19	Sinergia
G6	8	0,50	0,50	0,063	0,56	Indiferencia
G7	4	0,25	0,50	0,063	0,31	Sinergia
G8	2	0,125	0,50	0,063	0,19	Sinergia
G9	1	0,063	0,50	0,063	0,13	Sinergia
H6	8	0,50	0,25	0,031	0,53	Indiferencia
H7	4	0,25	0,25	0,031	0,28	Sinergia
H8	2	0,125	0,25	0,031	0,16	Sinergia
H9	1	0,063	0,25	0,031	0,09	Sinergia

Tabla A3.4.14. *Concentraciones inhibitorias fraccionales (CIF) de la apramicina y AgNPs, índices CIF (ΣCIF) y sus interpretaciones para cada una de las combinaciones de apramicina + AgNPs frente a* P. aeruginosa *ATCC 27853.*

Pocillo	[Apram.] mg L^{-1}	CIF_{Apr}	[AgNPs] mg L^{-1}	CIF_{AgNPs}	ΣCIF	Interpretación
B6	8	0,50	8	0,5	1	Indiferencia
B7	4	0,25	8	0,5	0,75	Indiferencia
B8	2	0,125	8	0,5	0,63	Indiferencia
B9	1	0,063	8	0,5	0,56	Indiferencia
C6	8	0,50	4	0,25	0,75	Indiferencia
C7	4	0,25	4	0,25	0,50	Sinergia
C8	2	0,125	4	0,25	0,38	Sinergia
C9	1	0,063	4	0,25	0,31	Sinergia
D6	8	0,50	2	0,125	0,63	Indiferencia
D7	4	0,25	2	0,125	0,38	Sinergia
D8	2	0,125	2	0,125	0,25	Sinergia
D9	1	0,063	2	0,125	0,19	Sinergia
E6	8	0,50	1	0,063	0,56	Indiferencia
E7	4	0,25	1	0,063	0,31	Sinergia
E8	2	0,125	1	0,063	0,19	Sinergia
E9	1	0,063	1	0,063	0,13	Sinergia
F6	8	0,50	0,50	0,031	0,53	Indiferencia
F7	4	0,25	0,50	0,031	0,28	Sinergia
F8	2	0,125	0,50	0,031	0,16	Sinergia
G6	8	0,50	0,25	0,016	0,52	Indiferencia
G7	4	0,25	0,25	0,016	0,27	Sinergia
G8	2	0,125	0,25	0,016	0,14	Sinergia
H6	8	0,50	0,125	0,008	0,51	Indiferencia
H7	4	0,25	0,125	0,008	0,26	Sinergia
H8	2	0,125	0,125	0,008	0,13	Sinergia

Estudio de los efectos bactericidas: determinación de la CBF y el índice CBF

De la misma manera que se determinaron las concentraciones inhibitorias fraccionales (CIF) y el índice CIF para estudiar los efectos bacteriostáticos de las combinaciones de antimicrobianos, se calcularon las concentraciones bactericidas fraccionales (CBF) y el índice CBF para determinar los efectos bactericidas de estas combinaciones. Estos cálculos y la interpretación del índice CBF, asociados a cada combinación, se recogen en las Tabla A3.4.18 - Tabla A3.4.27 de este anexo. En los casos en los que la CBM de la penicilina era mayor de 64 mg L^{-1}, se consideró un valor de CBM de 64 mg L^{-1} para realizar los cálculos necesarios. Se estudiaron, principalmente, aquellos pocillos cuyas concentraciones eran menores o iguales que la CBM y presentaban ausencia de turbidez; y algunos de los que presentaban turbidez y eran limítrofes con los que no tenían turbidez. Los pocillos con combinaciones de antimicrobianos en los que se observó crecimiento bacteriano tras la siembra aparecen con un asterisco (*) en las siguientes tablas.

En primer lugar, se evaluaron los efectos bactericidas de las combinaciones de antimicrobianos para la cepa *E. coli* ATCC 25922. En la Tabla A3.4.15 se recogen los resultados de estos efectos para cada combinación estudiada.

Tabla A3.4.15. *Efectos bactericidas de las combinaciones de antimicrobianos frente a* E. coli *ATCC 25922: a) penicilina G + Ag(I); b) penicilina G + AgNPs; c) apramicina + Ag(I); d) apramicina + AgNPs. Ausencia de turbidez: gris. Turbidez: blanco. Efectos sinérgicos: gris + S. Efectos indiferentes: gris + I. *: crecimiento bacteriano.*

a)

			1	2	3	4	5	6	7	8	9
			Concentración de penicilina G, mg L^{-1}								
			64	32	16	8	4	2	1	0,50	0,25
A	Concentración de Ag(I), mg L^{-1}	32									
B		16									
C		8									
D		4	I	I	I	I	I	I	*	*	*
E		2	*	*	*						
F		1	*	*							
G		0,50	*								
H		0,25	*								

b)

			1	2	3	4	5	6	7	8	9
			Concentración de penicilina G, mg L^{-1}								
			64	32	16	8	4	2	1	0,50	0,25
A	Concentración de AgNPs, mg L^{-1}	16									
B		8	I	*	*	*					
C		4	*	*	*						
D		2	*	*							
E		1	*								
F		0,50	*								
G		0,25	*								
H		0,125	*								

c)

	Concentración de Ag(I), mg L^{-1}	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		Concentración de apramicina, mg L^{-1}								
		64	32	16	8	4	2	1	0,50	0,25
A	32									
B	16									
C	8									
D	4				I	I	I	*	*	*
E	2				I	S	S	*	*	
F	1				I	S	*			
G	0,50				I	S	*			
H	0,25				I	*	*			

d)

	Concentración de AgNPs, mg L^{-1}	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		Concentración de apramicina, mg L^{-1}								
		64	32	16	8	4	2	1	0,50	0,25
A	16									
B	8				I	I	I	*		
C	4				I	S	*			
D	2				I	S	*			
E	1				I	*	*			
F	0,50				I	*	*			
G	0,25				I	*	*			
H	0,125				I	*	*			

En el caso de la combinación penicilina G + Ag(I) (Tabla A3.4.15.a) se observó que en combinaciones con concentración igual o mayor que la CBM de Ag(I) (8 mg L^{-1}) no hubo crecimiento bacteriano, debido al efecto individual de cada uno de los antimicrobianos. Por otro lado, en los pocillos D1 - D6, tampoco se observó crecimiento, debido a la acción combinada de ambos antimicrobianos. Estas combinaciones al tener una concentración de Ag(I) solamente una dilución menor que la CBM, presentaron efectos bactericidas indiferentes. En el resto de los pocillos se observó crecimiento, lo que indicaba que esas combinaciones no presentaban efectos bactericidas.

En el caso de la combinación penicilina G + nanopartículas de plata (Tabla A3.4.15.b) se observó ausencia de crecimiento para las combinaciones con concentración igual que la CBM de las nanopartículas de plata (16 mg L^{-1}), como consecuencia del efecto bactericida de éstas. Además, tampoco se observó en la combinación del pocillo B1, la cual tenía una concentración de AgNPs una dilución menor de la CBM, por lo que el efecto bactericida de esta combinación era indiferente. En el resto de los pocillos se observó crecimiento.

En el caso de la combinación apramicina + Ag(I) (Tabla A3.4.15.c) se obtuvo ausencia de crecimiento en combinaciones con concentraciones iguales o mayores de la CBM de la apramicina (16 mg L^{-1}) y de la CBM de Ag(I) (8 mg L^{-1}), lo que concordaba con los resultados de las CBM individuales. Los pocillos de las combinaciones con concentraciones de una dilución menor de las CBM individuales (D4 - D6 y E4 - H4) presentaron ausencia de crecimiento bacteriano y efectos bactericidas indiferentes. Adicionalmente, se observaron combinaciones con concentraciones de más de una dilución menor que las CBM individuales (E5, E6, F5 y G5) que presentaron efectos bactericidas debido a la sinergia surgida por la acción

combinada de ambos antimicrobianos. Con esto se demostró que, disminuyendo hasta 16 veces la concentración de Ag(I) (de 8 a 0,50 mg L^{-1}) y 8 veces la concentración de apramicina (de 16 a 2 mg L^{-1}) se obtenían los mismos efectos bactericidas que utilizando uno de los antimicrobianos individualmente a la concentración de la CBM.

En el caso de la combinación apramicina + nanopartículas de plata (Tabla A3.4.15.d) se observó ausencia de crecimiento en las combinaciones con concentraciones iguales o mayores de las CBM de la apramicina (16 mg L^{-1}) y de las AgNPs (16 mg L^{-1}), así como en aquellas con concentraciones de una dilución menor que las CBM de cada antimicrobiano (B4 - B6 y C4 - H4), las cuales presentaron efectos bactericidas indiferentes. Las combinaciones con concentraciones de más de una dilución menor que la CBM de los antimicrobianos (pocillos C5 y D5) presentaron ausencia de crecimiento debido a los efectos bactericidas sinérgicos como consecuencia de la combinación de ambos antimicrobianos. En este caso también se demostró una disminución de hasta 4 y 8 veces de la concentración de apramicina y de las nanopartículas, respectivamente.

Por tanto, se concluyó que las combinaciones de penicilina G con nanomateriales de plata no presentaron efectos bactericidas sinérgicos frente a *E. coli* ATCC 25922; mientras que ciertas combinaciones de apramicina con Ag(I) y nanopartículas de plata presentaron efectos sinérgicos frente a las mismas bacterias, permitiendo reducir las concentraciones de apramicina hasta 4 - 8 veces y, las de Ag(I) y nanopartículas de plata hasta 16 y 4 veces, respectivamente.

En la Tabla A3.4.16 se recogen los resultados de los efectos bactericidas de las cuatro combinaciones de antimicrobianos frente a la cepa *P. aeruginosa* PAO1.

Tabla A3.4.16. *Efectos bactericidas de las combinaciones de antimicrobianos frente a* P. aeruginosa *PAO1: a) penicilina G + Ag(I); b) penicilina G + AgNPs; c) apramicina + Ag(I); d) apramicina + AgNPs. Ausencia de turbidez: gris. Turbidez: blanco. Efectos sinérgicos: gris + S. Efectos indiferentes: gris + I. *: crecimiento bacteriano.*

a)

	Concentración de Ag(I), mg L^{-1}	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		Concentración de penicilina G, mg L^{-1}								
		64	32	16	8	4	2	1	0,50	0,25
A	32									
B	16									
C	8	*	*	*	*	*	*	I	I	*
D	4	*	*	*	*	*	*	*	*	*
E	2	*	*							
F	1	*								
G	0,50									
H	0,25									

b)

	Concentración de AgNPs, mg L^{-1}	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		Concentración de penicilina G, mg L^{-1}								
		64	32	16	8	4	2	1	0,50	0,25
A	16									
B	8	*	*	*	*	*	*	*	*	*
C	4	*	*	*	*	*	*	*	*	*
D	2	*	*							
E	1	*								
F	0,50									
G	0,25									
H	0,125									

c)

	Concentración de Ag(I), mg L^{-1}	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		Concentración de apramicina, mg L^{-1}								
		256	128	64	32	16	8	4	2	1
A	32									
B	16									
C	8				I	I	I	I	I	I
D	4				I	S	S	S	*	*
E	2				I	S	S	*	*	*
F	1				I	S	S	S		
G	0,50				I	S	S	*		
H	0,25				I	S	*			

d)

	Concentración de AgNPs, mg L^{-1}	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		Concentración de apramicina, mg L^{-1}								
		256	128	64	32	16	8	4	2	1
A	16									
B	8				I	I	I	*		
C	4				I	S	*	*		
D	2				I	*				
E	1				I	*				
F	0,50				I	*				
G	0,25				I	*				
H	0,125				I	S				

En el caso de la combinación penicilina G + Ag(I) (Tabla A3.4.16.a) se observó que en combinaciones con concentración igual o mayor de la CBM de Ag(I) (16 mg L^{-1}) no hubo crecimiento bacteriano debido al efecto individual de la Ag(I). Solamente en dos combinaciones con concentraciones de una dilución menor que la CBM de Ag(I) (C7 y C8) se observó ausencia de crecimiento, y en este caso los efectos bactericidas fueron indiferentes. En el resto de los pocillos se observó un gran crecimiento bacteriano.

En el caso de la combinación penicilina G + nanopartículas de plata (Tabla A3.4.16.b) se observó ausencia de crecimiento solamente para las combinaciones con concentración igual a la CBM de las nanopartículas de plata (16 mg L^{-1}), como

consecuencia de su efecto bactericida. En el resto de las combinaciones se observó un gran crecimiento, lo que indicó que no estas combinaciones no tenían efectos bactericidas.

En el caso de la combinación apramicina + Ag(I) (Tabla A3.4.16.c) se obtuvo que la mayoría de las combinaciones presentaron ausencia de crecimiento, entre ellas aquellas con concentraciones iguales o mayores de la CBM de la apramicina (64 mg L^{-1}) y de la CBM de Ag(I) (16 mg L^{-1}). En los pocillos de las combinaciones con concentraciones de una dilución menor que las CBM (C4 - C9 y D4 - H4) tampoco se observó crecimiento debido a efectos bactericidas indiferentes; mientras que en algunas combinaciones con concentraciones de más de una dilución menor que las CBM individuales (D5 - D7, E5 - E6, F5 - F7, G5 - G6 y H5) se observó ausencia de crecimiento debido a efectos bactericidas sinérgicos. Por tanto, en este ensayo se produjo una disminución significativa de las concentraciones necesarias para producir un efecto bactericida al combinar ambos antimicrobianos, de hasta 16 veces la concentración de apramicina y 64 veces la de Ag(I) (de 64 a 4 mg L^{-1} y de 16 a 0,25 mg L^{-1}, respectivamente)

En el caso de la combinación apramicina + nanopartículas de plata (Tabla A3.4.16.d) se observó ausencia de crecimiento en las combinaciones con concentraciones iguales o mayores de las CBM de la apramicina (64 mg L^{-1}) y de la CBM de las AgNPs (16 mg L^{-1}), así como en aquellas con concentraciones de una dilución menor que las CBM de cada antimicrobiano (B4 - B6 y C4 - H4), que presentaron efectos bactericidas indiferentes. Solamente dos combinaciones con concentraciones de más de una dilución menor que la CBM de los antimicrobianos (C5 y H5) presentaron efectos bactericidas sinérgicos. En estos casos también se demostró una disminución de 4 veces de la concentración de apramicina. En las combinaciones de los pocillos D5 - G5 se observaron una o dos bacterias solamente, lo que indicaba que estas combinaciones presentaban un gran efecto bactericida, aunque no produjera la muerte de toda la población inicial.

Por tanto, se concluyó que las combinaciones de penicilina G con nanomateriales de plata no presentaron efectos bactericidas sinérgicos frente a *P. aeruginosa* PAO1; mientras que las combinaciones de apramicina con nanopartículas de plata y Ag(I) presentaron efectos sinérgicos, permitiendo reducir las concentraciones de apramicina hasta 4 y 16 veces, la de Ag(I) hasta 64 veces y la de nanopartículas de plata hasta 128 veces.

En la Tabla A3.4.17 se recogen los resultados de los efectos bactericidas de las combinaciones de antimicrobianos frente a la cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Tabla A3.4.17. *Efectos bactericidas de las combinaciones de antimicrobianos frente a* P. aeruginosa *ATCC 27853: a) penicilina G + Ag(I); b) penicilina G + AgNPs; c) apramicina + Ag(I); d) apramicina + AgNPs. Ausencia de turbidez: gris. Turbidez: blanco. Efectos sinérgicos: gris + S. Efectos indiferentes: gris + I. *: crecimiento bacteriano.*

a)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
		Concentración de penicilina G, mg L^{-1}								
		64	32	16	8	4	2	1	0,50	0,25
A	32									
B	16									
C	8	*	*	*	I	I	*	I	I	*
D	4	*	*	*	*	*	*	*	*	*
E	2	*	*							
F	1	*								
G	0,50									
H	0,25									

Concentración de Ag(I), mg L^{-1}

b)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
		Concentración de penicilina G, mg L^{-1}								
		64	32	16	8	4	2	1	0,50	0,25
A	16									
B	8	*	*							
C	4	*								
D	2									
E	1									
F	0,50									
G	0,25									
H	0,125									

Concentración de AgNPs, mg L^{-1}

c)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
		Concentración de apramicina, mg L^{-1}								
		256	128	64	32	16	8	4	2	1
A	32									
B	16									
C	8				I	I	I	I	I	I
D	4				I	S	S	S	S	S
E	2				I	S	S	S	S	S
F	1				I	S	S	*	S	*
G	0,50				I	S	S	S	S	S
H	0,25				I	S	S	S	*	*

Concentración de Ag(I), mg L^{-1}

d)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
		Concentración de apramicina, mg L^{-1}								
		256	128	64	32	16	8	4	2	1
A	16									
B	8				I	I	*	*	*	*
C	4				I	S	*	*	*	*
D	2				I	*	*	*	*	*
E	1				I	*	*	S	*	*
F	0,50				I	S	*	*	*	*
G	0,25				I	S	*	*	*	*
H	0,125				I	*	S	*	*	*

Concentración de AgNPs, mg L^{-1}

En el caso de la combinación penicilina G + Ag(I) (Tabla A3.4.17.a) se observó ausencia de crecimiento en combinaciones con concentración igual o mayor de la CBM de Ag(I) (16 mg L^{-1}), así como en ciertas combinaciones con concentraciones de una dilución menor que la CBM de Ag(I), en las que los efectos bactericidas fueron indiferentes. El resto de las combinaciones estudiadas se observó crecimiento de las bacterias.

En el caso de la combinación penicilina G + nanopartículas de plata (Tabla A3.4.17.b) solamente se observó ausencia de crecimiento en las combinaciones con una concentración igual a la CBM de las nanopartículas (16 mg L^{-1}). En el resto de las combinaciones se observó una gran crecimiento, por lo que se determinó que ninguna de ellas presentaba efectos bactericidas.

En el caso de la combinación apramicina + Ag(I) (Tabla A3.4.17.c) se obtuvo que casi todas las combinaciones presentaron ausencia de crecimiento. Los pocillos de las combinaciones con concentraciones de una dilución menor de las CBM individuales (C4 - C9 y D4 - H4) presentaron efectos bactericidas indiferentes; mientras que las combinaciones con concentraciones de más de una dilución menor que las CBM individuales (D5 - D9, E5 - E9, F5 - F6, F8, G5 - G9 y H5 - H7) presentaron efectos bactericidas sinérgicos. Por lo tanto, en este ensayo se produjo una disminución de hasta 64 veces de la concentración de apramicina y de Ag(I) (de 64 a 1 mg L^{-1} y de 16 a 0,25 mg L^{-1}, respectivamente).

En el caso de la combinación apramicina + nanopartículas de plata (Tabla A3.4.17.d) se observó ausencia de crecimiento en casi todas las combinaciones estudiadas, entre ellas, aquellas con concentraciones iguales o mayores que las CBM de la apramicina (64 mg L^{-1}) y de las AgNPs (16 mg L^{-1}), que presentaron efectos debidos a la actividad individual de los antimicrobianos; y aquellas con concentraciones de una dilución menor que las CBM (B4 - B5 y C4 - H4), que presentaron efectos bactericidas indiferentes. Ciertas combinaciones con concentraciones de más de una dilución menor que las CBM (C5, E7, F5 - G5 y H6) mostraron efectos bactericidas sinérgicos. En este caso también se demostró una disminución de 16 veces de la concentración de apramicina (de 64 a 4 mg L^{-1}), así como una disminución muy significativa de las nanopartículas de plata.

Por tanto, se concluyó que las combinaciones de penicilina G con Ag(I) y nanopartículas de plata no presentaron efectos bactericidas sinérgicos frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853; mientras que las combinaciones de apramicina con Ag(I) y nanopartículas de plata presentaron efectos sinérgicos, permitiendo reducir la concentración de apramicina hasta 16 y 64 veces, la de Ag(I) hasta 64 veces y la de nanopartículas de plata hasta 128 veces.

A continuación, en las siguientes tablas (Tabla A3.4.18 - Tabla A3.4.27) se recogen los resultados obtenidos para las distintas combinaciones de antimicrobianos estudiadas donde se muestran las concentraciones bactericidas fraccionales (CBF) de cada antimicrobiano, así como el índice CBF (ΣCBF) y la interpretación de este índice.

Tabla A3.4.18. *Concentraciones bactericidas fraccionales (CBF) de la penicilina G (PG) y Ag(I), índices CBF y sus interpretaciones para cada una de las combinaciones de penicilina G + Ag(I) frente a* E. coli *ATCC 25922.*

Pocillo	[PG] mg L^{-1}	CBF_{PG}	[Ag(I)] mg L^{-1}	$CBF_{Ag(I)}$	ΣCBF	Interpretación
D1	64	1	4	0,50	**1,5**	Indiferencia
D2	32	0,50	4	0,50	**1**	Indiferencia
D3	16	0,25	4	0,50	**0,75**	Indiferencia
D4	8	0,125	4	0,50	**0,63**	Indiferencia
D5	4	0,063	4	0,50	**0,56**	Indiferencia
D6	2	0,031	4	0,50	**0,53**	Indiferencia

Tabla A3.4.19. *Concentraciones bactericidas fraccionales (CBF) de la penicilina G (PG) y AgNPs, índices CBF y sus interpretaciones para cada una de las combinaciones de penicilina G + AgNPs frente a* E. coli *ATCC 25922.*

Pocillo	[PG] mg L^{-1}	CBF_{PG}	[AgNPs] mg L^{-1}	CBF_{AgNPs}	ΣCBF	Interpretación
B1	64	1	8	0,50	**1,5**	Indiferencia

Tabla A3.4.20. *Concentraciones bactericidas fraccionales (CBF) de la apramicina y Ag(I), índices CBF (ΣCBF) y sus interpretaciones para cada una de las combinaciones de apramicina + Ag(I) frente a* E. coli *ATCC 25922.*

Pocillo	[Apram.] mg L^{-1}	CBF_{Apr}	[Ag(I)] mg L^{-1}	$CBF_{Ag(I)}$	ΣCBF	Interpretación
D4	8	0,50	4	0,50	**1**	Indiferencia
D5	4	0,25	4	0,50	**0,75**	Indiferencia
D6	2	0,125	4	0,50	**0,63**	Indiferencia
E4	8	0,50	2	0,25	**0,75**	Indiferencia
E5	4	0,25	2	0,25	**0,50**	Sinergia
E6	2	0,125	2	0,25	**0,38**	Sinergia
F4	8	0,50	1	0,125	**0,63**	Indiferencia
F5	4	0,25	1	0,125	**0,38**	Sinergia
G4	8	0,50	0,50	0,063	**0,56**	Indiferencia

G5	4	0,25	0,50	0,063	**0,31**	Sinergia
H4	8	0,50	0,25	0,031	**0,53**	Indiferencia

Tabla A3.4.21. *Concentraciones bactericidas fraccionales (CBF) de la apramicina y AgNPs, índices CBF (ΣCBF) y sus interpretaciones para cada una de las combinaciones de apramicina + AgNPs frente a* E. coli *ATCC 25922.*

Pocillo	**[Apram.] mg L^{-1}**	**CBF_{Apr}**	**[AgNPs] mg L^{-1}**	**CBF_{AgNPs}**	**ΣCBF**	**Interpretación**
B4	8	0,50	8	0,50	**1**	Indiferencia
B5	4	0,25	8	0,50	**0,75**	Indiferencia
B6	2	0,125	8	0,50	**0,63**	Indiferencia
C4	8	0,50	4	0,25	**0,75**	Indiferencia
C5	4	0,25	4	0,25	**0,50**	Sinergia
D4	8	0,50	2	0,125	**0,63**	Indiferencia
D5	4	0,25	2	0,125	**0,38**	Sinergia
E4	8	0,50	1	0,063	**0,56**	Indiferencia
F4	8	0,50	0,50	0,031	**0,53**	Indiferencia
G4	8	0,50	0,25	0,016	**0,52**	Indiferencia
H4	8	0,50	0,125	0,008	**0,51**	Indiferencia

Tabla A3.4.22. *Concentraciones bactericidas fraccionales (CBF) de la penicilina G (PG) y Ag(I), índices CBF y sus interpretaciones para cada una de las combinaciones de penicilina G + Ag(I) frente a* P. aeruginosa *PAO1.*

Pocillo	**[PG] mg L^{-1}**	**CBF_{PG}**	**[Ag(I)] mg L^{-1}**	**$CBF_{Ag(I)}$**	**ΣCBF**	**Interpretación**
C7	1	0,016	8	0,50	**1,5**	Indiferencia
C8	0,50	0,008	8	0,50	**1,5**	Indiferencia

Tabla A3.4.23. *Concentraciones bactericidas fraccionales (CBF) de la apramicina y Ag(I), índices CBF (ΣCBF) y sus interpretaciones para cada una de las combinaciones de apramicina + Ag(I) frente a* P. aeruginosa *PAO1.*

Pocillo	[Apram.] mg L^{-1}	CBF_{Apr}	[Ag(I)] mg L^{-1}	$CBF_{Ag(I)}$	ΣCBF	Interpretación
C4	32	0,50	8	0,50	**1**	Indiferencia
C5	16	0,25	8	0,50	**0,75**	Indiferencia
C6	8	0,125	8	0,50	**0,63**	Indiferencia
C7	4	0,063	8	0,50	**0,56**	Indiferencia
C8	2	0,031	8	0,50	**0,53**	Indiferencia
C9	1	0,016	8	0,50	**0,52**	Indiferencia
D4	32	0,50	4	0,25	**0,75**	Indiferencia
D5	16	0,25	4	0,25	**0,50**	Sinergia
D6	8	0,125	4	0,25	**0,38**	Sinergia
D7	4	0,063	4	0,25	**0,31**	Sinergia
E4	32	0,50	2	0,125	**0,63**	Indiferencia
E5	16	0,25	2	0,125	**0,38**	Sinergia
E6	8	0,125	2	0,125	**0,25**	Sinergia
F4	32	0,50	1	0,063	**0,56**	Indiferencia
F5	16	0,25	1	0,063	**0,31**	Sinergia
F6	8	0,125	1	0,063	**0,19**	Sinergia
F7	4	0,063	1	0,063	**0,13**	Sinergia
G4	32	0,50	0,50	0,031	**0,53**	Indiferencia
G5	16	0,25	0,50	0,031	**0,28**	Sinergia
G6	8	0,125	0,50	0,031	**0,16**	Sinergia
H4	32	0,50	0,25	0,016	**0,52**	Indiferencia
H5	16	0,25	0,25	0,016	**0,27**	Sinergia

Tabla A3.4.24. *Concentraciones bactericidas fraccionales (CBF) de la apramicina y AgNPs, índices CBF (ΣCBF) y sus interpretaciones para cada una de las combinaciones de apramicina + AgNPs frente a* P. aeruginosa *PAO1.*

Pocillo	[Apram.] mg L^{-1}	CBF_{Apr}	[AgNPs] mg L^{-1}	CBF_{AgNPs}	ΣCBF	Interpretación
B4	32	0,5	8	0,50	**1**	Indiferencia
B5	16	0,25	8	0,50	**0,75**	Indiferencia
B6	8	0,125	8	0,50	**0,63**	Indiferencia
C4	32	0,5	4	0,25	**0,75**	Indiferencia
C5	16	0,25	4	0,25	**0,50**	Sinergia
D4	32	0,5	2	0,125	**0,63**	Indiferencia
E4	32	0,5	1	0,063	**0,56**	Indiferencia
F4	32	0,5	0,5	0,031	**0,53**	Indiferencia
G4	32	0,5	0,25	0,016	**0,52**	Indiferencia
H4	32	0,5	0,125	0,008	**0,51**	Indiferencia
H5	16	0,25	0,125	0,008	**0,26**	Sinergia

Tabla A3.4.25. *Concentraciones bactericidas fraccionales (CBF) de la penicilina G (PG) y Ag(I), índices CBF y sus interpretaciones para cada una de las combinaciones de penicilina G + Ag(I) frente a* P. aeruginosa *ATCC 27853.*

Pocillo	[PG] mg L^{-1}	CBF_{PG}	[Ag(I)] mg L^{-1}	$CBF_{Ag(I)}$	ΣCBF	Interpretación
C4	8	0,125	8	0,50	**0,63**	Indiferencia
C5	4	0,063	8	0,50	**0,56**	Indiferencia
C7	1	0,016	8	0,50	**0,52**	Indiferencia
C8	0,5	0,008	8	0,50	**0,51**	Indiferencia

Tabla A3.4.26. *Concentraciones bactericidas fraccionales (CBF) de la apramicina y Ag(I), índices CBF (ΣCBF) y sus interpretaciones para cada una de las combinaciones de apramicina + Ag(I) frente a* P. aeruginosa *ATCC 27853.*

Pocillo	[Apram.] mg L^{-1}	CBF_{Apr}	[Ag(I)] mg L^{-1}	$CBF_{Ag(I)}$	ΣCBF	Interpretación
C5	16	0,25	8	0,50	**0,75**	Indiferencia
C6	8	0,125	8	0,50	**0,63**	Indiferencia
C7	4	0,063	8	0,50	**0,56**	Indiferencia
C8	2	0,031	8	0,50	**0,53**	Indiferencia
C9	1	0,016	8	0,50	**0,52**	Indiferencia
D5	16	0,25	4	0,25	**0,50**	Sinergia
D6	8	0,125	4	0,25	**0,38**	Sinergia
D7	4	0,063	4	0,25	**0,31**	Sinergia
D8	2	0,031	4	0,25	**0,28**	Sinergia
D9	1	0,016	4	0,25	**0,27**	Sinergia
E5	16	0,25	2	0,125	**0,38**	Sinergia
E6	8	0,125	2	0,125	**0,25**	Sinergia
E7	4	0,063	2	0,125	**0,19**	Sinergia
E8	2	0,031	2	0,125	**0,16**	Sinergia
E9	1	0,016	2	0,125	**0,14**	Sinergia
F5	16	0,25	1	0,063	**0,31**	Sinergia
F6	8	0,125	1	0,063	**0,19**	Sinergia
F8	2	0,031	1	0,063	**0,09**	Sinergia
G5	16	0,25	0,50	0,031	**0,28**	Sinergia
G6	8	0,125	0,50	0,031	**0,16**	Sinergia
G7	4	0,063	0,50	0,031	**0,09**	Sinergia
G8	2	0,031	0,50	0,031	**0,06**	Sinergia
G9	1	0,016	0,50	0,031	**0,05**	Sinergia
H5	16	0,25	0,25	0,016	**0,27**	Sinergia
H6	8	0,125	0,25	0,016	**0,14**	Sinergia
H7	4	0,063	0,25	0,016	**0,08**	Sinergia

Tabla A3.4.27. *Concentraciones bactericidas fraccionales (CBF) de la apramicina y AgNPs, índices CBF (ΣCBF) y sus interpretaciones para cada una de las combinaciones de apramicina + AgNPs frente a* P. aeruginosa *ATCC 27853.*

Pocillo	[Apram.] mg L^{-1}	CBF_{Apr}	[AgNPs] mg L^{-1}	CBF_{AgNPs}	ΣCBF	Interpretación
B5	16	0,25	8	0,50	**0,75**	Indiferencia
B6	8	0,125	8	0,50	**0,63**	Indiferencia
B7	4	0,063	8	0,50	**0,56**	Indiferencia
B8	2	0,031	8	0,50	**0,53**	Indiferencia
B9	1	0,016	8	0,50	**0,52**	Indiferencia
C5	16	0,25	4	0,25	**0,50**	Sinergia
E7	4	0,063	1	0,063	**0,13**	Sinergia
F5	16	0,25	0,50	0,031	**0,28**	Sinergia
G5	16	0,25	0,25	0,016	**0,27**	Sinergia
H6	8	0,125	0,125	0,008	**0,13**	Sinergia

ANEXO 4. PUBLICACIONES

El trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

- F. Laborda, A.C. Gimenez-Ingalaturre, E. Bolea, J.R. Castillo, Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry as screening tool for detection of particles, Spectrochim Acta Part B At Spectrosc. 159 (2019) 105654. https://doi.org/10.1016/j.sab.2019.105654.

- F. Laborda, A.C. Gimenez-Ingalaturre, E. Bolea, J.R. Castillo, About detectability and limits of detection in single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, Spectrochim Acta Part B At Spectrosc. 169 (2020) 105883. https://doi.org/10.1016/j.sab.2020.105883.

- F. Laborda, A.C. Gimenez-Ingalaturre, E. Bolea, Single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry for the analysis of inorganic engineered nanoparticles: Metrological and quality issues, in: Comprehensive Analytical Chemistry, Elsevier B.V., 2021: pp. 35–67. https://doi.org/10.1016/bs.coac.2021.02.012.

- E. Bolea, M.S. Jimenez, J. Perez-Arantegui, J.C. Vidal, M. Bakir, K. Ben-Jeddou, A.C. Gimenez-Ingalaturre, D. Ojeda, C. Trujillo, F. Laborda, Analytical applications of single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: A comprehensive and critical review, Analytical Methods. 13 (2021) 2742–2795. https://doi.org/10.1039/d1ay00761k.

- A.C. Gimenez-Ingalaturre, K. Ben-Jeddou, J. Perez-Arantegui, M.S. Jimenez, E. Bolea, F. Laborda, How to trust size distributions obtained by single particle inductively coupled plasma mass spectrometry analysis, Anal Bioanal Chem. (2022) 1–12. https://doi.org/10.1007/s00216-022-04215-z.

- A.C. Gimenez-Ingalaturre, E. Rubio, P. Chueca, F. Laborda, P. Goñi, Contribution to optimization and standardization of antibacterial assays with silver nanoparticles: the culture medium and their aggregation, J Microbiol Methods. 203 (2022) 106618. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106618.

- M. Bakir, K. Ben-Jeddou, A.C. Gimenez-Ingalaturre, E. Bolea, F. Laborda, Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: A Valuable Tool in Environmental Analysis, in: Environmental Nanopollutants, The Royal Society of Chemistry, 2022: pp. 321–338. https://doi.org/10.1039/9781839166570-00321.

Spectrochimica Acta Part B 159 (2019) 105654

Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/sab

Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry as screening tool for detection of particles

Francisco Laborda*, Ana C. Gimenez-Ingalaturre, Eduardo Bolea, Juan R. Castillo

Group of Analytical Spectroscopy and Sensors (GEAS), Institute of Environmental Sciences (IUCA), University of Zaragoza, Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Single particle detection
ICP-MS
Screening
Nanometrology
Metallic food additives

ABSTRACT

Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS) was evaluated and validated as a qualitative method for the assessment of the presence/absence of particles containing specific elements in a sample. The binary response (present/absent) obtained allows to use SP-ICP-MS as a screening tool for rapid classification of samples, which can be further submitted to more specific analysis. A metrological treatment of SP-ICP-MS as qualitative method is presented, providing solid criteria for identifying particle events in SP-ICP-MS measurements and the presence of particle in the samples by using the critical value (or limit of decision) concept. Based on theoretical and experimental evidences, a critical value for identification of particle events by using a 5σ criterion (σ: standard deviation of the baseline) is proposed to eliminate or minimize the occurrence of false positives, whereas a 2.33σ criterion (σ: standard deviation of the number of particles counted in blanks) is proposed for confirming the presence of particles larger than the minimum detectable size in a sample. Signal domain critical values can provide semiquantitative information as size and number concentration critical values. Size critical values of 25–30 nm were obtained for metallic, spherical and solid particle of gold and silver and 50–80 nm for aluminium, whereas number concentration critical values around 10^5 particles per liter could be achieved regardless the element for the total acquisition time selected (1 min). The screening approach was applied to the detection of particles from approved metallic additives in foods.

1. Introduction

Single particle inductively coupled plasma (SP-ICP-MS) offers unique features for the detection of particles in liquid suspensions, as well as for their quantification and characterization [1–3]. SP-ICP-MS has evolved rapidly over the past few years, although it can still be considered under development. Its seeming easy of implementation, along with the availability of data treatment tools [4,5] and tutorials [6] have contributed to spreading this methodology to such extent that the International Organization of Standarization (ISO) has recently published a standard for determination of size distribution and concentration of inorganic nanoparticles by SP-ICP-MS [7]. Manufacturers have also made significant contributions to this development by incorporating technical improvements to the ICP-MS instruments [8–10] but also by integrating specific data treatment and assessment tools in their software. As a result of all above, SP-ICP-MS is being applied in an increasing number of studies in different fields (environment, toxicology, food…) [11,12]. However, in spite of this successful evolution, SP-ICP-MS still lacks harmonized metrological protocols, as well as rigourosly validated methods [13,14] being considered an emerging methodology yet.

The fundamentals of SP-ICP-MS were outlined by Degueldre et al. [15] and have been described elsewhere [2,3]. In brief, the basic assumption behind SP-ICP-MS is that each recorded particle event represents an individual particle, which involves to measure very diluted particle suspensions ($<$ ca.10^8 particles L^{-1}) at very high acquisition frequencies ($>$ 100 Hz). Under these conditions, the net intensity of each particle event is proportional to the number of atoms of the element monitored in each detected particle, and hence to the mass of element per particle and to the size of the particle if its composition, shape and density are known. Quantitative determinations of particle number concentrations are based on the linear relationship between the number of particle events recorded and the particle number concentration; whereas, the intensity of the particle events is proportional to the mass of analyte per particle, or to the third power of the diameter for solid, spherical, and pure particles, allowing the determination of element mass per particle and size distributions, respectively.

In SP-ICP-MS, signals are recorded as time scans (Fig. 1a), which consist of a number of particle events (transient signals or pulses, depending on the selected acquisition frequency) above a continuous

* Corresponding author.
E-mail address: flaborda@unizar.es (F. Laborda).

https://doi.org/10.1016/j.sab.2019.105654
Received 17 January 2019; Received in revised form 16 July 2019; Accepted 23 July 2019
Available online 24 July 2019
0584-8547/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

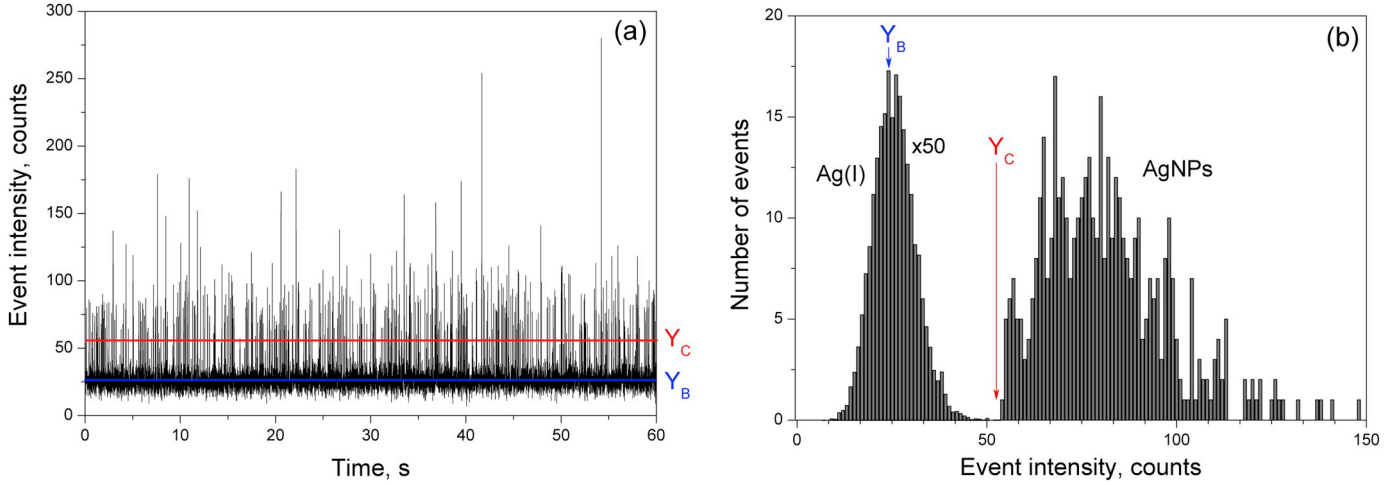


Fig. 1. (a) SP-ICP-MS time scan of a metallic silver nanoparticle suspension (100 nm) containing dissolved silver (1 μg L^{-1}). (b) Event intensity histogram of data from (a).

baseline, due to the background at the mass recorded or to the presence of dissolved forms of the element measured. Raw time scans can be processed by plotting the event intensity vs. the event intensity frequency (or the number of events during a fixed acquisition time), obtaining histograms, with a first distribution due to the background and/or the presence of dissolved forms of the element measured and a second one due to the particles themselves (Fig. 1b). SP-ICP-MS provides quantitative information about size and number concentration when particles produce size distributions over the size detection limits of the method, like in Fig. 1b, otherwise partial distributions are obtained (e.g. [16–19]) or just scattered pulses over the baseline (e.g. [20–22]). In such cases, number concentrations are underestimated and restricted size/mass per particle information is attainable; hence, SP-ICP-MS information should be considered qualitative, in the sense that just the presence in the sample of particles over a certain size can been confirmed. In this way, SP-ICP-MS has been considered for screening analysis by several authors [4,14,23], although a metrological treatment of SP-ICP-MS as screening method, including its validation, has not been performed until now.

When SP-ICP-MS is used as a screening method for detection of (nano)particles, the objective is to assess their presence or absence in a sample. Thus, by using an instrumental signal (time scan), which must be processed in a convenient way, a binary response of the type yes/no, positive/negative or present/absent should be obtained. Whereas a qualitative method for a conventional analyte involves a signal related to its chemical composition, in the case of (nano)particles, information related to the size is required, together with information about their composition [24]. With respect to composition, SP-ICP-MS is capable of providing information about the presence of selected elements in the particles (one with sector field and conventional quadrupole spectrometers, up to two with fast scanning quadrupole spectrometers and the whole mass range with TOF instruments). Because ICP-MS working in single particle mode behaves as a particle counting technique, providing information in a particle-by-particle basis, SP-ICP-MS produces signals directly related to the presence of particles. However, as any qualitative method based on instrumental detection, quantitive information can also be inferred [25], because only if the number concentration of particles is over a certain value and the particles contain an amount of element (or have a size) larger than a certain value, the response will be yes or present.

The objectives of this work are the evaluation and validation of SP-ICP-MS as screening method for detection of (nano)particles in suspensions. These objectives involve the application of metrological criteria and concepts related to detectability in SP-ICP-MS, in an attempt to open a process of harmonization in the SP-ICP-MS community about these topics. The screening method has been applied to the detection of gold, silver and aluminium particles from metallic additives in food samples.

2. Theory

2.1. Discrimination of particle/baseline events

The first step for processing raw data from a time scan (Fig. 1a) involves the discrimination between readings from particles and the baseline. This can be accomplished by adapting the concept of critical value or limit of decision, developed by Currie to describe the detection capabilities of an analytical method [26].

In SP-ICP-MS the baseline readings can be considered as blank measurements, producing a distribution of baseline signals around Y_B with a standard deviation σ_B (left distribution in Fig. 1b). This means that readings higher than Y_B can correspond to baseline events, although the decision whether they correspond to a particle or not must involve to consider certain threshold value. This threshold is called decision limit or critical value (Y_C), and it can be defined as the response of the instrument above which an observed signal is reliably attributed to the presence of a particle. However, the selection of this critical level implies that there is a certain probability α that an event is falsely detected as a particle, producing a false positive (type I error). If the distributions of the baseline signals are considered normal, with a well-known standard deviation, the critical value can be presented as:

$$Y_C = Y_B + k\sigma_B \quad (1)$$

where k denotes the (1-α) quantile of the standard normal distribution ($z_{1-\alpha}$).

Eq. (1) can also be expressed with respect to net signals ($S = Y - Y_B$) as:

$$S_C = k\sigma_B \quad (2)$$

The critical value depends both on the standard deviation of the baseline and on the accepted level of false positives. It is used for an a posteriori decision, a decision made after the signal is measured, which is the case for discrimination of particle and baseline events in a SP-ICP-MS time scan.

2.2. Detection of particles

Application of a critical value for discrimination of particles from baseline events should involve the selection of a k value that guarantees that no particles are detected from a blank containing no particles.

Under such ideal conditions, the detection of one particle event in a sample time scan would confirm the presence of particles in the sample. When particle events are detected in the blank, a critical value for detection of particles higher than zero must be considered. In any case, the counting of particle events is governed by Poisson statistics ($\sigma = \sqrt{Y}$), and the critical value for detection of particles ($S_{C,N}$) in paired measurements of blank and samples for $\alpha = 0.05$ is given by [26]:

$$S_{C,N} = 2.33\sqrt{Y_{B,N}} \quad (3)$$

where $Y_{B,N}$ ($=\sigma_{B,N}{}^2$) is the mean number of events higher than the signal intensity critical value in a blank, which correspond to the particles detected. A gross critical value can be calculated as:

$$Y_{C,N} = Y_{B,N} + 2.33\sqrt{Y_{B,N}} \quad (4)$$

2.3. Background/dissolved analyte signals in ICP-MS

In the absence of particles, an ICP-MS signal from background or dissolved analyte (Y) is defined as the number of ions arriving at the detector during a dwell time period. Random fluctuations of the signal due to different noise sources are responsible of the baseline distribution observed in SP-ICP-MS histograms and limit the attainable precision of ICP-MS measurements. Quadrupole ICP-MS instruments equipped with electron multipliers show a Poisson-distributed noise for low-count signals, being equal to the square root of the signal, although for high-count signals flicker noise, which is proportional to the magnitude of the signal, becomes significant. Then, for a signal Y, expressed as counted ions, its total noise (σ_t) can be expressed as [27]:

$$\sigma_t = \sqrt{Y + \xi^2 Y^2} \quad (5)$$

where ξ is the flicker noise coefficient. Eq. (5) should be modified for other types of instruments, like TOF-ICP-MS, which are equipped with microchannel plate detectors that show compound Poisson-distributed noise [28].

3. Experimental

3.1. Instrumentation

A Perkin-Elmer Sciex model ELAN DRC-e ICP mass spectrometer (Toronto, Canada) was used throughout. The sample introduction system consisted of a glass concentric Slurry nebulizer and a cyclonic spray chamber (Glass Expansion, Melbourne, Australia). Default instrumental and data acquisition parameters are listed in Table 1.

3.2. Standards

Diluted suspensions of gold and silver nanoparticles were prepared from commercially available suspensions. A gold nanoparticle (PEG-carboxil 0.8 kDa surface) suspension of 99.4 ± 3.0 nm diameter was obtained from NanoComposix (San Diego, CA, USA). Suspensions of monodisperse citrate-stabilized silver and gold nanoparticles of nominal diameters 97 ± 11 and 103 ± 10 nm, respectively, were purchased from NanoComposix. Dilutions were prepared in ultrapure water (Milli-Q Advantage, Molsheim, France) accurately weighing (± 0.1 mg) aliquots of the stock suspensions after 1 min sonication. Alternatively, decoration dusting powders were prepared in 0.1% (v/v) Tween 20 due to their hydrophobicity. After dilution and before each analysis, the suspensions were bath sonicated for 1 min. Longer sonication times were not used to avoid excessive heating of the suspensions.

Aqueous gold, silver and aluminium solutions were prepared from standard stock solutions of 1000 mg L^{-1} (Panreac, Barcelona, Spain) by dilution in ultrapure water or 0.1% (v/v) Tween 20.

Table 1
Default instrumental and data acquisition parameters for SP-ICP-MS.

Instrumental parameters	
RF power	1200 W
Argon gas flow rate	
Plasma	15 L min^{-1}
Auxiliary	1.2 L min^{-1}
Nebulizer	1.0 L min^{-1}
Sample flow rate	1.0 mL min^{-1}
Data acquisition parameters	
Dwell time	5 ms
Readings per replicate	12,000
Settling time	3 ms
Total acquisition time	60 s
Isotopes monitored	^{107}Ag, ^{27}Al, ^{197}Au

3.3. Food products

Four food products commercially available were analyzed along this study. Two products (golden powder and silver powder) consisted of decoration dusting powders for golden or silver metallic finishes. Each product declared in its label to contain metallic gold (E175) and silver (E174) food additives, respectively, in addition to mica and other components.

The other two products (silver beads and aluminium beads) consisted of silvery coated candy beads used for cake decoration, containing E174 (silver) or E173 (aluminium), respectively, in addition to other ingredients. Both types of edible beads had a diameter of 4 mm, with a composition of sugar and starch, covered with a smooth coating containing silver or aluminium. Uncoated beads of the same size and from the same manufacturer were used as food matrix blanks.

3.4. Procedures

3.4.1. Particle release experiments

Five candy beads coated with silver or aluminium (250–300 mg) were accurately weighed (± 0.1 mg) and put into polyethylene tubes, filled with 50 mL of ultrapure water and placed in a rotary tumbler for 2 h at 45 rpm and room temperature in darkness. After this period, the suspensions were subjected to centrifugation (Thermo Heraeus Multifuge X1R, equipped with a swigging bucket rotor, Walthman, USA) for 12 min at 500 rpm or 7 min at 1500 rpm to remove, according their size, silver or aluminium metallic particles larger than 1 μm, respectively. The supernatants were diluted 1:5 in ultrapure water and suspensions were bath sonicated for 1 min before each analysis.

For food matrix blanks, one uncoated bead (50 mg) was put into a polyethylene tube and 50 mL of ultrapure water were added. The mixture was shaken for 2 h at 45 rpm and room temperature in darkness followed by the centrifugation described above. Samples were bath sonicated for 1 min before each analysis.

3.4.2. Powder suspensions

Golden and silver powders (50 mg) were accurately weighed and put into polyethylene tubes, filled with 50 mL of 0.1% (v/v) Tween 20 and shaken vigorously. The mixtures were subjected to centrifugation for 10 min at 5000 rpm, and then samples were bath sonicated for 5 min. After this period, the suspensions were centrifugated for 12 min at 500 rpm to remove particles over ca. 1 μm. Collected supernatants were bath sonicated for 1 min before each analysis.

3.4.3. SP-ICP-MS measurements and data processing

Suspensions were measured in single particle mode using a dwell time of 5 ms with a total acquisition time of 60 s and recording 12,000 readings per time scan (Table 1). Because the data acquisition rate of the instrument is limited by the overflow of the data buffer, at least two

isotopes were monitored in order to use the settle time to empty the buffer. This strategy allowed reduction of dwell times down to 5 ms using the standard settle time of 3 ms.

Screening analysis were performed by measuring in triplicate a blank followed by a sample. Raw data from blank and sample time scans were processed to discriminate readings from particles and the baseline by applying a 5σ criterion iteratively by using a modified version of the single particle calculation tool developed by RIKILT [29]. Next, the mean number of particles ($Y_{B,N}$) were obtained from the processed blank time scans to obtain the critical value for detection of particles (Eq. (4)), which was compared with the number of particles detected in the processed time scans of the samples to confirm the presence or absence of particles in the sample.

Analyte transport efficiency was calculated according to the methods developed by Pace et al. [30] by using the gold nanoparticle standard described above. Similar results were obtained for the frequency and the size methods (3.15 ± 0.11 and 3.09 ± 0.15, respectively, $n = 3$). Sample flow rate was measured gravimetrically.

4. Results and discussion

4.1. Discrimination of particle events

Discrimination between readings from particles and the baseline in a SP-ICP-MS time scan can be accomplished by focusing on the baseline, using a threshold criterion equivalent to the critical value (Y_C) described in Section 2.3. When baseline threshold strategies are followed, the number of false positives can be more or less significant, depending on the criterion adopted. However, in order to get the best particle detection capability of a SP-ICP-MS method, the number of false positives should be zero, or close to zero.

Most of SP-ICP-MS procedures follow semi-empirical approaches, supported by conventional decision/detection limit concepts for conventional quantitative analysis, based on the use of multiples of the baseline standard deviation (n sigma criteria). Coefficients of 3 [30,31] and 5 [32,33,34,35] are commonly used, although 8 [36] has also been applied. Whereas the use of these coefficients is not always justified on statistical basis, the aim of using larger coefficients is the reduction or elimination of false positives. For normal baseline distributions, a critical value calculated as 3σ involves that α = 0.00135, meaning that 0.135% of the baseline events would be considered as particles, whereas for a 5σ criterion, the occurrence of false positives ($\alpha = 3 \times 10^{-7}$) would be significatively reduced.

However, direct application of decision/detection limit concepts to SP-ICP-MS can produce misleading effects, even if the Poisson nature of the distributions is considered. It must bear in mind that pulse-counting ICP-MS signals assume only discrete values and follow Poisson behaviors, with distributions showing a significant asymmetry for signals below ca. 5 counts, whose statistical treatment is not straightforward [37]. Here, a threshold strategy for discrimination of particle/baseline readings, based on the use of the critical value Y_C as an a posteriori limit of decision, has been systematically studied and adapted to the ICP-MS signals produced in a variety of situations typical of SP-ICP-MS.

As a preliminary step, the standard deviation of the baseline signal was modelled according to the noise behavior described in Section 2.3. Fig. 2 shows that for the instrument used along this work, signal noise followed Eq. (5), with a flicker noise coefficient of 0.041 ± 0.004 ($n = 2$). Fig. 2 also shows that the Poisson behaviour of the baseline standard deviation is limited to low signal intensity values. Over ca.10 counts, standard deviation of the signals departed progressively from the ideal Poisson behaviour, been larger than the square root of the intensity. This overdispersion of experimental signals at large intensities values is clearly seen in Fig. 3, with a broadening with respect to the Poisson distribution of 5% for signals of ca. 50 counts, but increasing to > 40% for ca. 600 counts.

Eq. (5) reveals that a baseline distribution shows an overdispersion

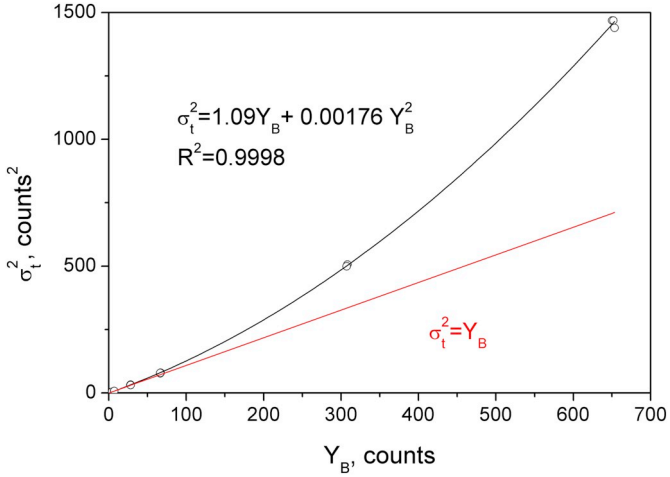


Fig. 2. SP-ICP-MS baseline noise behavior. Total noise (expressed as variance) vs. signal intensity. Black line: experimental measurements, red line: Poisson behavior. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

with respect to the expected Poisson profile depending on the magnitude of the signal. Thus, the expression for the calculation of the critical value (Eq. (1)) takes the form:

$$Y_C = Y_B + k\sqrt{Y_B + \xi^2 Y_B^2} \quad (6)$$

although for $Y_B \leq 10$, just the Poisson contribution can be considered:

$$Y_C = Y_B + k\sqrt{Y_B} \quad (7)$$

Alternatively, the critical value can be estimated from Eq. (1) by considering the experimental standard deviation calculated from the baseline measurements (σ_{exp}).

Because the decision detected/not detected at the critical value leads to a risk of false detection, depending on how this critical value is estimated, calculation of Y_C from an expression based on Eq. (1) involves to select a k factor to control the occurrence of false detection. Table 2 summarizes estimated critical values and occurrence of false positives as function of the k factor and the baseline intensity. Comparison of the second and third columns of Table 2 confirms that for $Y_B \leq 10$ the contribution of flicker noise can be considered negligible. Thus, critical values were calculated from Eq. (7) for $Y_B \leq 10$ and Eq. (6) for $Y_B > 10$, and rounded to the upper integer value. The number of false positives was determined from simulated discrete Poisson distributions for $Y_B \leq 10$, whereas for $Y_B > 10$ discrete Poisson-normal distributions were considered. Fig. 3 shows the simulated discrete distributions considered and the threshold criteria studied. Data from Table 3 confirms the contribution of flicker noise for signals over ca. 10 counts and their departure from pure Poisson behavior. With respect to the occurrence of false positives, the 3σ criterion is clearly insufficient to remove totally false positives, whereas the 4σ criterion fails at low signal intensities. On the other hand, the 5σ criterion removes false positives successfully at low signal intensities, although overestimating critical values at high signal intensities. Finally, the 8σ criterion eliminates completly false positives although overestimating the critical values in the whole intensity range. As it can be seen in Table 2, at very low mean signal intensities (below ca. 0.01 counts) critical values should be fixed at 1 count, ensuring the theoretical lack of false positives under this conditions. On the other hand, mean signals below ca. 1 counts did not show a clear influence of the threshold criterion because of the way discretization of the theoretical continuous distributions was performed (values of the dependent variable equal or higher than 1 were rounded to the closest integer, otherwise they were set at zero).

Table 3 shows the critical values and the occurrence of false positives obtained from ultrapure water and Ag(I) solutions of

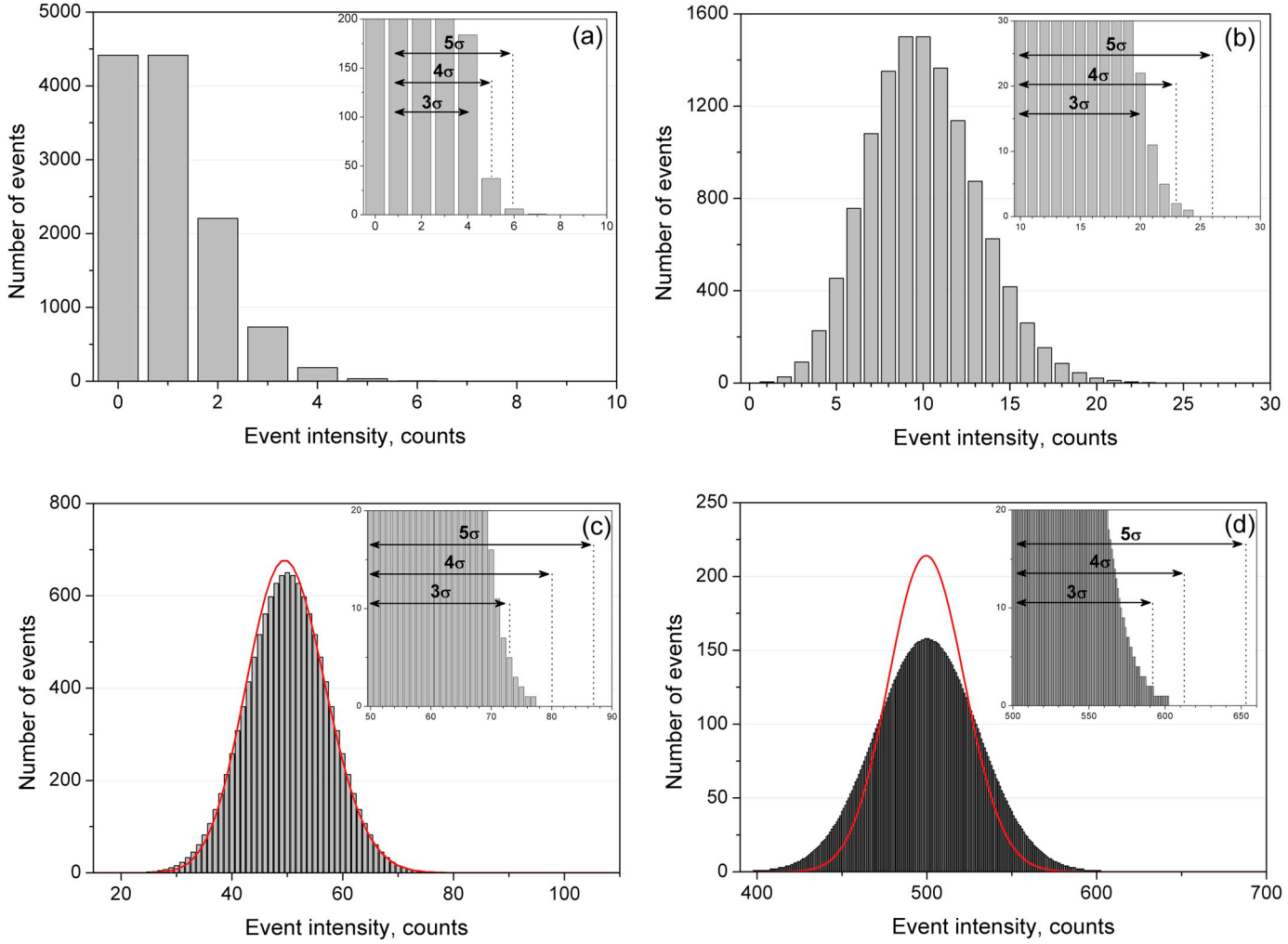


Fig. 3. Simulated baseline signal discrete distributions corresponding to (a) 1, (b) 10, (c) 50 and (d) 500 counts. Solid line: Theoretical Poisson-normal distribution.

concentrations up to 10 μg L^{-1}. Experimental results are compared with those obtained from simulated distribution calculated in a similar way than in Table 2. Results obtained allowed to confirm that a 5σ criterion guarantees the absence of false positives in the whole range of baseline intensities studied within the statistical uncertainty, justifying the use of the criterion even for high baseline intensities. As a rule of thumb, critical values calculated from Eqs. (1), (6) or (7) must be integers rounded to the upper value.

4.2. Detection of particles

Once a robust criterion for discrimination of particle events from the baseline of a SP-ICP-MS time scan is adopted, the detection of particles in a sample depends on the quality of the available blanks. As it has been stated in Section 2.2, if no particles are detected in the blank samples, the critical value for particle detection ($S_{C,N}$) would be zero and just the recording of one event higher than the signal intensity critical value (Y_C) in the time scan would confirm the presence of

Table 2
Theoretical estimation of baseline standard deviations (σ_t), critical values (Y_C) and false positives as function of baseline signal intensity and threshold criterion (simulation with 12,000 data). Values in parenthesis were not used for calculation.

Mean baseline signal	Calculated σ_t		Threshold criterion							
	$\sigma_t = \sqrt{Y_B}$	$\sigma_t = \sqrt{Y_B + \xi^2 Y_B^2}$	3σ		4σ		5σ		8σ	
(counts)	(counts)	(counts)	Y_c (counts) [a]	false positives	Y_c (counts) [a]	false positives	Y_c (counts) [a]	false positives	Y_c (counts) [a]	false positives
0.01	0.10	(0.10)	1	0	1	0	1	0	1	0
0.1	0.32	(0.32)	2	2	2	2	2	2	3	0
1	1.00	(1.00)	4	44	5	7	6	1	9	0
5	2.24	(2.25)	12	25	14	3	17	0	23	0
10	3.16	(3.19)	20	19	23	1	26	0	36	0
50	(7.07)	7.36	73	7	80	0	87	0	109	0
100	(10.00)	10.81	133	10	144	0	155	0	187	0
500	(22.36)	30.34	592	10	622	0	652	0	743	0

[a] Values rounded up to the closest integer.

Table 3
Experimental baseline standard deviations (σ_t), critical values (Y_C) and false positives as function of baseline signal intensity for a 5σ threshold criterion. Baseline signals corresponds to ultrapure water Ag(I) solutions from 0 to 10 μg L^{-1}. Uncertainty expressed as standard deviation of 3 replicates.

Mean baseline signal (counts)	Experimental σ_t (counts)	5σ criterion			
		Experimental		Calculated	
		Y_c (counts)	False positives	Y_c (counts)	False positives
0.05	0.24	2 ± 0	3 ± 2	2	0
0.25	0.51	4 ± 1	4 ± 4	3	2
1.12	1.05	7 ± 0	1 ± 2	7	0
1.47	1.25	8 ± 0	2 ± 2	8	0
6.96	2.72	21 ± 0	1 ± 1	21	0
28.04	5.63	57 ± 1	2 ± 1	56	0
66.30	8.88	112 ± 1	4 ± 4	111	0
308.15	23.14	420 ± 2	2 ± 1	419	0
646.52	38.21	841 ± 3	3 ± 4	841	0

particles in the sample. However, when particle events are detected in the blanks, Eq. (3) must be used for estimation of the critical value for particle detection.

Table 4 summarizes the critical values achieved for gold, silver and aluminium in ultrapure water and in a model blank food matrix (see experimental section). Except for aluminium in the food matrix, baseline signals were below 1 count (average of 10 measurements), showing the average measured standard deviations good agreement with the expected Poisson behaviour. Critical values for identification of particle events in the time scans were calculated from Eq. (1) with $k = 5$, being equal to 2 counts, except for aluminium in the food matrix because of the higher level of the baseline. After applying the 5σ threshold criterion, the occurence of particle events was below 10 and in most cases below 5 events. As it can be shown in Fig. 4, these events can be considered as false positives arising from the baseline itself and not to the presence of true particles in the blanks. The net critical values for detection of particles were calculated from Eq. (3), whereas gross critical values (Eq. (4)) were obtained by adding the mean number of particle events in the blank to the net value. In all cases, critical values were expressed as rounded up integers due to the discrete nature of the particle events. In general, only > 6 to 8 events were needed to confirm the presence of particles, except in the case of aluminium, where > 16 particle events should have been recorded.

4.3. Critical values: Quantitative connotations

The detection capability of a conventional analytical method is commonly presented in terms of signal and concentration domains, moving from the former to the latter by using the slope of the calibration curve. However, when coping with particles the results domain can involve number concentrations but also element mass per particle or size. By moving to these domains, a quantitative dimension to the critical values estimated in the previous sections can be achieved.

The critical value for the discrimination of baseline/particles events, described in terms of signal intensities (Eq. (1)), can be expressed in terms of the mass of element per particle (X_C^{mass}) or its size (X_C^{size}). In the former case:

$$X_C^{mass} = \frac{5\,\sigma_B}{K_{ICPMS} K_M} \tag{8}$$

where K_{ICPMS} is the detection efficiency, which represents the ratio of the number of ions detected versus the number of atoms of the isotope introduced into the ICP and K_M ($= AN_{Av}/M_M$) is a factor related to the element measured, where A is the atomic abundance of the isotope considered, N_{Av} the Avogadro number, and M_M the atomic mass of the element. When the particles are spherical and solid, the critical value can be expressed through the diameter of the particles, or an equivalent diameter if the actual morphology is unknown:

$$X_C^{size} = \left(\frac{3 \times 10^8\,\sigma_B}{\pi \rho F_P K_{ICPMS} K_M} \right)^{1/3} \tag{9}$$

where ρ is the density (g cm^{-3}), F_P the mass fraction of the element in the particle and the critical value is expressed in nanometers. The experimental standard deviation of the baseline, as well as $\sqrt{Y_B + \xi^2 Y_B^2}$ or $\sqrt{Y_B}$ can be use as estimate of σ_B in any case.

In the case of the critical value for the detection of particles, which has been described in terms of number of particle events (Eq. (3)), it can be expressed as particle number concentration (X_C^{number}) as:

$$X_C^{number} = \frac{2.33\,\sigma_{B,N}}{\eta Q_{sam} t_i} = \frac{2.33\,\sqrt{Y_{B,N}}}{\eta Q_{sam} t_i} \tag{10}$$

where η is the analyte transport efficiency, Q_{sam} the sample introduction flow rate (L s^{-1}) and t_i the total acquisition time (s). Derivation of Eqs. (8), (9) and (10) from Eq. (2) and (3) can be found in the supplementary material. Application of Eqs. (8)–(10) to the results of Table 4 implies that positive detection of particles would be restricted to samples containing more than ca. 200 particles per mililiter (2000 for aluminium in the food matrix) with sizes larger than around 25–30 nm for

Table 4
Critical values for baseline discrimination of particle events and detection of particles ultrapure water and food matrix for gold, silver and aluminium. Uncertainty expressed as standard deviation of 10 replicates.

		^{197}Au		^{107}Ag		^{27}Al	
		Ultrapure water	Food matrix	Ultrapure water	Food matrix	Ultrapure water	Food matrix
Baseline threshold							
Mean baseline signal	Y_B (counts)	0.105	0.093	0.054	0.070	0.106	2.251
Std. deviation (exp.)	σ_B (counts)	0.336	0.308	0.236	0.280	0.330	1.593
Std. deviation (theor.)	σ_B (counts)	0.323	0.305	0.232	0.265	0.326	1.500
Critical value	Y_C (counts)	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	11 ± 2
Size critical value [a]	$\boldsymbol{X_C^{size}}$ **(nm)**	**25**	**25**	**28**	**31**	**48**	**81**
Particle detection							
Mean blank particle events	$Y_{B,N}$ (events)	2.80	3.36	2.60	2.19	8.17	3.93
Std. deviation (exp.)	$\sigma_{B,N}$ (events)	1.62	2.90	1.43	1.50	2.89	2.10
Std. Deviation (theor.)	$\sigma_{B,N}$ (events)	1.67	1.83	1.61	1.48	2.86	1.98
Critical value	$Y_{C,N}$ (events)	7	8	7	6	16	8
Net critical value	$S_{C,N}$ (events)	4 ± 2	4 ± 2	4 ± 1	3 ± 1	7 ± 1	4 ± 2
Number conc. critical value	$\boldsymbol{X_C^{number}}$ **(L^{-1})**	$\mathbf{1.55 \times 10^5}$	$\mathbf{2.21 \times 10^5}$	$\mathbf{1.50 \times 10^5}$	$\mathbf{1.81 \times 10^5}$	$\mathbf{2.32 \times 10^5}$	$\mathbf{1.94 \times 10^5}$

[a] Diameter of metallic, spherical and solid particles.

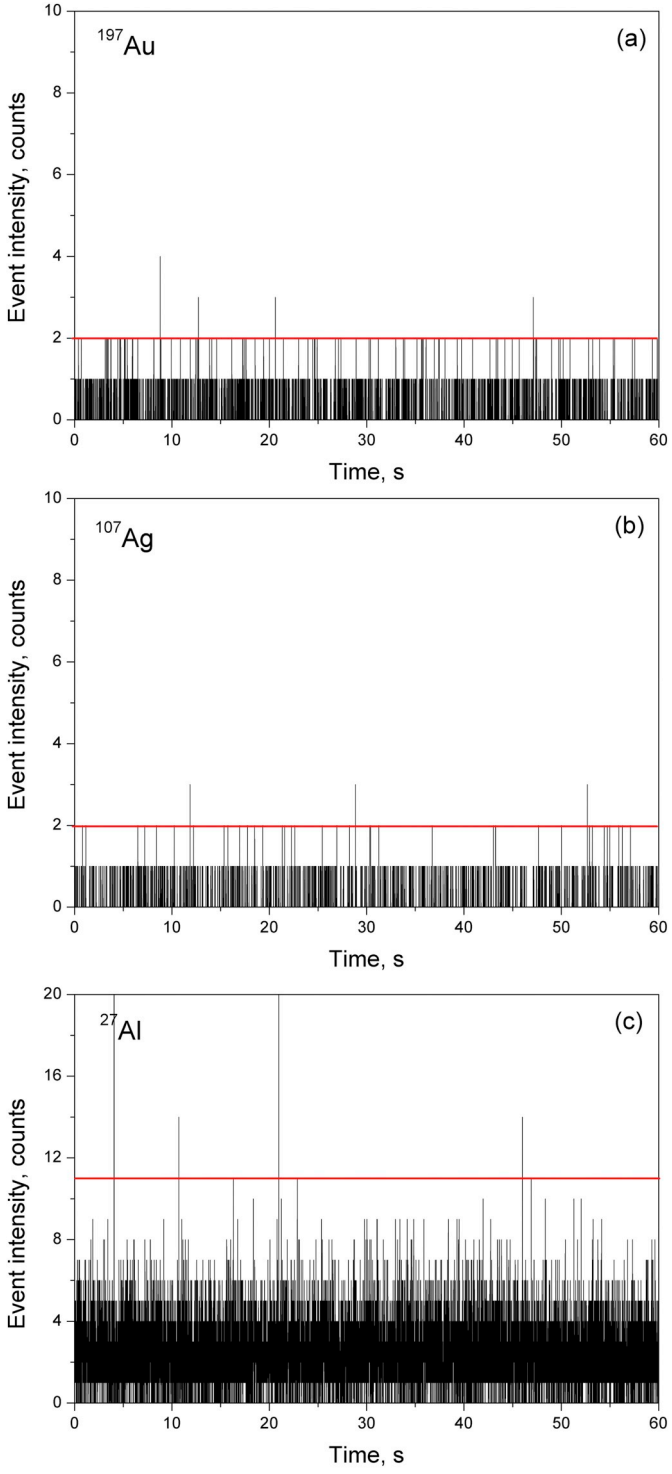


Fig. 4. Time scans of food matrix blanks for (a) gold, (b) silver and (c) aluminium. Red line: critical value for identification of particle events (5σ threshold criterion). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

gold and silver, but 90–150 nm for aluminium, under the instrumental conditions used in this work.

Qualitative screening methods are developed mostly for assessing a maximum permitted concentration level (threshold limit) [38], but they can also be used for assessing a minimum concentration level [39]. This later is the case for the assessment of the presence of particles, where just the occurrence of false positives is considered by using the critical values calculated from Eqs. (8) to (10). Additionally, when the detection is limited to nanoparticles, a size threshold limit can be established at 100 nm. As it has been discussed above, the proposed methodolgy would not be applicable for detection of metallic aluminium nanoparticles with the instrument used in this work.

Reduction of the size critical level involves: (i) an improvement of the ICP-MS sensitivity throught the improvement of the detection efficiency, which is inherent to the instrument itself, or (ii) the reduction of the baseline standard deviation, that can be achieved by reducing the baseline intensity working at shorter dwell times. In any case, the presence of dissolved species of the element present in the samples, contributes to raising the baseline levels, increasing the size critical values and hindering the detection of small particles. On the other hand, reduction of the number concentration critical value involves primarily the increase of the total acquisition time, because improvements in analyte transport efficiency usually implies a reduction of sample flow rate, cancelling out the effect.

4.4. Validation

In a first approximation, a screening method based on SP-ICP-MS for detecting the presence of particles in a sample should answer the question: Are there particles in the sample? However, the quantitative connotations of any instrumental qualitative method transform the question into: Are there particles over a certain size and concentration in the sample? In any case, validation of such method must include the assessment of a number of analytical performance parameters. Although there is not a unique approach for validation of conventional qualitative methods [39], a number of documents and reports have covered the topic [38,40–42] and recently Linsinger et al. have proposed a tentative approach for detection and quantification of nanoparticles in food [24]. In view of all these sources, the validation approach for SP-ICP-MS as screening method has included the assessment of the following performance parameters: limit of decision (critical value) according to particle number concentration and size, uncertainty region, false positive and false negative rates, sensitivity, specificity and selectivity.

The minimum number concentration level can be assesed by using the critical value or limit of decision calculated from Eq. (10), which is in agreement with [24,42]. Table 4 summarized the critical values obtained for the different elements studied in two different matrices, ultrapure water and the food matrix describe above. Similar critical values were obtained for the three elements in both matrices (ca. 2×10^5 L^{-1}). Because of the special connotations of particles as analytes, their positive detection is related to their presence over a number concentration critical value, but also over a size critical value that must also be quoted. Size critical values obtained for the elements studied are presented in Table 4 and have been discussed in a previous paragraph.

Specific performance parameters in qualitative analysis can be evaluated in different ways [43]. In this study, performance characteristic curves were used to study the uncertainty region, whereas false positive and false negative rates, sensitivity and specificity were evaluated through contingency tables.

Performance characteristic curves were obtained by plotting the percentage of positive detection versus the concentration of particles. The curve defines an uncertainty region in which false responses (either false positive or false negative) are obtained, being conceptually equivalent to the uncertainty interval around a predicted value in quantitative analysis [43,44]. The uncertainty region was defined as the interval from the number concentration corresponding to the critical value, where the false positive rate is 5%, to the number concentration where the false negative rate is 5% (95% true positive rate). Fig. 5 shows the curves obtained for gold and silver nanoparticles at number concentration levels around the number concentration critical value and for a particle size well over the size critical value (100 nm). The uncertainty region associated to the size was not performed because of

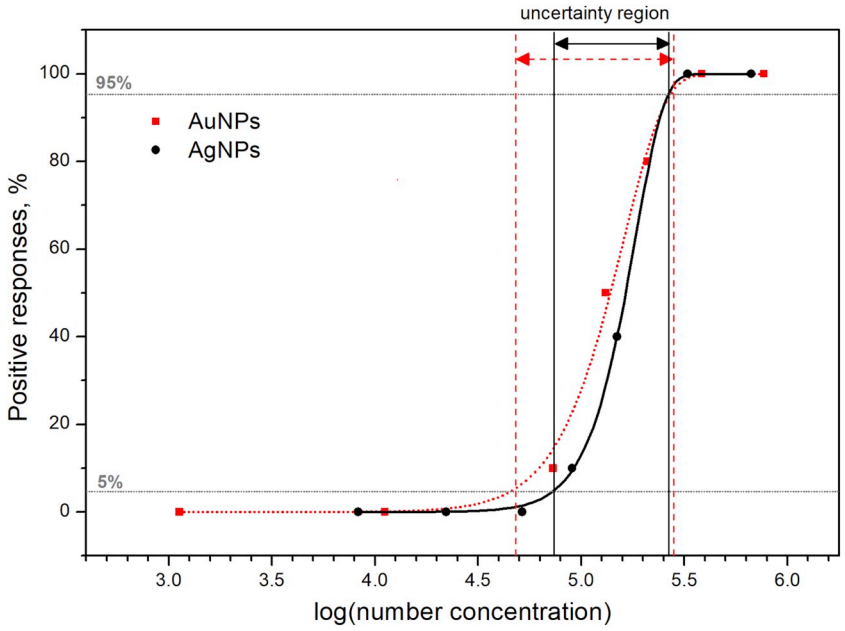


Fig. 5. Uncertainty regions of SP-ICP-MS as qualitative screening method for particle detection. Performance characteristic curves for gold (red dashed line) and silver (black solid line) nanoparticles. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the unavailability of true monodispersed size nanoparticle standards. The curves were built by measuring 10 times gold and silver 100 nm nanoparticle suspensions in the number concentration range 10^3–10^6 L^{-1}, and calculating the percentage of positive responses, where a positive response implies a test sample in which the number of particle events detected is equal or higher than the critical value $Y_{C,N}$ (Eq. (4)). Experimental results were fitted to a sigmoid function and the limits of the uncertainty region obtained at 95 and 5% of positive results. The results obtained reveal that the uncertainty region of the screening method covered a range from 5×10^4 L^{-1} to 3×10^5 L^{-1}, roughly one order of magnitude, and it could be considered independent of the composition of the particles.

Contingency tables were built by using the data from the performance characteristic curves of silver and gold nanoparticles (data included in the supplementary material). Table 5 shows the performace parameters calculated from the contingency tables (calculation expressions are summarized in the supplementary material). Sensitivity in qualitative analysis refers to the ability of the method to recognise truly positive test samples, being directly related to the true positive responses, whereas specificity is the ability of a method to detect truly negative test samples, being directly related to the true negative responses [40]. On the other hand, false positive and false negative rates assess, respectively, the probability that a test sample is a known negative, given that the test sample has been classified as positive by the method and viceversa. These parameters complement specificity and sensitivity, respectively. The SP-ICP-MS method showed a specificity better than 95%, whereas sensitivity was about 80%, meaning that the method is more reliable for the identification of test samples containing particles at number concentrations below the critical value, producing a low rate of false positives.

Table 5
Performance parameters for the detection of particles by SP-ICP-MS.

	AgNPs	AuNPs	average
Sensitivity (%)	80.0	82.5	81.3
Specificity (%)	97.5	96.7	97.1
False positive rate (%)	2.5	3.3	2.9
False negative rate (%)	20.0	17.5	18.8
Uncertainty region (L^{-1})	7×10^4-3×10^5	5×10^4-3×10^5	6×10^4-3×10^5

Selectivity relates to “the extent to which a method can be used to determine particular analytes in mixtures or matrices without interferences from other components of similar behaviour” [45]. Selectivity should be checked against matrix constituents, other type of particles and to different varieties of the same type of particles (e.g., different coatings) [24]. Due to the element-specific response of ICP-MS, SP-ICP-MS is selective to particles containing specific elements regardless of their chemical nature, that is silver-bearing particles are detected as such, regardless they are metallic silver or silver oxide particles. With respect to variations in the same type of particle, once the particle is large enough to be detected, SP-ICP-MS is not selective to other properties of the particle, like shape or surface charge. Thus, just selectivity against other matrix constituents was checked by analyzing a number of matrix blank samples consisting in candy beads not coated with metallic additives. Table 4 summarizes results obtained for ultrapure water and food matrix blanks. For gold and silver no significant effects were observed due to the food matrix. For aluminium, the matrix contribution was related to the presence of a higher amount of dissolved aluminium (higher baseline level), which had no effect on selectivity but did affect the critical values for size and number concentration, as it has been discussed above.

4.5. Screening applications of SP-ICP-MS

The developed approach for detection of particles by SP-ICP-MS was applied to the screening of food samples containing metallic additives. Three metals are approved by the European Commission as food additives to be used to colour the external coating of confectionery: Aluminium (E173), silver (E174) and gold (E175) [46]. The safety of silver and gold as food additives has been re-evaluated recently by the European Food Safety Authority (EFSA) [47,48], recommending that information about particle size and percentage (in number) of particles in the nanoscale should be included in the specification of these food additives when present in powder forms.

Two types of food samples were studied in relation with the presence or the release of metallic particles. The first type consisted of decoration dusting powders for golden or silver finishes. The two products analyzed declared in their labels to contain E175 (gold) and E174

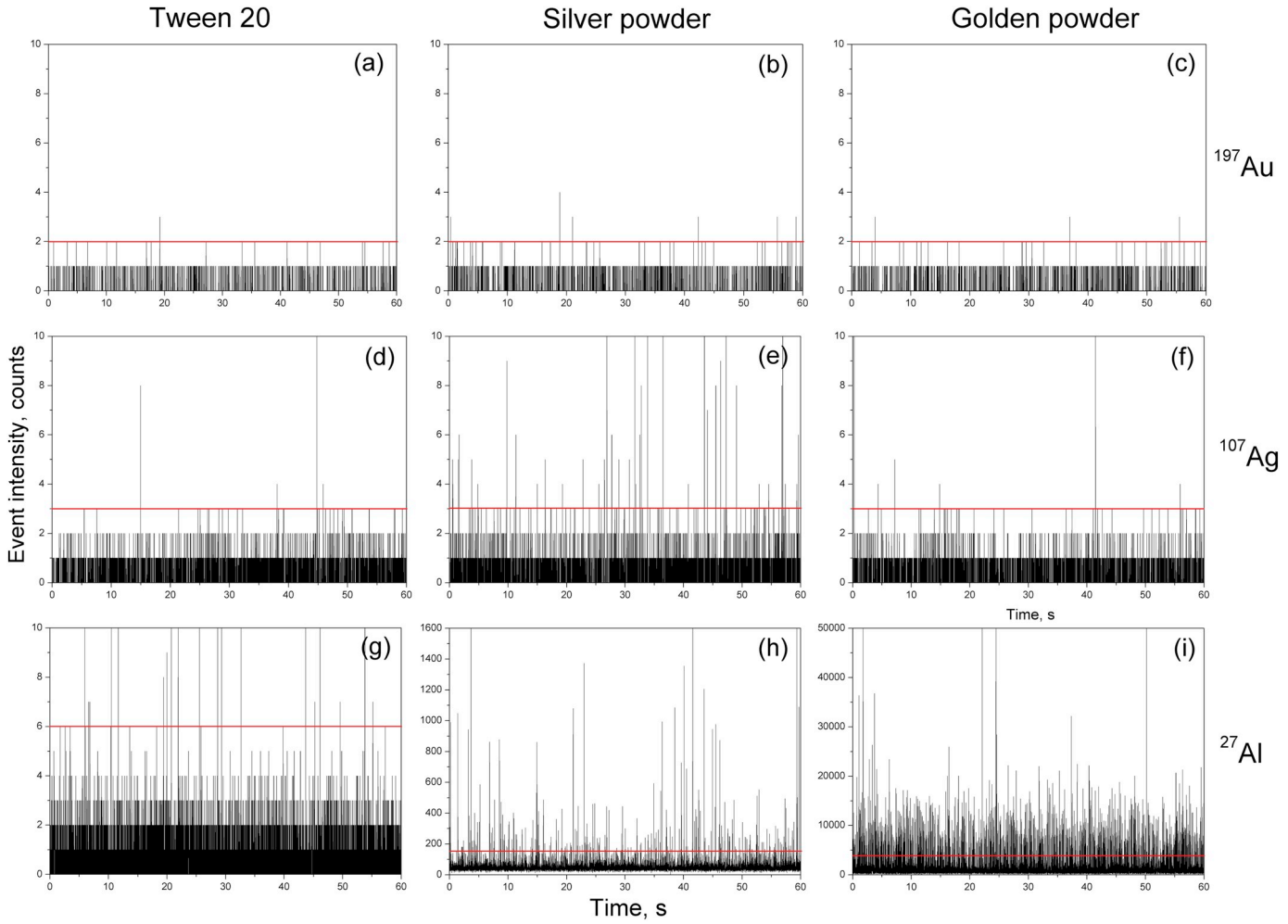


Fig. 6. SP-ICP-MS time scans of blanks (0.1% Tween 20) and silver and golden powders used for decorating confectionery.

(silver) additives, respectively, in addition to mica and other components. The second type consisted of silvery coated candy beads used for cake decoration, containing E174 (silver) or E173 (aluminium) in addition to other ingredients.

Due to the hydrophobicity of the dusting powders, stable suspensions were prepared in 0.1% (v/v) Tween 20 and centrifuged to remove particles over ca. 1 μm, as described in the experimental section. Suspension were analyzed directly by SP-ICP-MS to detect the presence of particles containing gold, silver or aluminium. Fig. 6 shows representative time scans from blanks and sample suspensions. Gold particles were not detected in the samples analyzed, whereas a small amount of silver particles were detected in the silver powder. All the samples contained significant amounts of aluminium bearing particles, corresponding to the mica (potassium aluminium silicate) declared in the labels (E555).

The results obtained reveal that, in spite of the labelling of both products, no gold or silver were present in the golden powder, whereas the content of silver-bearing particles was extremely low in the silver powder, accounting for $< 3\ \mathrm{ng\ g^{-1}}$.

With respect to the candy beads, the metallic coating containing the additive was released as heterogeneous fragments when the beads were placed in water. Samples were prepared according to the procedure described in the experimental section and the resulting suspensions analyzed for detection of released particles containing silver or aluminium. Fig. 7 shows time scans of the samples analyzed, which can be compared with the corresponding blanks in Fig. 4. In each case, silver and aluminium particles were detected, confirming the release of particles from the coatings. On the other hand, the raising of the baseline in relation to the blanks confirmed the presence of dissolved forms of silver and aluminium. For this reason, the size critical values obtained (red line in Fig. 7) were higher than those presented previously, with values of 66 and 97 nm for silver and aluminium, respectively. A 100 nm threshold (green line in Fig. 7a) was stablished for silver, confirming that most of the particles detected were over the threshold. As it has been stated above, the implementation of this screening method with a state-of-the-art instrument, working at dwell times of 0.1 ms or less would reduce the size critical values, improving the detection of smaller particles.

5. Conclusions

SP-ICP-MS was evaluated as a qualitative method for the assessment of the presence or absence of particles containing specific elements in a sample. This assessment involves first the identification of particle event in the SP-ICP-MS time scans, followed by the analysis of the appropriate blank samples. Because of the qualitative nature of the pursued information, the concept of critical value as a posteriori limit of decision has been selected. Although different criteria have been proposed for the identification of particle events over the baseline of a SP-ICP-MS scan, critical values based on the 5σ criterion (σ: standard deviation of the baseline) proved to remove or minimize the risk of false positives (baseline events considered as particle events) without compromising the detection of small particles. On the other hand, the occurrence of particle events in the blanks limits the capability of SP-ICP-

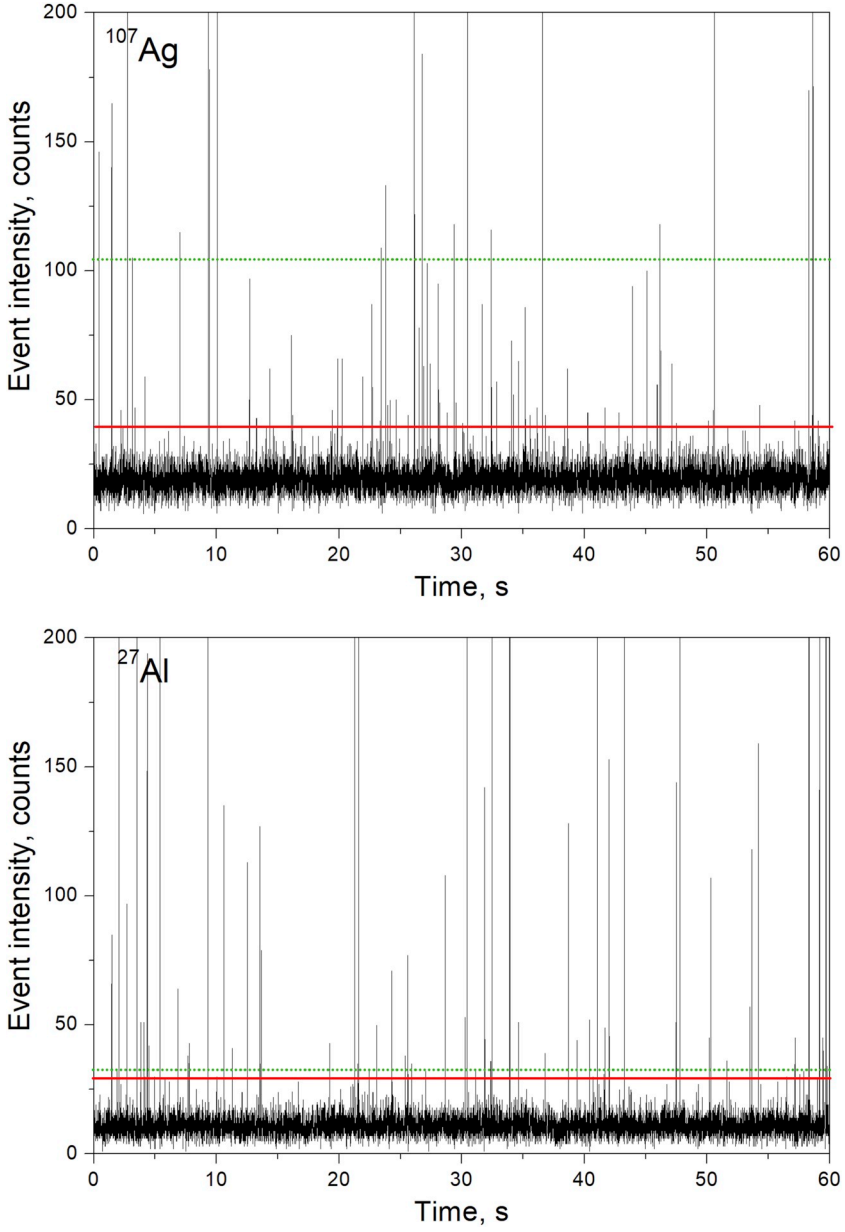


Fig. 7. SP-ICP-MS times scans from silvery coated candy beads containing (a) silver (E174) and (b) aluminium (E173) food additives. Red solid line: size critical value (66 and 97 nm for silver and aluminium, respectively). Green dashed line: 100 nm size threshold. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

MS for confirming the presence of particles in a sample. Thus a criterion of the type 2.33σ, where σ corresponds to the standard deviation associated to the particles counted in the blanks, was proposed because of the paired nature of these SP-ICP-MS measurements.

The approach presented here is suitable of being implemented or adapted to any ICP-MS instrument measuring in single particle mode. Additional advantages of using state-of-the-art instruments, like fast scanning quadrupole ICP-MS, lies in the option of using short dwell times in the microsecond range, reducing the magnitude of the baseline intensity and improving the detection of smaller particles, which is particularly important when dissolved species of the element measured coexist with the particles.

Detection, identification and quantitation of (nano)particles in a variety of samples still remains an analytical challenge. (Nano)particles as analytes, entails an extra level of complexity with respect to conventional analytes, specially in ICP-MS, where the counting nature of their measurements overlap with the process of counting the particles themselves. In any case, with SP-ICP-MS developing as a reliable analytical methodology, validation of SP-ICP-MS methods becomes the next crucial step, as well as the setting up of the criteria applied to such validation schemes. Harmonization of these criteria is certainly a pending challenge of the SP-ICP-MS community.

Declaration of Competing Interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and the European Regional Development Fund, project CTQ2015-68094-C2-1-R (MINECO/FEDER), and Government of Aragón and FEDER 2014-2020 “Construyendo Europa desde Aragón”, project E29_17R.

The authors would like to acknowledge the use of Servicio General de Apoyo a la Investigación-SAI, Universidad de Zaragoza, for ICP-MS measurements.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.sab.2019.105654.

References

[1] M.D. Montaño, J.W. Olesik, A.G. Barber, K. Challis, J.F. Ranville, Single particle ICP-MS: advances toward routine analysis of nanomaterials, Anal. Bioanal. Chem. 408 (2016) 5053–5074, https://doi.org/10.1007/s00216-016-9676-8.

[2] F. Laborda, E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry for the analysis of inorganic engineered nanoparticles in environmental samples, Trends Environ. Anal. Chem. 9 (2016) 15–23, https://doi.org/10.1016/j.teac.2016.02.001.

[3] F. Laborda, E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: a powerful tool for nanoanalysis, Anal. Chem. 86 (2014) 2270–2278, https://doi.org/10.1021/ac402980q.

[4] R. Peters, Z. Herrera-Rivera, A. Undas, M. van der Lee, H. Marvin, H. Bouwmeester, S. Weigel, Single particle ICP-MS combined with a data evaluation tool as a routine technique for the analysis of nanoparticles in complex matrices, J. Anal. At. Spectrom. 30 (2015) 1274–1285, https://doi.org/10.1039/C4JA00357H.

[5] Nanocount, http://blogg.slu.se/Nanocount , Accessed date: January 2019.

[6] K.E. Murphy, J. Liu, A.R. Montoro Bustos, M.E. Johnson, M.R. Winchester, Characterization of nanoparticle suspensions using single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, NIST Special Publication-1200-2, 2015, https://doi.org/10.6028/NIST.SP.1200-21.

[7] ISO/TS 19590:2017, Nanotechnologies — Size Distribution and Concentration of Inorganic Nanoparticles in Aqueous Media Via Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, International Organization of Standarization, Geneve, 2017.

[8] A. Hineman, C. Stephan, Effect of dwell time on single particle inductively coupled plasma mass spectrometry data acquisition quality, J. Anal. At. Spectrom. 29 (2014) 1252–1257, https://doi.org/10.1039/c4ja00097h.

[9] P.N. Shaw, A. Donard, Nano-particle analysis using dwell times between 10μs and 70μs with an upper counting limit of greater than 3x10 7 cps and a gold nanoparticle detection limit of less than 10nm diameter, J. Anal. At. Spectrom. (2016) 1234–1242, https://doi.org/10.1039/C6JA00047A.

[10] O. Borovinskaya, B. Hattendorf, M. Tanner, S. Gschwind, D. Günther, A prototype of a new inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometer providing temporally resolved, multi-element detection of short signals generated by single particles and droplets, J. Anal. At. Spectrom. 28 (2013) 226–233, https://doi.org/10.1039/c2ja30227f.

[11] F. Laborda, E. Bolea, G. Cepriá, M.T. Gómez, M.S. Jiménez, J. Pérez-Arantegui, J.R. Castillo, Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: a review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples, Anal. Chim. Acta 904 (2016) 10–32, https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.11.008.

[12] B. Meermann, V. Nischwitz, ICP-MS for the analysis at the nanoscale – a tutorial review, J. Anal. At. Spectrom. 33 (2018) 1432–1468, https://doi.org/10.1039/C8JA00037A.

[13] S. Weigel, R. Peters, K. Loeschner, R. Grombe, T.P.J. Linsinger, Results of an interlaboratory method performance study for the size determination and quantification of silver nanoparticles in chicken meat by single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry (sp-ICP-MS), Anal. Bioanal. Chem. 409 (2017) 4839–4848, https://doi.org/10.1007/s00216-017-0427-2.

[14] T.P.J. Linsinger, R. Peters, S. Weigel, International interlaboratory study for sizing and quantification of Ag nanoparticles in food simulants by single-particle ICPMS, Anal. Bioanal. Chem. 406 (2014) 3835–3843, https://doi.org/10.1007/s00216-013-7559-9.

[15] C. Degueldre, P.-Y. Favarger, Colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectroscopy: a feasibility study, Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 217 (2003) 137–142, https://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00568-X.

[16] K. Loeschner, M. Correia, C. López Chaves, I. Rokkjær, J.J. Sloth, Detection and characterisation of aluminium-containing nanoparticles in Chinese noodles by single particle ICP-MS, Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess. 35 (2018) 86–93, https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1382728.

[17] R.J.B. Peters, G. van Bemmel, N.B.L. Milani, G.C.T. den Hertog, A.K. Undas, M. van der Lee, H. Bouwmeester, Detection of nanoparticles in Dutch surface waters, Sci. Total Environ. 621 (2018) 210–218, https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.238.

[18] B. Kollander, F. Widemo, E. Ågren, E.H. Larsen, K. Loeschner, Detection of lead nanoparticles in game meat by single particle ICP-MS following use of lead-containing bullets, Anal. Bioanal. Chem. 409 (2017) 1877–1885, https://doi.org/10.1007/s00216-016-0132-6.

[19] M.A. Gomez-Gonzalez, E. Bolea, P.A. O'Day, J. Garcia-Guinea, F. Garrido, F. Laborda, Combining single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry and X-ray absorption spectroscopy to evaluate the release of colloidal arsenic from environmental samples, Anal. Bioanal. Chem. 408 (2016) 5125–5135, https://doi.org/10.1007/s00216-016-9331-4.

[20] J. Farkas, H. Peter, P. Christian, J.A. Gallego Urrea, M. Hassellöv, J. Tuoriniemi, S. Gustafsson, E. Olsson, K. Hylland, K.V. Thomas, Characterization of the effluent from a nanosilver producing washing machine, Environ. Int. 37 (2011) 1057–1062, https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.03.006.

[21] Y. Echegoyen, C. Nerín, Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers, Food Chem. Toxicol. 62C (2013) 16–22, https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.08.014.

[22] I. Abad-Alvaro, E. Bolea, F. Laborda, J.R. Castillo, An ICP-MS-based platform for release studies on silver-based nanomaterials, J. Anal. At. Spectrom. 32 (2017) 1101–1108, https://doi.org/10.1039/C7JA00059F.

[23] I. de la Calle, M. Menta, M. Klein, F. Séby, Screening of TiO2 and au nanoparticles in cosmetics and determination of elemental impurities by multiple techniques (DLS, SP-ICP-MS, ICP-MS and ICP-OES), Talanta. 171 (2017) 291–306, https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.05.002.

[24] T.P.J. Linsinger, Q. Chaudhry, V. Dehalu, P. Delahaut, R. Grombe a Dudkiewicz, F. von der Kammer, E.H. Larsen, S. Legros, K. Loeschner, R. Peters, R. Ramsch, G. Roebben, K. Tiede, S. Weigel, Validation of methods for the detection and quantification of engineered nanoparticles in food, Food Chem. 138 (2013) 1959–1966, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.074.

[25] M. Valcárcel, S. Cárdenas, M. Gallego, Qualitative analysis revisited, Crit. Rev. Anal. Chem. 30 (2000) 345–361, https://doi.org/10.1080/10408340008984164.

[26] L.A. Currie, Limits for qualitative detection and quantitative determination: application to radiochemistry, Anal. Chem. 40 (1968) 586–593, https://doi.org/10.1021/ac60259a007.

[27] F. Laborda, J. Medrano, J.R. Castillo, Quality of quantitative and semiquantitative results in inductively coupled plasma mass spectrometry, J. Anal. At. Spectrom. 16 (2001) 732–738, https://doi.org/10.1039/b101814k.

[28] A. Gundlach-Graham, L. Hendriks, K. Mehrabi, D. Günther, Monte Carlo simulation of low-count signals in time-of-flight mass spectrometry and its application to single-particle detection, Anal. Chem. 90 (2018) 11847–11855, https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01551.

[29] RIKILT, Single Particle calculation Tool, https://www.wur.nl/en/show/Single-Particle-Calculation-tool.htm , Accessed date: January 2019.

[30] H.E. Pace, N.J. Rogers, C. Jarolimek, V.A. Coleman, C.P. Higgins, J.F. Ranville, Determining transport efficiency for the purpose of counting and sizing nanoparticles via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, Anal. Chem. 83 (2011) 9361–9369, https://doi.org/10.1021/ac201952t.

[31] F. Laborda, J. Jiménez-Lamana, E. Bolea, J.R. Castillo, Critical considerations for the determination of nanoparticle number concentrations, size and number size distributions by single particle ICP-MS, J. Anal. At. Spectrom. 28 (2013) 1220–1232, https://doi.org/10.1039/c3ja50100k.

[32] J. Tuoriniemi, G. Cornelis, M. Hassellöv, Size discrimination and detection capabilities of single-particle ICPMS for environmental analysis of silver nanoparticles, Anal. Chem. 84 (2012) 3965–3972, https://doi.org/10.1021/ac203005r.

[33] J. Tuoriniemi, G. Cornelis, M. Hassellöv, A new peak recognition algorithm for detection of ultra-small nano-particles by single particle ICP-MS using rapid time resolved data acquisition on a sector-field mass spectrometer, J. Anal. At. Spectrom. 30 (2015) 1723–1729, https://doi.org/10.1039/C5JA00113G.

[34] K. Loeschner, M.S.J. Brabrand, J.J. Sloth, E.H. Larsen, Use of alkaline or enzymatic sample pretreatment prior to characterization of gold nanoparticles in animal tissue by single-particle ICPMS, Anal. Bioanal. Chem. 406 (2014) 3845–3851, https://doi.org/10.1007/s00216-013-7431-y.

[35] M. Hadioui, C. Peyrot, K.J. Wilkinson, Improvements to single particle ICPMS by the online coupling of ion exchange resins, Anal. Chem. 86 (2014) 4668–4674, https://doi.org/10.1021/ac5004932.

[36] J. Tuoriniemi, G. Cornelis, M. Hassellöv, Improving the accuracy of single particle ICPMS for measurement of size distributions and number concentrations of nanoparticles by determining analyte partitioning during nebulisation, J. Anal. At. Spectrom. 29 (2014) 743, https://doi.org/10.1039/c3ja50367d.

[37] L.A. Currie, On the detection of rare, and moderately rare, nuclear events, J. Radioanal. Nucl. Chem. 276 (2008) 285–297, https://doi.org/10.1007/s10967-008-0501-5.

[38] M. Valcárcel, S. Cárdenas, D. Barceló, L. Buydens, K. Heydorn, B. Karlberg, K. Klemm, B. Lendl, B. Milman, B. Neidhart, A. Ríos, R. Stephany, A. Townshend, A. Zschunke, Metrology of Qualitative Chemical Analysis: Project Report EUR 20605, BCR Information ed. European Commission, Luxembourg, 2002.

[39] E. Trullols, I. Ruisanchez, F.X. Rius, Validation of qualitative analytical Methods, Trends Anal. Chem. 23 (2004) 137–145, https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01104-X.

[40] M.P. Callao, I. Ruis, M.L. Isabel, A tutorial on the validation of qualitative methods: from the univariate to the multivariate approach, Anal. Chim. Acta 891 (2015) 62–72, https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.06.032.

[41] B. Magnusson, U. Örnemark, Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Eurachem, (2014).

[42] Official Journal of the European Communities, COMMISSION DECISION of 12 August 2002 Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results, (2002).

[43] A. Pulido, I. Ruisánchez, R. Boqué, F.X. Rius, Uncertainty of results in routine qualitative analysis, TrAC Trends Anal. Chem. 22 (2003) 647–654, https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01104-X.

[44] S.L.R. Ellison, Uncertainties in qualitative testing and analysis, Accred. Qual. Assur. 5 (2000) 346–348, https://doi.org/10.1007/s007690000212.

[45] J. Vessman, R.I. Stefan, J.F. van Staden, K. Danzer, W. Lindner, D.T. Burns, A. Fajgelj, H. Müller, Selectivity in analytical chemistry, Pure Appl. Chem. 73

(2001) 1381–1386, https://doi.org/10.1351/pac200173081381.
[46] Official Journal of the European Communities, COMMISSION REGULATION (EU) No 1129/2011of 11 November 2011 Amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by Establishing a Union List of Food Additives, (2011).
[47] EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food, Scientific opinion on the re-evaluation of silver (E 174) as food additive, EFSA J. 14 (2016) 4364, https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4364.
[48] EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food, Scientific opinion on the re-evaluation of gold (E 175) as a food additive, EFSA J. 14 (2016) 4362, https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4362.

Spectrochimica Acta Part B 169 (2020) 105883

Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/sab

About detectability and limits of detection in single particle inductively coupled plasma mass spectrometry

Francisco Laborda*, Ana C. Gimenez-Ingalaturre, Eduardo Bolea, Juan R. Castillo

Group of Analytical Spectroscopy and Sensors (GEAS), Institute of Environmental Sciences (IUCA), University of Zaragoza, Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Single particle detection
ICP-MS
Limit of detection
Critical value
Nanoparticle

ABSTRACT

Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS) offers unique features for the detection of particles, as well as for their quantification and size characterization. The detection capabilities of SP-ICP-MS are therefore not only limited to the concentration domains (of particles and dissolved related species), but also to the mass of element per particle and particle size domains. Discrimination and detection of particle events, based on the use of robust limits of decision (also known as critical values), and the estimation of the limits of detection in the different domains, require standardized metrological approaches that have not been clearly established yet. As a consequence, harmonized approaches and expressions to allow reliable comparisons between methods and instruments, as well as to process SP-ICP-MS data, are required. This paper is an attempt to summarize and review the different approaches applied up to now in relation to the detectability in SP-ICP-MS, and highlight the peculiarities of this topic in SP-ICP-MS. A holistic approach with criteria and expressions for the estimation of the different critical values and limits of detection in terms of the different instrumental and experimental parameters involved is proposed. Additionally, a calculation tool for estimating and predicting critical values and limits of detection under different experimental conditions is also included.

1. Introduction

The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the analysis of particles on a particle-by-particle basis has led to the development of a technique commonly referred as single particle ICP-MS (SP-ICP-MS). Although its origins can be traced back to the previous century [1,2], a seminal paper by Degueldre and Favarger in 2003 [3] outlined the principles behind SP-ICP-MS and showed the feasibility of using ICP-MS for the analysis of colloids. However, the driving force that explain the rapid evolution of the techique from 2011 has been its application to the analysis of nanoparticles [4,5], along with the new developments in commercial ICP-MS instruments and software in recent years [6–8]. The success of SP-ICP-MS lies in its unique features for the detection, characterization and quantification of particles in liquid suspensions, which have been discussed in a number of reviews [1,2,9,10].

SP-ICP-MS, like any other analytical methodology, has limited detection capabilities. Because of the different types of information that it can provide [9], these capabilities are related to concentrations, but also to mass of element per particle (and particle size when additional informations about shape, composition and density of the particles are available). Moreover, concentration information not only involves particle number, but also mass concentration of dissolved species. As a consequence, all these detection capabilities of SP-ICP-MS should be expressed quantitatively as the corresponding limits of detection (LOD).

Although the usefulness of LODs have been questioned by some authors [11,12], they are considered a fundamental metrological parameter and they have been defined by IUPAC [13] and ISO [14] for quantitative methods. LODs are used both for characterizing and validating analytical methods. Additionally, instrumental LODs are commonly used as figures of merit designed to quantify the detection capability of the purely instrumental aspect of an analytical method [15]. In spite of its broad use, LODs remain a complex topic and some confusion exists around them, which is the result of the different approaches available for their estimation [16]. This is also the case in SP-ICP-MS, although aggravated by the following facts: (i) SP-ICP-MS is a counting technique, governed by Poisson statistics, with respect to the signals (counted ions) and the particles as well; (ii) blanks and baseline levels can be very close to zero; (iii) in a typical measurement process, the occurrence of baseline events is larger than that of particles (at least one order of magnitude); and (iv) both concentration and size (or mass of element per particle) LODs must be considered. In spite of the complexity of the problem, and for the shake of simplicity, the estimation of the different types of LODs in most of the SP-ICP-MS

* Corresponding author.
E-mail address: flaborda@unizar.es (F. Laborda).

https://doi.org/10.1016/j.sab.2020.105883
Received 28 November 2019; Received in revised form 14 May 2020; Accepted 18 May 2020
Available online 27 May 2020
0584-8547/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

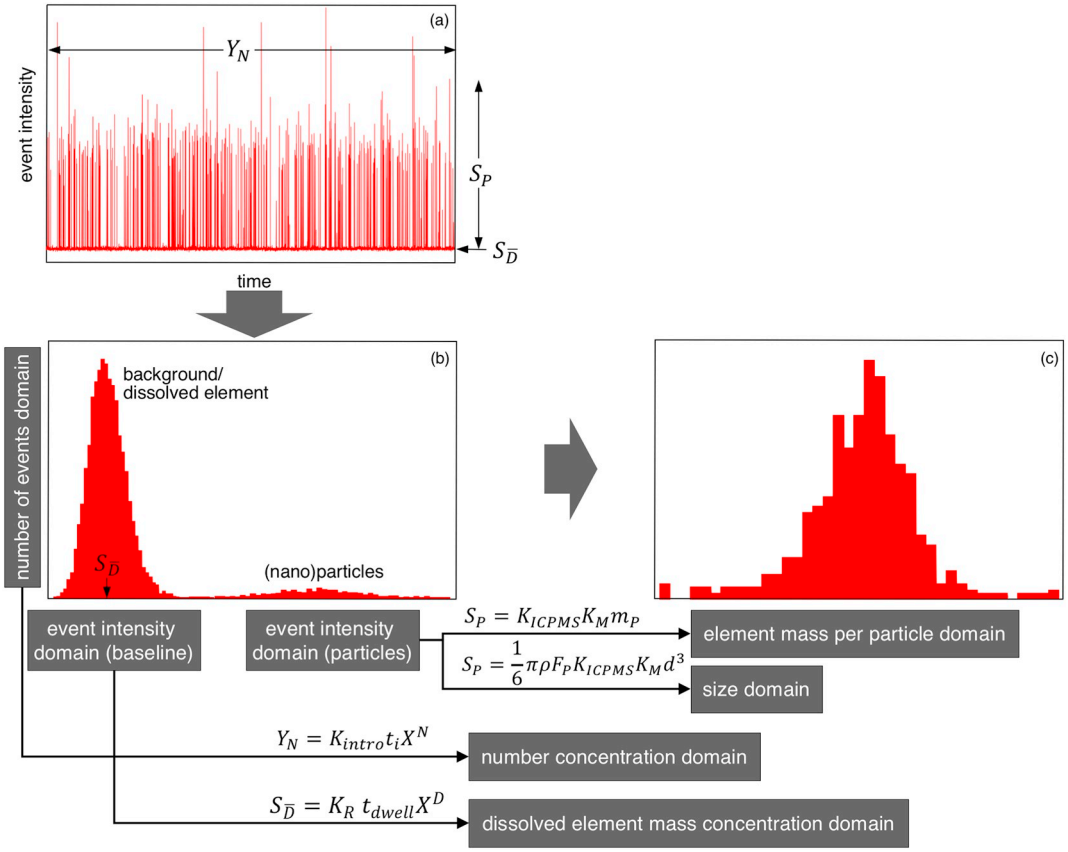


Fig. 1. Domains and transformations involved in SP-ICP-MS. (a) Time scan of a particle suspension containing dissolved forms of the element contained in the particles. (b) Event intensity frequency histogram of data from (a). (c) Size (or element mass per particle) distribution of nanoparticles calculated from the second intensity distribution in (b).

publications are based on the conventional IUPAC approaches for concentration LODs, although with different interpretations depending on the authors, causing certain level of confusion. This has been also the case with the discrimination and detection of particles in relation with the processing of SP-ICP-MS raw data or the screening of samples for the assessment of the presence/absence of particles, where limits of decision (also known as critical values) must be used. In this regard, just a limited number of publications have partially addressed these issues, adapting the conventional LOD approaches to the peculiarities of SP-ICP-MS [17–20].

The aims of this article are to review critically the different approaches applied in relation to the detectability issues in SP-ICP-MS and to present a holistic approach to the topic, considering all the special features of this technique. It should be considered as an attempt to open an harmonization process about detectability and limits of detection in SP-ICP-MS. An updated summary of limits of detection achievable with commercial quadrupole ICP-MS instruments has been included as well as a calculation tool for their determination and prediction under different experimental conditions.

2. Overview of the concentration LOD concept

The concept and approaches for estimation of concentration LODs have been discussed in a number of comprehensive reviews [21,22] and the references therein. In a broad sense, a concentration LOD is defined as the lowest concentration of an analyte that can be detected with a stated reasonable uncertainty. Intuitively, this concentration corresponds to the lowest signal obtained from a sample containing analyte that is significantly different from the blank signal, which has been obtained from a sample containing no analyte. The most widely used approach for estimation of concentration LODs was developed by Currie [23], both for normal and Poisson distributed data, and it is based on the hypothesis testing theory and the occurrence and control of false positives and false negatives.

The limit of detection is the value at which a given analytical method may be relied upon to lead to detection, and is defined a priori, being used to select or compare methods. Once the method is being used, the limit of detection should not play any role in the detection decision, since this is taken once the result of the measurement is known, that is, a posteriori. In fact, it is the critical value, also known as the limit of decision, the parameter to be use for deciding a posteriori whether or not the result of an analysis indicates detection [23].

The concepts and expression related to critical values and LODs to be considered along this review are summarized in the supplementary material.

3. ICP-MS and SP-ICP-MS signals

Although the theoretical basis of single particle detection applied to ICP-MS was outlined by Degueldre et al. [3] for nanoparticle suspensions continuously introduced through conventional nebulization systems, a unified approach to support the expressions used in the different domains covered by SP-ICP-MS is presented in this section.

The relationship between the signal Y_R (ions counted per time unit) and the mass concentration of an element M (X^M), which is nebulized into an ICP-MS can be expressed as [1,17]:

$$Y_R = K_R\, X^M = K_{intro}\, K_{ICPMS} K_M X^M \quad (1)$$

where K_R is the analytical sensitivity obtained from a conventional calibration (signal intensity in cps vs. element mass concentration); $K_{intro}(=\eta Q_{sam})$ is a factor related to the sample introduction, with η the

analyte transport efficiency and Q_{sam} the sample introduction flow rate, K_{ICPMS} is the detection efficiency, which represents the ratio of the number of ions detected versus the number of analyte atoms of the measured isotope introduced into the ICP; and K_M ($=AN_{Av}/M_M$) is a factor related to the element measured, where A is the atomic abundance of the isotope considered, N_{Av} the Avogadro number, and M_M the atomic mass of the element.

SP-ICP-MS signals are recorded as time scans (Fig. 1a), which consist of a number of particle events above a continuous baseline. Whereas the intensity of each event is due to the ions detected from each particle, the baseline is due to the background at the mass recorded or to the presence of dissolved forms of the element measured. Raw time scans can be processed by plotting the event intensity vs. the event intensity frequency, obtaining histograms as shown in Fig. 1b, where the first distribution is due to the background and/or the presence of dissolved forms of the element measured and the second to the particles themselves.

The basic assumption behind the measurements in SP-ICP-MS is that each recorded event represents a single particle. If this assumption is true, then the number of particle events counted (Y_N) during an acquisition time (t_i) is directly related to the number concentration of particles (X^N):

$$Y_N = K_N X^N = K_{intro} t_i X^N \quad (2)$$

where K_N is the analytical sensitivity obtained from a number concentration calibration (number of particle events counted vs. number concentration) during a specific acquisition time t_i. It is assumed that the transport efficiency for dissolved species and particles is the same ($K_N = K_{intro} t_i$), otherwise the particle transport efficiency should be considered. Both in eqs. 1 and 2, blanks have been considered negligible. On the other hand, the net intensity of each particle event ($S_P = Y - Y_B$, where Y is the gross intensity and Y_B is the mean intensity of the baseline distribution, both measured as counts) is proportional to the number of atoms of the element monitored in each detected particle, and hence to the mass of element per particle (m_P):

$$S_P = K_m m_P = K_{ICPMS} K_M m_P \quad (3)$$

where K_m is the slope obtained from a mass per particle calibration (net event intensity vs. element mass per particle). Eq. 3 can be related to the size of the particle if the composition, shape and density of the particle are known. For instance, for a solid, homogeneous and spherical particle, eq. 3 can be written as:

$$S_P = K_d d^3 = \frac{1}{6}\pi\rho F_P K_{ICPMS} K_M d^3 \quad (4)$$

where K_d is the slope obtained from a size calibration (net event intensity vs. particle diameter cubed), d is the diameter, ρ the density and F_P the mass fraction of the element in the particle. Fig. 1c shows the corresponding mass of element per particle or size distribution.

Particle events are recorded in SP-ICP-MS as pulses or as transient signals, depending on the dwell time selected. When using dwell times in the millisecond range (3–10 ms), larger that the duration of the particle event in the instrument (usually 300–1000 μs [24,25]), events are recorded as pulses, consisting of just one reading, whereas for dwell times in the microsecond range (10–200 μs), they are recorded as transient signals, comprising several readings (Fig. 2). This distinction comes from the technical features of SP-ICP-MS instrumentation, with former instruments limited to millisecond dwell times, applying an analyzer settling time between readings in most instruments, whereas dwell times have been reduced down to 10 μs, with no settling time, in current commercially available instruments. In any case, the total net intensity of a transient event can be related to the sum of the individual net intensities recorded along the transient signal ($S_P = \Sigma S_{Pi}$), being equal to the net intensity of the same particle recorded as a pulse. Whereas the total net intensity of a transient event is independent of the dwell time, its height is proportional to it if the event is recorded in more than one reading, as it is shown in Fig. 2. Assuming a simplified triangular profile of height S_{Pmax} and time-width w for a transient particle event, and at least two readings are recorded per particle ($t_{dwell} \leq w/2$), eq. 3 can be written as:

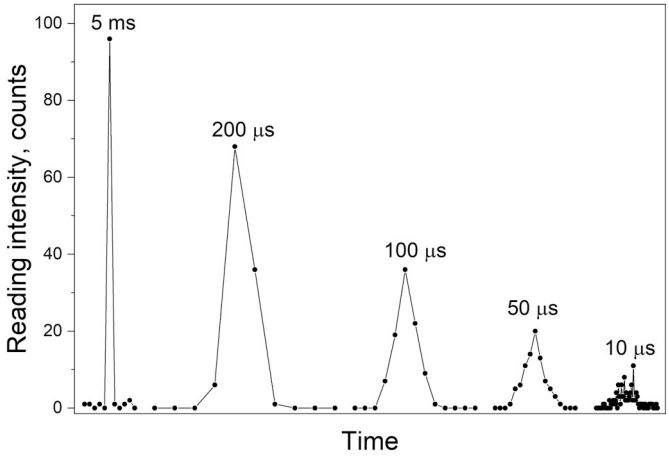


Fig. 2. Profiles of particle events recorded at different dwell times for 50 nm gold nanoparticles (averaged total intensity per particle event: 96 counts). Time scale for 200, 100, 50 and 10 μs: x100.

$$S_{Pmax} = \frac{2}{w} K_{ICPMS} K_M t_{dwell} m_P \quad (5)$$

The mass concentration of dissolved element (X^D) can be calculated from the net mean baseline signal $S_{\overline{D}} = Y_{\overline{D}} - Y_B$, where $Y_{\overline{D}}$ is the gross mean signal corresponding to baseline events and Y_B the mean intensity of the baseline from a blank, all intensities expressed as counts. Considering eq. (1) expressed in counts (Y) by including the dwell time:

$$Y = K_R t_{dwell} X^M = K_{intro} K_{ICPMS} K_M t_{dwell} X^M \quad (6)$$

the mass concentration of dissolved element is related to the net mean baseline signal through:

$$S_{\overline{D}} = K_R t_{dwell} X^D = K_{intro} K_{ICPMS} K_M t_{dwell} X^D \quad (7)$$

Eqs. 2, 3, 4 and 7 summarize the fundamentals behind single particle ICP-MS. Quantitative determinations of particle number concentrations are based on the linear relationship between the number of events and the number concentration (eq. 2); whereas, the intensity of the particle events is proportional to the mass of analyte per particle (eq. 3), or to the third power of the diameter for solid, spherical, and pure particles (eq. 4), allowing the determination of element mass per particle and size distributions, respectively. Finally, the signal from the baseline is directly related to the mass concentration of dissolved species of the element monitored through eq. 7.

It must be point out that if the particles behave in the ICP-MS in the same way than the dissolved element, information from conventional calibration with dissolved standards ($K_R = K_{intro} K_{ICPMS} K_M$) can be used for the calculation of the different coefficients included in eqs. 1, 2 and 3, once the analyte transport efficiency and the sample flow rate are known. Analyte transport efficiency is commonly calculated following the procedures developed by Pace et al. [5].

Unlike conventional quantitative chemical measurement process, where just the signal and the concentration domains are involved, SP-ICP-MS measurement involves different domains (Fig. 1). First, from the event intensity signal domain (Y), particles of different sizes (in fact, of different mass of element per particle) are detected, involving a size (or an element mass per particle) domain. Transformation from the event intensity signal domain to the size or the element mass per particle domains implies the use of eqs. 4 and 3, respectively. Once the particle events have been detected and counted, from the number of events signal domain (Y_N) we can move to the number concentration domain

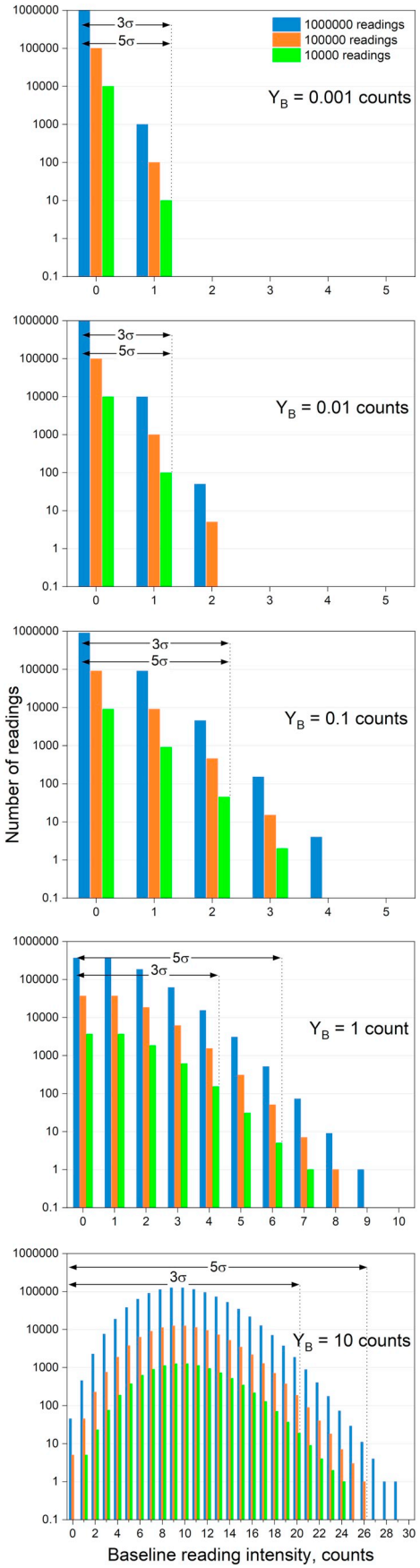


Fig. 3. Discrete Poisson baseline distributions for mean baseline intensities of (a) 0.001, (b) 0.01, (c) 0.1 (d) 1 and (e) 10 counts, with 10^4 (green), 10^5(orange) and 10^6 (blue) readings. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

through the use of eq. 2. Finally, the event intensity signal domain corresponding to the baseline events ($S_{\overline{D}}$) must be considered in relation with the dissolved element mass concentrations domain through the use of eq. 7.

4. Detection capability of particles

One of the most critical issues in SP-ICP-MS is the identification of particles events in the raw time scan. Particle events can consist of pulses, made of just one reading, or transient signals, made of a number of readings (Fig. 2). In both cases, the height of the particle event must be large enough to be distinguished from the baseline and its associated noise. This means that robust criteria to discriminate particle events from baseline events are required, which will also determine the minimum size or element mass per particle that can be detected. On the other hand, inappropriate criteria will lead to baseline events to be considered as particles, affecting the minimum number of particles than can be detected over a certain size, as it will be shown in the next section.

4.1. Discrimination of particle from baseline events

Discrimination of particle from baseline events can be accomplished by focusing on the baseline but also on the particles. When particle events are recorded as pulses, the use of a threshold criterion related to the baseline is imperative; however, when they are recorded as transient signals, approaches similar to those applied to the detection of chromatographic peaks can be used [8] [26]. These later approaches involve the application of algorithms which consider other criteria apart from the baseline threshold, such as the peak width. In any case, the use of a threshold, which usually consists of a multiple of the baseline standard deviation (n-sigma criterion), resembles the critical value (Y_C) used in the treatment of conventional concentration detection limits (section S1 of supplementary material) and most authors have used it in such way, applying coefficients from 3 up to 8 [5,8,25,28–44].

The parallelism between the threshold criteria for discrimination of particles from baseline events and the conventional concentration detection limits theory is just apparent and its application is not straightforward. First, the intensity of the baseline readings follows Poisson distributions and consists of discrete values (0, 1, 2… counts); second, the mean baseline intensities can cover a wide range of values, but they can be extremely low (e.g. 0.001 counts); third, the magnitude of the baseline distribution (see Fig. 1b), expressed as the number of baseline readings, can be very high dependant on the acquisition and the dwell times selected (e.g. more than 1 million readings).

Fig. 3 shows discrete Poisson baseline distributions for mean baseline intensities from 0.001 up to 10 counts and from 10^4 up to 10^6 readings. Considering that for the lowest attainable baseline intensities, those distributions consisting of 0 and 1 count readings and that the critical value calculated for discrimination must be an integer (rounded up if necessary, as a rule of thumb), then the minimum critical value to be applied should be 1 count. Under these conditions, the coefficient selected is not decisive for mean baseline intensities below 1 count, obtaining the same critical values (or 1-count differences due to rounding up) by using 3 or 5 as threshold coefficients; however, from baseline mean intensities of 1 count and higher the selection becomes significant, as well as the goodness of the discrimination.

Although 3 was initially proposed as threshold coefficient [5], its use has not always been justified on statistical basis. Larger coefficients have been used with the aim of reducing the percentage of baseline readings not removed after applying the threshold criterion, which are considered false positives [17,43]. This means that for a normal or a Poisson-normal baseline distribution, a critical value of 3σ implies that 0.135% ($\alpha = 0.00135$) of the baseline readings would be false positives, following the detection limits theory. Alternantively, a threshold

coefficient of 5 was proposed to reduce this percentage [43]. However, what becomes relevant in SP-ICP-MS is the absolute number of false positives, and hence the magnitude of the distribution, instead of its percentage. Fig. 3b shows that after applying a 3 or 5-sigma criterion, no false positives are counted if the measurement involves 10^4 readings, but 5 and 50 false positives would be detected for 10^5 or 10^6 readings, respectively. For higher baseline levels (Figs. 3c and 3d) around 100 false positives would be obtained when the number of readings is in the million range.

As it has been shown in Fig. 3, the number of baseline readings, which depends on the total acquisition time but also on the dwell time selected, becomes critical to select a threshold criterion. Working at milliseconds, the number of readings lies in the tens of thousands (e.g., 12,000 readings for 1-min acquisition time at 5 ms dwell time), whereas it increases to hundreds of thousands and up to more than 1 million when working at microseconds (e.g., 1.2 million readings for 1-min acquisition time at 50 μs dwell time). Under real conditions, when particles are present, the proportion of baseline readings remains high (between ca. 95 and more than 99% for milli and microsecond dwell times, respectively), because of the low number concentration of particles needed for avoiding the overlapping of two or more particles in a single event [25].

Laborda et al. [18] demostrated that a 5-sigma threshold criterion rounded to the upper integer satisfies the requirements for eliminating the occurrence of false positives along a wide range of baseline intensities working at millisecond dwell times and number of readings in the tens of thousand range. As it can be seen in Fig. 3, when working at microsecond dwell times and hundreds of thousands or millions of readings, the approach is also valid, although a security term ($\varepsilon \geq 1$) could be added to the 5-sigma criterion on a practical basis to make the occurrence of false positives totally negligible. This correction applies particularly for mean baseline intensities from 1 count and one million of readings or more; under such conditions, the application of a security term equal to 1 (corrected criterion: $5\sigma_B + 1$) would limits the occurrence of false positives below 10.

4.2. Size and element mass per particle limit of detection

As it has been shown above, application of a threshold strategy for discrimination of baseline and particle events is equivalent to the use of a critical value Y_C. By using a 5σ criterion the occurrence of false positives becomes virtually zero for Poisson discrete baseline distributions. The same criterion applied for the calculation of the critical value should be used for calculation of the size (or element mass per particle) limit of detection.

The expressions found in SP-ICP-MS publications for calculation of size LODs are mainly based on the use of the 3σ criterion [8,17,26–32,36–42,44–46], although the use of a 5σ criterion has also been reported [33–35,45]. Interpretation of a 3σ criterion on basis of LOD theory must involve the consideration of both type I (false positives) and type II (false negatives) errors, where $\alpha = \beta = 0.067$, but also $\alpha = 0.00135$ and $\beta = 0.5$, where the limit of detection is equal to the critical value ($Y_D = Y_C$). This latter approach has been discouraged for conventional LOD calculation [47] because it involves a 50% probability of false negatives (see fig. S1b and S1d in supplementary material). However, this is not so relevant in the context of particle detection by SP-ICP-MS, because the detection of the particles is not compromised even though half of the particle distribution is lost when a LOD criterion based on $Y_D = Y_C$ is applied. This can be explained by the fact that the two distributions involved correspond to: (i) the baseline distribution, consisting of a large number of baseline readings, and (ii) the particle distribution, consisting of a much smaller number of signals produced by particles of different sizes, even for very low polydisperse particles. This approach has been followed not intentionally in most of the publications cited above, although it has proved to be effective for detection of particles in [19]. Fig. 4 shows the validity of the proposed approach for detection of 97 nm silver nanoparticles under experimental conditions where the size LOD was 91 nm, and half of the nanoparticle distribution could be recorded, confirming the presence of nanoparticles over 91 nm.

Once a criterion for estimation of mass per particle and size LODs is available, it must be adapted to the nature of the particle events involved (pulses or transient signals). Working at millisecond dwell times, the total mass of element in the particle is proportional to the pulse intensity (height) through eq. 3, and the mass per particle LOD is written as:

$$LOD_{mass} = X_C^{mass} = \frac{5\sigma_B}{K_{ICPMS} K_M} \tag{8}$$

For solid, homogeneous and spherical particles (eq. 4), eq. 8 can be expressed as:

$$LOD_{size} = X_C^{size} = \left(\frac{30\ \sigma_B}{\pi \rho F_P K_{ICPMS} K_M} \right)^{1/3} \tag{9}$$

When using microsecond dwell times, particles events are recorded as transient signals, whose heights are proportional to the dwell time, and are always smaller than the same events recorded as pulses, as it can be seen in Fig. 2. By using eq. 5, eqs. 8 and 9 can be written as:

$$LOD_{mass} = X_C^{mass} = \frac{5\sigma_B}{\frac{2}{w} K_{ICPMS} K_M t_{dwell}} \tag{10}$$

$$LOD_{size} = X_C^{size} = \left(\frac{30\ \sigma_B}{\frac{2}{w} \pi \rho F_P K_{ICPMS} K_M t_{dwell}} \right)^{1/3} \tag{11}$$

Dwell time plays a significant role in relation with the achievable mass and size LODs. When using millisecond dwell times, particle events are recorded as pulses, whose intensity is independent of the dwell time; thus, mass and size LODs are limited by baseline noise and hence by the baseline intensity, which is reduced by using shorter dwell times. For a fixed baseline count rate ($Y_{R,B}$) and considering that $\sigma_B = \sqrt{Y_{R,B} t_{dwell}}$, mass and size LODs decrease with the square root of the dwell time (eqs. 8 and 9). However, for microsecond dwell times, mass and size LODs also depend on the maximum intensity of the transient signals, which in turns depends on the dwell time used and the width of the signals. For a fixed signal width, this means that mass and size LODs increase with the square root of the dwell time when microsecond dwell times are used (eqs. 10 and 11). In Fig. 5, experimental size LODs to the third power were plotted versus the square root and the inverse of the square root of the dwell time for millisecond (3–10 ms) and microsecond (200–20 μs) dwell times, respectively, showing the predicted relationship between dwell time and size LODs for silver nanoparticles.

It should be mentioned that a signal-to-noise ratio approach has been followed for mass and size LOD estimations in agreement with the trend followed in SP-ICP-MS publications, and also because it allows a common approach for both pulse and transient signal events. Alternative approaches followed in other fields (e.g., chromatography) based on the use of integrated signals could be applied to microsecond measurements, although they have not been considered here.

Whereas short dwell times are recommended when working with millisecond dwell times, the opposite is true when using microsecond dwell times. In both cases, the duration of the particle events limits the suitable dwell times. As a rule of thumb, dwell times longer than twice the duration of the events should be used when working at millisecond dwell times to record the particle events as pulses, whereas for microseconds, dwell times should be shorter that half the duration of the events. For these reasons, dwell times shorter than 3 ms and longer than 200 μs were not considered in Fig. 5, because those dwell times correspond to the boundary between both recording modes, recording particle events with 1 and 2 readings within the same run. Finally, the specific performance of the ICP-MS instrument plays a significant role on mass and size LODs through its detection efficiency and the duration

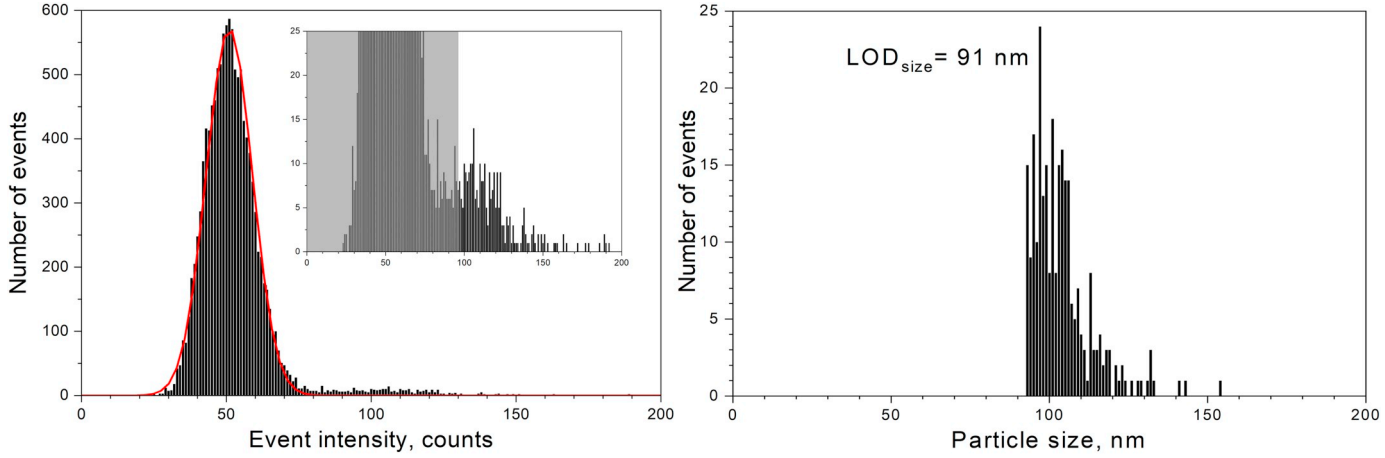


Fig. 4. Detection of 97 nm silver nanoparticles under conditions where LOD_{size} = 91 nm (Ag(I): 2 μg L^{-1}). LOD criterion: $Y_D = Y_C = Y_B + 5\sigma$ (gray area in inset).

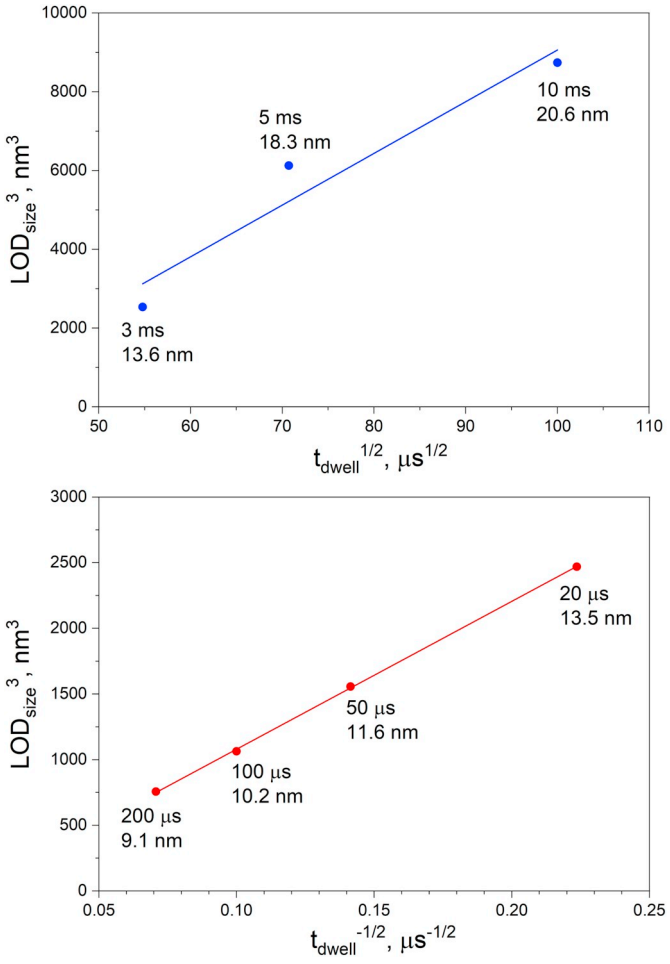


Fig. 5. Experimental variation of size LODs with respect to dwell time at milliseconds (a) and microseconds (b) for silver nanoparticles.

of the particle events, which in turn depends on the plasma and the mass spectrometer operating conditions [48].

4.3. Number concentration limit of detection

If the criterion applied for discrimination of particles from baseline events guarantees that no particles are detected from a blank containing no particles (no false positives), the counting of particle events in a sample can be assimilated to an ideal Poisson counting process with zero blank, whose critical value is 0 and the minimum detection value can be rounded to 3 particle events [23]. The minimum detection value can be directly related to the number concentration limit of detection (LOD_{number}) through eq. 2 as [1]:

$$LOD_{number} = X_D^{number} = \frac{3}{\eta Q_{sam} t_i} \quad (12)$$

If particles are detected in the blank, the conventional expression for $\alpha = \beta = 0.05$ an paired measurement (blank subtracted) can be used for calculation of the LOD_{number} [23]:

$$LOD_{number} = \frac{4.65\sigma_{N,B} + 2.71}{\eta Q_{sam} t_i} \quad (13)$$

where $\sigma_{N,B}$ is the standard deviation of the number of counted events ($Y_{N,B}$). It can be calculated from a number of replicate blank measurements (e.g. 10) or estimated from the number of particles counted ($\sigma_{N,B} = \sqrt{Y_{N,B}}$). If the LOD is just going to be used as a figure of merit, eq. 13 could be simplify as:

$$LOD_{number} = \frac{5\sigma_{N,B} + 3}{\eta Q_{sam} t_i} = \frac{5\sqrt{Y_{N,B}} + 3}{\eta Q_{sam} t_i} \quad (14)$$

If the discrimination criterion does not guarantee a small number of false positives (e.g., by using a 3-sigma criterion, as we have seen above), number concentration detection limits are going to degrade significantly, affecting to the detectability of particles over the size detection limit. In any case, number concentration limit of detection depends also on the sample introduction to the ICP-MS and the acquisition time, so it can be enhanced by improving nebulization efficiency, increasing the sample flow rate, and/or using longer acquisition times.

5. Detection capability of dissolved elements: Dissolved element mass concentration limit of detection

In principle, baseline distributions follow Poisson profiles, which can be treated as Poisson-normal for mean values over ca. 5 counts. According to the conventional expression (eqs. S7 or S8 in supplementary material) for calculation of dissolved element mass concentration limit of detection (LOD_{dis}), the following parameters must be known: i) the standard deviation of the mean intensity of the baseline from a blank ($\sigma_{\overline{B}}$) and ii) the corresponding sensitivity factor (b). Since the sensitivity factor can be expressed in counts as $K_R t_{dwell}$ (eq. 1 involves signals expressed in counts per second), the following expression can be derived:

$$LOD_{dis} = X_D^{dis} = \frac{3\sigma_{\overline{B}}}{K_R t_{dwell}} \quad (15)$$

In the case of blank baseline distributions, despite its Poisson nature, their means can be considered normally distributed due to the

Table 1
Theoretical and experimental dissolved element mass concentration limits of detection (LOD_{dis}) for silver (^{107}Ag) measured in SP-ICP-MS mode at different dwell times. Total acquisition time: 60 s. Number of replicates: 10.

dwell time µs	number of readings	$Y_{R,B}$ cps	ΣY_B counts	$\sigma_{\overline{B}}$ counts	$RSD_{\overline{B}}$ %	K_R cps (µg L^{-1})$^{-1}$	LOD_{dis} theoretical ng L^{-1}	LOD_{dis} experimental ng L^{-1}
100	600,000	36 ± 1	2160 ± 60	1.07×10^{-4}	2.97	8.95×10^{4}	0.026	0.036
50	1,200,000	38 ± 1	2280 ± 60	3.87×10^{-5}	2.04	9.01×10^{4}	0.026	0.026
20	3,000,000	38 ± 1	2280 ± 60	2.12×10^{-5}	2.79	9.03×10^{4}	0.026	0.035

Table 2
Expressions for the critical values and limits of detection in SP-ICP-MS.

domain	pulse signals		transient signals	
mass per particle	$X_C^{mass} = X_D^{mass} =$	$\frac{5\sigma_B}{K_{ICPMS}K_M}$	$X_C^{mass} = X_D^{mass} =$	$\frac{5\sigma_B}{\frac{2}{w}K_{ICPMS}K_M t_{dwell}}$
		$\frac{5\sqrt{Y_B}}{K_{ICPMS}K_M}$		$\frac{5\sqrt{Y_B}}{\frac{2}{w}K_{ICPMS}K_M t_{dwell}}$
particle size	$X_C^{size} = X_D^{size} =$	$\left(\frac{30\,\sigma_B}{\pi\rho F_P K_{ICPMS}K_M}\right)^{1/3}$	$X_C^{size} = X_D^{size} =$	$\left(\frac{30\,\sigma_B}{\frac{2}{w}\pi\rho F_P K_{ICPMS}K_M t_{dwell}}\right)^{1/3}$
		$\left(\frac{30\,\sqrt{Y_B}}{\pi\rho F_P K_{ICPMS}K_M}\right)^{1/3}$		$\left(\frac{30\,\sqrt{Y_B}}{\frac{2}{w}\pi\rho F_P K_{ICPMS}K_M t_{dwell}}\right)^{1/3}$
	pulse and transient signals			
number concentration	$X_C^{number} =$	$\frac{2.33\sigma_{N,B}}{\eta_{neb}Q_{sam}t_i}$	$X_D^{number} =$	$\frac{5\sigma_{N,B}+3}{\eta_{neb}Q_{sam}t_i}$
		$\frac{2.33\sqrt{Y_{N,B}}}{\eta_{neb}Q_{sam}t_i}$		$\frac{5\sqrt{Y_{N,B}}+3}{\eta_{neb}Q_{sam}t_i}$
dissolved element mass concentration	$X_C^{dis} =$	$\frac{1.64\sigma_{\overline{B}}}{K_R t_{dwell}}$	$X_D^{dis} =$	$\frac{3\sigma_{\overline{B}}}{K_R t_{dwell}}$
		$\frac{1.64\sqrt{Y_{R,B}}}{K_R\sqrt{t_i}}$		$\frac{3\sqrt{Y_{R,B}}}{K_R\sqrt{t_i}}$

central limit theorem, with $\sigma_{\overline{B}} = \sigma_B/\sqrt{m}$, where m is the number of baseline readings. Therefore, limits of detection can be expressed as:

$$LOD_{dis} = \frac{3\sqrt{Y_{R,B}}}{K_R\sqrt{t_i}} \tag{16}$$

considering $\sigma_{\overline{B}} = \sqrt{Y_{\overline{B}}} = \sqrt{Y_{R,B}t_{dwell}}$, where $Y_{R,B}$ is the blank baseline intensity expressed in counts per second, and m equal to the total number of readings ($=t_i/t_{dwell}$), because in practice particle readings accounts for less than 5% of the total number of readings. $\sigma_{\overline{B}}$ can be calculated from a number of replicate baseline blank measurements (e.g. 10) or estimated from the baseline intensity ($Y_{R,B}$).

Eq. 16 reveals that the detection limits for the dissolved fraction are independent on the dwell time used and, for each isotope and a given baseline blank intensity, they just depend on the total acquisition time and hence the total number of counts accumulated during that time (ΣY_B), which ultimately controls the standard deviation of the blank baseline as the square root of the total number of counts. Although the evaluation of eq. 16 would require a large number of replicates to confirm empirically the validity of the central limit theorem, Table 1 shows experimental blank baseline standard deviations and detection limits achieved by using a feasible number of replicates (10) and dwell times from 20 to 100 µs. Results from Table 1 confirms that, in spite of the dwell times span over almost an order of magnitude, limits of detection are in the same order. This is because the counts accumulated for the blank baselines during the acquisition time (60 s) were similar for the three dwell times considered (ca. 2200 counts) and hence their relative standard deviations (2.0–3.0%) are in agreement with the expected one (2.1%). This means that the detection capability for dissolved elements is not affected by the dwell time selected and it can be improved just by increasing the total acquisition time.

6. Summary of critical values and limits of detection in SP-ICP-MS

Table 2 summarizes the expressions proposed for the critical values and limits of detection involved in SP-ICP-MS methods. Whereas the critical values can be used as a posteriori limits of decision in relation with the presence of particles and dissolved element in a sample, limits of detection are going to be used as a priori figures of merit of the methods. Their calculation requires to know the different theoretical and experimental parameters included in the denominators and the corresponding blank standard deviations. The term blank must be understood here in its widest sense, applying to both reagent and matrix blanks, leading to the respective instrumental and methodological critical values or limits of detection. Alternatively, the standard deviations can be estimated as the square root of the mean values involved ($\sigma = \sqrt{Y}$), because of the Poisson nature of the measurements. This later expression would not apply to mass per particle and particle size detection limits when the intensity of the baseline exceeds a certain value because of the additional contribution of the flicker noise, which can be considered as $\sigma_B = \sqrt{Y_B + \xi^2 Y_B^2}$, where ξ is the flicker noise coefficient [18]. The value of the flicker noise coefficient, as well as the signal intensity above which becomes significant depends on the detector. In our laboratory, using quadrupole ICP-MS instruments equipped with electron multipliers, flicker noise coefficients of 0.04, which becomes relevant over ca. 10–100 counts, are typically obtained [18]. In the case of TOF-ICP-MS instruments, which are equipped with microchannel plate detectors, showing compound Poisson-distributed noise for low-count signals, the expressions must be adapted conveniently [19,20].

According to the approach presented in section 4.2, size and mass per particle limits of detection and critical values are calculated from the same expressions. In the case of number concentrations, the

Table 3
Particle size and dissolved element mass concentration LODs.

element	isotope	particle composition	K_R[a] cps (μg L^{-1})$^{-1}$	$Y_{R,B}$[a] cps	LOD_{size}[b] nm		LOD_{dis}[d] ng L^{-1}
					t_{dwell} = 5 ms	t_{dwell} = 100 μs[c]	
Ag	107	Ag	62,644	203	17.4	12.3	0.09
Al	27	Al	140,231	1771	29.9	21.2	0.1
		Al_2O_3			32.6	23.0	
As	75	As	10,876	24	26.7	18.9	0.2
		As_2O_3			33.7	23.9	
Au	197	Au	27,343	21	12.7	9.0	0.06
B	11	B	26,333	4745	60.3	42.7	1.0
		B_2O_3			93.8	66.3	
Ba	137	Ba	22,924	34	26.0	18.4	0.1
		$BaSO_4$			28.6	20.2	
Be	9	Be	15,758	1	18.6	13.1	0.02
Bi	209	Bi	131,040	15	9.0	6.3	0.01
		Bi_2O_3			9.6	6.8	
Ca	44	Ca	147,864	11,780	48.5	34.3	0.3
		CaO			42.0	29.7	
		$CaCO_3$			54.6	38.6	
Cd	111	Cd	14,972	2	14.1	10.0	0.04
		CdSe			19.3	13.6	
Ce	140	Ce	108,913	7	9.6	6.8	0.01
		CeO_2			9.8	7.0	
Co	59	Co	103,622	270	16.2	11.5	0.06
		CoO			19.6	13.9	
		Co_3O_4			20.4	14.4	
Cr	52	Cr	89,534	84,751	47.8	33.8	1.3
		Cr_2O_3			60.3	42.6	
Cu	65	Cu	26,502	58	19.7	14.0	0.1
		CuO			24.2	17.1	
Dy	163	Dy	37,892	0.1	6.1	4.3	0.003
		Dy_2O_3			6.6	4.7	
Er	166	Er	51,046	0.1	5.5	3.9	0.002
		Er_2O_3			5.8	4.1	
Eu	153	Eu	74,744	0.3	6.9	4.9	0.003
		Eu_2O_3			6.5	4.6	
Gd	157	Gd	30,872	0.1	6.7	4.8	0.004
		Gd_2O_3			7.2	5.1	
Hf	180	Hf	54,727	2	7.6	5.4	0.009
		HfO_2			9.0	6.3	
Hg	5	Hg	2209	98	43.0	30.4	1.7
Ho	165	Ho	149,531	0.1	3.8	2.7	0.001
		Ho_2O_3			4.1	2.9	
In	115	In	171,019	6	7.7	5.4	0.005
		In_2O_3			8.2	5.8	
		$In(OH)_3$			10.3	7.3	
Ir	193	Ir	79,601	4	6.5	4.6	0.01
La	139	La	568,165	2.1	4.6	3.3	0.001
		La_2O_3			4.8	3.4	
Li	7	Li	62,259	85	40.6	28.7	0.06
Lu	175	Lu	152,549	0.1	3.7	2.6	0.001
		Lu_2O_3			3.9	2.8	
Mg	24	Mg	188,923	4782	37.0	26.2	0.1
		MgO			33.6	23.8	
Mn	55	Mn	146,823	1181	19.6	13.9	0.09
		Mn_2O_3			26.2	18.5	
Mo	95	Mo	19,064	3	12.7	9.0	0.03
		MoO_3			18.8	13.3	
Na	23	Na	210,199	47,730	63.7	45.0	0.4
Nd	143	Nd	15,940	0.9	12.8	9.0	0.02
		Nd_2O_3			13.1	9.3	
Ni	60	Ni	21,914	36	19.5	13.8	0.1
		NiO			23.3	16.5	
Pb	208	Pb	80,277	175	15.2	10.7	0.06
		PbO			16.5	11.7	
Pd	105	Pd	30,498	5	11.4	8.1	0.03
Pr	141	Pr	131,954	0.9	6.3	4.5	0.003
		Pr_6O_{11}			6.8	4.8	
Pt	195	Pt	24,533	0	5.3	3.7	0.005
Rh	103	Rh	157,201	2	5.7	4.0	0.004
		Rh_2O_3			7.0	4.9	
Ru	101	Ru	26,899	2	9.7	6.9	0.02
		RuO_2			12.9	9.1	
Sb	121	Sb	33,214	8	14.6	10.3	0.03

(*continued on next page*)

Table 3 (*continued*)

element	isotope	particle composition	K_R[a] cps (μg L^{-1})$^{-1}$	$Y_{R,B}$[a] cps	LOD_{size}[b] nm		LOD_{dis}[d] ng L^{-1}
					t_{dwell} = 5 ms	t_{dwell} = 100 μs[c]	
		Sb_2O_3			16.7	11.8	
		Sb_2O_5			19.3	13.6	
Sc	45	Sc	80,869	2507	36.6	25.9	0.2
		Sc_2O_3			38.8	27.4	
Se	82	Se	1816	194	72.8	51.5	3.0
Si	29	Si	10,969	120,537	148.5	105.0	12.3
		SiO_2			183.3	129.6	
Sm	147	Sm	19,342	0.9	11.6	8.2	0.02
		Sm_2O_3			12.2	8.6	
Sn	118	Sn	40,690	257	23.5	16.6	0.2
		SnO_2			25.9	18.3	
Sr	88	Sr	174,518	264	20.7	14.6	0.04
		$SrCO_3$			22.1	15.6	
Tb	159	Tb	153,955	0.1	3.9	2.8	0.001
		Tb_4O_7			4.3	3.0	
Te	125	Te	3237	1	22.0	15.6	0.1
		TeO_2			24.5	17.3	
Ti	47	Ti	8757	43	34.0	24.1	0.3
		TiO_2			41.4	29.3	
Tl	205	Tl	112,528	12	8.6	6.1	0.01
		Tl_2O_3			9.4	6.6	
Tm	169	Tm	157,368	0.3	4.5	3.2	0.001
		Tm_2O_3			4.8	3.4	
V	51	V	109,688	441	19.6	13.9	0.07
		V_2O_3			24.1	17.0	
Y	89	Y	107,231	5	10.4	7.3	0.008
		Y_2O_3			10.8	7.6	
Yb	173	Yb	25,406	0.2	8.4	6.0	0.007
		Yb_2O_3			8.0	5.7	
Zn	66	Zn	35,387	1479	33.3	23.5	0.4
		ZnO			38.7	27.4	

[a] Ultrapure water.
[b] Quadrupole ICP-MS. Analyte transport efficiency: 5% (cyclonic spray chamber and concentric nebulizer), sample flow rate: 0.4 mL min^{-1}.
[c] Time-width of particle events: 500 μs.
[d] Total acquisition time: 60 s.

Table 4
Number concentration LODs for different commercial sample introduction configurations.

sample introduction system	η %	Q_{sam} mL min^{-1}	LOD_{number}[a] L^{-1}
cyclonic spray chamber + concentric nebulizer (Glass Expansion)	2.6	1.1	1.0×10^5
baffled cyclonic spray chamber + concentric nebulizer (Meinhard)	5.3	0.4	1.4×10^5
Asperon spray chamber + high efficiency nebulizer (Meinhard)	37.7	0.016	4.9×10^5

[a] Total acquisition time: 60 s.

minimum limit of detection is given by eq. 12 under conditions of no particles detected in the blanks. If particles are detected in the blanks, a 2.33σ criterion must be applied for establishing the critical value to make the decision about the presence of particles, whereas a 5σ + 3 criterion is applied for estimating the limit of detection. These criteria correspond to paired measurements (blanks subtracted) governed by Poisson statistics, which is the case when counting particles. With respect to the dissolved element, the mass concentration corresponding to the critical value and the limit of detection have been calculated considering the 1.64σ and 3σ criteria respectively, assuming that mean baseline blanks are well-known and follow normal distributions.

A calculation tool has been included as Supplementary Material to facilitate the estimation of SP-ICP-MS critical values and limits of detection for different elements and particle compositions. Table 3 summarizes size LODs for selected metal and oxide particles using a commercial quadrupole instrument equipped with a conventional sample introduction system (cyclonic spray chamber and concentric nebulizer) under typical experimental conditions (analyte transport efficiency: 5%, sample flow rate: 0.4 mL min^{-1}, dwell times: 5 ms and 100 μs, time-width of particle events: 500 μs). More than 50% of the elements showed size LODs below 10 nm, both for metallic and oxide nanoparticles, with LODs below 5 nm for some rare-earth oxides because of the low background levels and the high sensitivities attainable. With respect to the dissolved element concentration, LODs in the picogram per liter level, lower than using ICP-MS in standard mode, can be achieved because of total acquisition times used in SP-ICP-MS are in the range of minutes, whereas in standard mode individual isotopes are just monitored during seconds (e.g., 1 s when measuring at 50 ms dwell time and 20 sweeps). The increase in the acquisition time involves a proportional increase in the counts recorded, whereas the standard deviation increases with the square root of the signal, which results in LOD reduction proportional to the square root of the acquisition time. In any case, the LODs shown in Table 3 are instrumental LODs and should be considered as the best-case scenario for SP-ICP-MS analysis.

Table 4 shows minimum number concentration detection limits attainable with the sample introduction configurations listed, and calculated by using eq. 12. These LODs are in the range of 100–500 particles per mL for total acquisition times of one minute. As can be seen, improvements in analyte transport efficiency with pneumatic nebulization systems do not result in a reduction of LODs because of the lower sample flow rates required and the most suitable way of improving them is by increasing the acquisition time.

7. Final remarks

The unique features of SP-ICP-MS for the analysis of nanoparticles, along with its availability in commercial instruments, have led to the success of this technique and its increasing application in several fields (environment, toxicology, food…). However, SP-ICP-MS still lacks of standardized metrological approaches, characteristic of mature analytical methods, to express and calculate its detection capabilities. In this respect, although the main trend in SP-ICP-MS is aimed at the detection of even smaller nanoparticles, we must not overlook that the technique is also able to detect such nanoparticles, as well as dissolved forms, at low number and mass concentrations, respectively. In each case, clear criteria and the corresponding mathematical expressions should be available and widely accepted to express the limits of detection in the different domains covered by SP-ICP-MS.

In a first stage, criteria and approaches from concentration LODs were applied in a straightforward way for the discrimination of particle events and the calculation of size LODs, whereas less attention was paid to number concentrations and dissolved element LODs. Based on our experience, application of conventional criteria is an oversimplification that does not respond to the peculiarities of the analytical signals in SP-ICP-MS. The discrete nature of the signals and the distributions involved, governed by Poisson statistics, introduce additional levels of complexity to their treatment that have been overlooked in many publications.

The present paper responds to a need of harmonizing approaches and criteria to express and calculate limits of detection in the different domains involved in SP-ICP-MS for validation purposes, together with the need of critical values or limits of decision to assess the presence of particles and/or dissolved species in any sample. The criteria applied for discrimination of particles from baseline events must be coherent not only with the estimation of size LODs, but also in relation to the attainable number concentration LODs, which means that the topic of detectability in SP-ICP-MS must be addressed under a holistic approach.

Declaration of interests

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

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities and the European Regional Development Fund, project RTI2018-096111-B-I00 (MICINN/FEDER).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.sab.2020.105883.

References

[1] F. Laborda, E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: a powerful tool for nanoanalysis, Anal. Chem. 86 (2014) 2270–2278, https://doi.org/10.1021/ac402980q.
[2] M.D. Montaño, J.W. Olesik, A.G. Barber, K. Challis, J.F. Ranville, Single particle ICP-MS: advances toward routine analysis of nanomaterials, Anal. Bioanal. Chem. 408 (2016) 5053–5074, https://doi.org/10.1007/s00216-016-9676-8.
[3] C. Degueldre, P.-Y. Favarger, Colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectroscopy: a feasibility study, Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp. 217 (2003) 137–142, https://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00568-X.
[4] F. Laborda, J. Jiménez-Lamana, E. Bolea, J.R. Castillo, Selective identification, characterization and determination of dissolved silver(i) and silver nanoparticles based on single particle detection by inductively coupled plasma mass spectrometry, J. Anal. At. Spectrom. 26 (2011) 1362–1371, https://doi.org/10.1039/c0ja00098a.
[5] H.E. Pace, N.J. Rogers, C. Jarolimek, V. a Coleman, C.P. Higgins, J.F. Ranville, Determining transport efficiency for the purpose of counting and sizing nanoparticles via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, Anal. Chem. 83 (2011) 9361–9369, https://doi.org/10.1021/ac201952t.
[6] O. Borovinskaya, B. Hattendorf, M. Tanner, S. Gschwind, D. Günther, A prototype of a new inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometer providing temporally resolved, multi-element detection of short signals generated by single particles and droplets, J. Anal. At. Spectrom. 28 (2013) 226, https://doi.org/10.1039/c2ja30227f.
[7] A. Hineman, C. Stephan, Effect of dwell time on single particle inductively coupled plasma mass spectrometry data acquisition quality, J. Anal. At. Spectrom. 29 (2014) 1252–1257, https://doi.org/10.1039/c4ja00097h.
[8] P.N. Shaw, A. Donard, Nano-particle analysis using dwell times between 10μs and 70μs with an upper counting limit of greater than 3x10 7 cps and a gold nanoparticle detection limit of less than 10nm diameter, J. Anal. At. Spectrom. (2016) 1234–1242, https://doi.org/10.1039/C6JA00047A.
[9] F. Laborda, E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry for the analysis of inorganic engineered nanoparticles in environmental samples, Trends Environ. Anal. Chem. 9 (2016) 15–23, https://doi.org/10.1016/j.teac.2016.02.001.
[10] D. Mozhayeva, C. Engelhard, A critical review of single particle inductively coupled plasma mass spectrometry – a step towards an ideal method for nanomaterial characterization, J. Anal. At. Spectrom. (2019), https://doi.org/10.1039/c9ja00206e.
[11] M. Thompson, S.L.R. Ellison, Towards an uncertainty paradigm of detection capability, Anal. Methods 5 (2013) 5857, https://doi.org/10.1039/c3ay41209a.
[12] M. Thompson, Do we really need detection limits? Analyst. 123 (1998) 405–407, https://doi.org/10.1039/a705702d.
[13] L.A. Currie, Nomenclature in evaluation of analytical methods, including detect ion and quantification ca pa bi I it ies ' (IUPAC Recommendations 1995), Pure Appl. Chem. 67 (1995) 1699–1723. doi:https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00104-X.
[14] ISO 11843-1:1997, Capability of detection – Part 1: Terms and definitions, International Standards Organisation, Geneva, 1997.
[15] D. Montville, E. Voigtman, Statistical properties of limit of detection test statistics, Talanta. 59 (2003) 461–476, https://doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00574-X.
[16] L.V. Rajaković, D.D. Marković, V.N. Rajaković-Ognjanović, D.Z. Antanasijević, Review: the approaches for estimation of limit of detection for ICP-MS trace analysis of arsenic, Talanta. 102 (2012) 79–87, https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.08.016.
[17] F. Laborda, J. Jiménez-Lamana, E. Bolea, J.R. Castillo, Critical considerations for the determination of nanoparticle number concentrations, size and number size distributions by single particle ICP-MS, J. Anal. At. Spectrom. 28 (2013) 1220–1232, https://doi.org/10.1039/c3ja50100k.
[18] F. Laborda, A.C. Gimenez-Ingalaturre, E. Bolea, J.R. Castillo, Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry as screening tool for detection of particles, Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc. 159 (2019) 105654, https://doi.org/10.1016/j.sab.2019.105654.
[19] A. Gundlach-Graham, L. Hendriks, K. Mehrabi, D. Günther, Monte Carlo simulation of low-count signals in time-of-flight mass spectrometry and its application to single-particle detection, Anal. Chem. 90 (2018) 11847–11855, https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01551.
[20] L. Hendriks, A. Gundlach-Graham, D. Günther, Performance of sp-ICP-TOFMS with signal distributions fitted to a compound Poisson model, J. Anal. At. Spectrom. 34 (2019) 1900–1909, https://doi.org/10.1039/C9JA00186G.
[21] M. Belter, A. Sajnóg, D. Barałkiewicz, Over a century of detection and quantification capabilities in analytical chemistry - historical overview and trends, Talanta. 129 (2014) 606–616, https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.05.018.
[22] H. Evard, A. Kruve, I. Leito, Tutorial on estimating the limit of detection using LC-MS analysis, part I: theoretical review, Anal. Chim. Acta 942 (2016) 23–39, https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.08.043.
[23] L.A. Currie, Limits for qualitative detection and quantitative determination: application to radiochemistry, Anal. Chem. 40 (1968) 586–593, https://doi.org/10.1021/ac60259a007.
[24] V. Geertsen, E. Barruet, F. Gobeaux, J.-L. Lacour, O. Taché, Contribution to accurate spherical gold nanoparticle size determination by single-particle inductively coupled mass spectrometry: a comparison with small-angle X-ray scattering, Anal. Chem. 90 (2018) 9742–9750, https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01167.
[25] I. Abad-Álvaro, E. Peña-Vázquez, E. Bolea, P. Bermejo-Barrera, J.R. Castillo, F. Laborda, Evaluation of number concentration quantification by single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry: microsecond vs. millisecond dwell times, Anal. Bioanal. Chem. 408 (2016) 5089–5097, https://doi.org/10.1007/s00216-016-9515-y.
[26] K. Newman, C. Metcalfe, J. Martin, H. Hintelmann, P. Shaw, A. Donard, Improved single particle ICP-MS characterization of silver nanoparticles at environmentally relevant concentrations, J. Anal. At. Spectrom. 31 (2016) 2069–2077, https://doi.org/10.1039/C6JA00221H.
[27] B. Franze, I. Strenge, C. Engelhard, Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: evaluation of three different pneumatic and piezo-based sample introduction systems for the characterization of silver nanoparticles, J. Anal. At. Spectrom. 27 (2012) 1074–1083, https://doi.org/10.1039/c2ja00003b.
[28] Y. Dan, H. Shi, C. Stephan, X. Liang, Rapid analysis of titanium dioxide nanoparticles in sunscreens using single particle inductively coupled plasma–mass spectrometry, Microchem. J. 122 (2015) 119–126, https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.04.018.
[29] Y. Dan, X. Ma, W. Zhang, K. Liu, C. Stephan, H. Shi, Single particle ICP-MS method development for the determination of plant uptake and accumulation of CeO2

nanoparticles, Anal. Bioanal. Chem. (2016) 5157–5167, https://doi.org/10.1007/s00216-016-9565-1.
[30] I. Kálomista, A. Kéri, G. Galbács, On the applicability and performance of the single particle ICP-MS nano-dispersion characterization method in cases complicated by spectral interferences, J. Anal. At. Spectrom. 31 (2016) 1112–1122, https://doi.org/10.1039/C5JA00501A.
[31] J. Vidmar, R. Milačič, J. Ščančar, Sizing and simultaneous quantification of nanoscale titanium dioxide and a dissolved titanium form by single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, Microchem. J. 132 (2017) 391–400, https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.02.030.
[32] E. Bolea-Fernandez, D. Leite, A. Rua-Ibarz, L. Balcaen, M. Aramendía, M. Resano, F. Vanhaecke, Characterization of SiO2 nanoparticles by single particle-inductively coupled plasma-tandem mass spectrometry (SP-ICP-MS/MS), J. Anal. At. Spectrom. 32 (2017) 2140–2152, https://doi.org/10.1039/c7ja00138j.
[33] J. Liu, K.E. Murphy, R.I. MacCuspie, M.R. Winchester, Capabilities of single particle inductively coupled plasma mass spectrometry for the size measurement of nanoparticles: a case study on gold nanoparticles, Anal. Chem. 86 (2014) 3405–3414, https://doi.org/10.1021/ac403775a.
[34] A.R. Donovan, C.D. Adams, Y. Ma, C. Stephan, T. Eichholz, H. Shi, Single particle ICP-MS characterization of titanium dioxide, silver, and gold nanoparticles during drinking water treatment, Chemosphere. 144 (2016) 148–153, https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.07.081.
[35] A.R. Donovan, C.D. Adams, Y. Ma, C. Stephan, T. Eichholz, H. Shi, Detection of zinc oxide and cerium dioxide nanoparticles during drinking water treatment by rapid single particle ICP-MS methods, Anal. Bioanal. Chem. 408 (2016) 5137–5145, https://doi.org/10.1007/s00216-016-9432-0.
[36] C. Degueldre, P.-Y. Favarger, C. Bitea, Zirconia colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry, Anal. Chim. Acta 518 (2004), https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.04.015.
[37] C. Degueldre, P.-Y. Favarger, R. Rossé, S. Wold, Uranium colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry, Talanta. 68 (2006) 623–628, https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.05.006.
[38] C. Degueldre, P. Favarger, S. Wold, Gold colloid analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry in a single particle mode, Anal. Chim. Acta 555 (2006) 263–268, https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.09.021.
[39] S. Gschwind, L. Flamigni, J. Koch, O. Borovinskaya, S. Groh, K. Niemax, D. Günther, Capabilities of inductively coupled plasma mass spectrometry for the detection of nanoparticles carried by monodisperse microdroplets, J. Anal. At. Spectrom. 26 (2011) 1166–1174, https://doi.org/10.1039/c0ja00249f.
[40] H.E. Pace, N.J. Rogers, C. Jarolimek, V. a Coleman, E.P. Gray, C.P. Higgins, J.F. Ranville, Single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry: a performance evaluation and method comparison in the determination of nanoparticle size., Environ. Sci. Technol. 46 (2012) 12272–12280. doi:https://doi.org/10.1021/es301787d.
[41] D.M. Mitrano, A. Barber, A. Bednar, P. Westerhoff, C.P. Higgins, J.F. Ranville, Silver nanoparticle characterization using single particle ICP-MS (SP-ICP-MS) and asymmetrical flow field flow fractionation ICP-MS (AF4-ICP-MS), J. Anal. At. Spectrom. 27 (2012) 1131, https://doi.org/10.1039/c2ja30021d.
[42] S. Lee, X. Bi, R.B. Reed, J.F. Ranville, P. Herckes, P. Westerhoff, Nanoparticle size detection limits by single particle ICP-MS for 40 elements, Environ. Sci. Technol. 48 (2014) 10291–10300, https://doi.org/10.1021/es502422v.
[43] J. Tuoriniemi, G. Cornelis, M. Hassellöv, Size Discrimination and Detection Capabilities of Single-Particle ICPMS for Environmental Analysis of Silver Nanoparticles, Anal. Chem. 84 (2012) 3965–3972, https://doi.org/10.1021/ac203005r.
[44] J. Jiménez-Lamana, I. Abad-Álvaro, K. Bierla, F. Laborda, J. Szpunar, R. Lobinski, Detection and characterization of biogenic selenium nanoparticles in selenium-rich yeast by single particle ICPMS, J. Anal. At. Spectrom. 33 (2018) 452–460, https://doi.org/10.1039/C7JA00378A.
[45] M.V. Taboada-López, N. Alonso-Seijo, P. Herbello-Hermelo, P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Piñeiro, Determination and characterization of silver nanoparticles in bivalve molluscs by ultrasound assisted enzymatic hydrolysis and sp-ICP-MS, Microchem. J. 148 (2019) 652–660, https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2019.05.023.
[46] A.K. Venkatesan, R.B. Reed, S. Lee, X. Bi, D. Hanigan, Y. Yang, J.F. Ranville, P. Herckes, P. Westerhoff, Detection and sizing of ti-containing particles in recreational waters using single particle ICP-MS, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 100 (2018) 120–126, https://doi.org/10.1007/s00128-017-2216-1.
[47] L.A. Currie, On the detection of rare, and moderately rare, nuclear events, J. Radioanal. Nucl. Chem. 276 (2008) 285–297, https://doi.org/10.1007/s10967-008-0501-5.
[48] E. Bolea-Fernandez, D. Leite, A. Rua-Ibarz, T. Liu, G. Woods, M. Aramendia, M. Resano, F. Vanhaecke, On the effect of using collision/reaction cell (CRC) technology in single-particle ICP-mass spectrometry (SP-ICP-MS), Anal. Chim. Acta 1077 (2019) 95–106, https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.05.077.

Glossary

A: isotopic abundance
b: sensitivity factor
d: particle diameter
F_P: mass fraction of an element in a particle
K_d: analytical sensitivity for a size (diameter) calibration
K_{ICPMS}: detection efficiency
K_{intro}: sample introduction factor
K_M: element factor
K_m: analytical sensitivity for a mass per particle calibration
K_N: analytical sensitivity for a number concentration calibration
K_R: ICP-MS analytical sensitivity (slope of a calibration with signal intensity in cps vs. element mass concentration)
LOD: limit of detection
LOD_{dis}: dissolved element mass concentration limit of detection
LOD_{mass}: mass per particle limit of detection
LOD_{number}: number concentration limit of detection
LOD_{size}: size limit of detection
N_{Av}: Avogadro number
M_M: atomic mass of element M
m: number of baseline readings
m_P: mass of element per particle
n: threshold coefficient
Q_{sam}: sample introduction flow rate
S: net signal ($Y - Y_B$)
S_C: net critical value
S_D: net minimum detectable value
$S_{\overline{D}}$: net mean intensity of a baseline
S_P: net intensity of a particle event
S_{Pi}: individual net intensity record along a transient particle event
S_{Pmax}: maximum net intensity of a transient particle event
t_{dwell}: dwell time
t_i: acquisition time
w: base width of a transient particle event
X_C: concentration critical value or limit of decision
X_C^{mass}: mass per particle critical value
X_C^{size}: size critical value
X_C^{number}: number concentration critical value
X_C^{dis}: dissolved element mass concentration critical value
X_D: limit of detection
X_D^{mass}: mass per particle limit of detection
X_D^{size}: size limit of detection
X_D^{number}: number concentration limit of detection
X_D^{dis}: dissolved element mass concentration limit of detection
X^N: particle number concentration
X^M: mass concentration
X^D: mass concentration of dissolved element
Y: signal
Y_B: blank signal or mean intensity of a blank baseline
Y_C: critical value
Y_D: minimum detectable value
$Y_{\overline{D}}$: gross mean intensity of a baseline
Y_N: number of particle events
$Y_{N,\ B}$: mean number of events counted in blanks
$Y_{R,\ B}$: mean blank baseline intensity expressed as count rate
ΣY_B: total blank baseline number of counts recorded during the acquisition time t_i
Y_R: ICP-MS signal expressed in counts per time unit
α: probability of false positive
β: probability of false negative
ε: threshold security term
η: analyte transport efficiency
ξ: flicker noise coefficient
ρ: particle density
σ: standard deviation
σ_B: standard deviation of a blank signal Y_B
$\sigma_{\overline{B}}$: standard deviation of the mean intensity of blank baselines
$\sigma_{N,B}$: standard deviation of the number of particles events in blanks $Y_{N,\ B}$

CHAPTER TWO

Single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry for the analysis of inorganic engineered nanoparticles: Metrological and quality issues

Francisco Laborda*, Ana C. Gimenez-Ingalaturre, and Eduardo Bolea
Group of Analytical Spectroscopy and Sensors (GEAS), Institute of Environmental Sciences (IUCA), University of Zaragoza, Zaragoza, Spain
*Corresponding author: e-mail address: flaborda@unizar.es

Contents

1. Introduction 35
2. Signal and information domains in SP-ICP-MS 37
   2.1 SP-ICP-MS signals 37
   2.2 Analytical information domains and measurands in SP-ICP-MS 39
   2.3 Moving from the signal to the information domains: Calibrations 40
3. Quality in SP-ICP-MS 43
   3.1 Calibration and traceability 44
   3.2 Method validation 47
   3.3 Uncertainty 56
   3.4 Quality control 57
References 64

1. Introduction

Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) is one of the leading techniques in atomic spectrometry originally developed for providing isotopic and total element information. However, when it is used at very high, continuous data acquisition frequency with sufficiently dilute suspensions, ICP-MS becomes a particle counting technique, delivering information on a particle-by-particle basis [1–3]. Although the origins of single

Comprehensive Analytical Chemistry, Volume 93
ISSN 0166-526X
https://doi.org/10.1016/bs.coac.2021.02.012
Copyright © 2021 Elsevier B.V.
All rights reserved.

particle ICP-MS (SP-ICP-MS) can be traced back to the end of the previous century [3], a seminal paper by Degueldre and Favarger in 2003 [4] outlined the principles behind the technique and showed the feasibility of using ICP-MS for the analysis of colloidal suspensions. However, it has been the application of SP-ICP-MS to the analysis of engineered nanoparticles [5,6], followed by its implementation in commercial ICP-MS instruments [7–9], that have become the driving forces behind its success in recent years.

The theoretical bases of SP-ICP-MS measurements were established by Degueldre et al. [4]. Basically, when a diluted suspension of nanoparticles is introduced into an ICP-MS and an isotope of the element present in the nanoparticles is measured in time resolved mode at high data acquisition frequency ($\geq$100 Hz), a number of events corresponding to individual nanoparticles are obtained over a continuous baseline. The signal intensity of these events is proportional to the mass of element in the nanoparticle, and hence to its size if additional information about the composition, density and shape of the nanoparticle are available, whereas the frequency of events depends on the nanoparticle number concentration. Subsequently, Laborda et al. [5] revealed that information about dissolved forms of the element measured could be obtained from the baseline. Thus, SP-ICP-MS can provide different types of analytical information: (i) qualitative information about the presence of nanoparticulate and dissolved forms of specific elements; (ii) characterization information about the mass of element/s per nanoparticle, which can be converted into nanoparticle size as long as information about the composition, shape and density of the nanoparticles is known or assumed; (iii) quantitative information as number concentration of nanoparticles, as well as mass concentrations of the dissolved and nanoparticulate forms.

As any other chemical measurement, those performed by using ICP-MS instruments in single particle mode require an understanding of the fundamentals underlying the technique for developing fit-for-purpose methods to obtain the intended results. On the other hand, the special features of nanoparticles as analytes have a strong influence on the metrology and quality in SP-ICP-MS. Thus, this chapter has been structured around two topics: (i) the metrological aspects of the technique, discussing the roadmap from the SP-ICP-MS signal to the different types of analytical information and measurands available, paying special attention to the different calibrations needed, and (ii) the quality issues related to the analysis by SP-ICP-MS, namely traceability, method validation, uncertainty, and quality control.

2. Signal and information domains in SP-ICP-MS

Compared to typical quantitative measurement processes, such as those carried out in standard ICP-MS, which involve a unidimensional signal and the mass concentration domain, signals in SP-ICP-MS are more complex and they have to be processed in a number of ways to obtain more extensive analytical information from different domains.

2.1 SP-ICP-MS signals

SP-ICP-MS measurements are performed in time resolved mode, producing bidimensional signals (Fig. 1A), where the intensity of individual

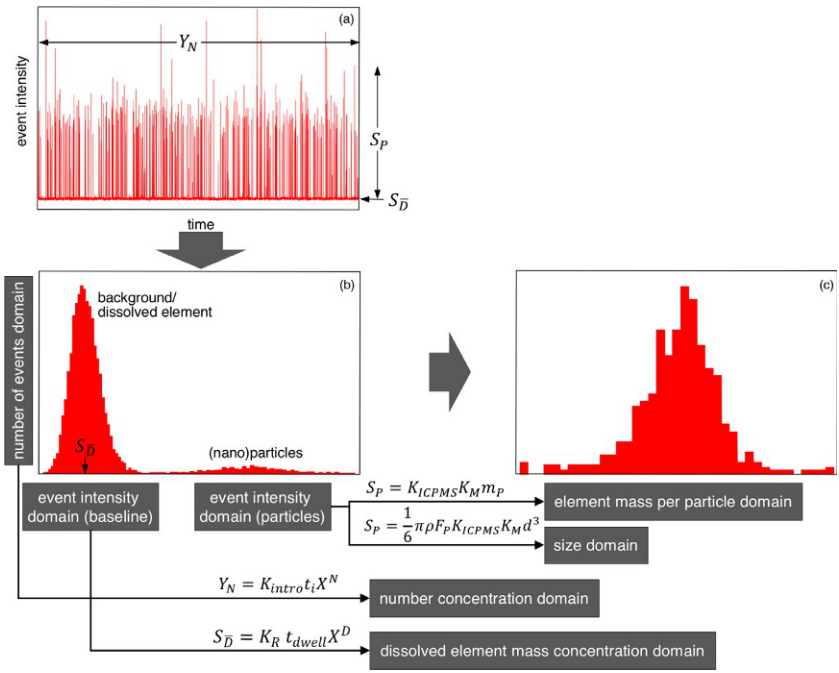


Fig. 1 Signal and information domains in SP-ICP-MS. (A) Time scan of a particle suspension containing dissolved forms of the element contained in the particles. (B) Event intensity frequency histogram of data from (A). (C) Size (or element mass per particle) distribution of nanoparticles calculated from the second intensity distribution in (A). The equations included allow the transformations from the signal to the corresponding information domains and are the basis of the different calibrations in SP-ICP-MS. *F. Laborda, A.C. Gimenez-Ingalaturre, E. Bolea, J.R. Castillo, About detectability and limits of detection in single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, Spectrochim. Acta B At. Spectrosc. 169 (2020) 105883. Copyright 2020 Elsevier.*

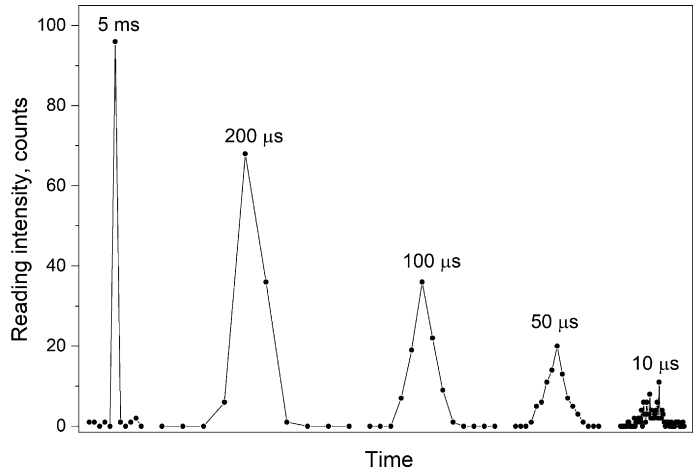


Fig. 2 Profiles of particle events recorded at different dwell times for 50 nm gold nanoparticles (averaged total intensity per particle event: 96 counts). Time scale for 200, 100, 50 and 10 μs: ×100. *F. Laborda, A.C. Gimenez-Ingalaturre, E. Bolea, J.R. Castillo, About detectability and limits of detection in single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, Spectrochim. Acta B At. Spectrosc. 169 (2020) 105883. Copyright 2020 Elsevier.*

readings (usually expressed in counts) is plotted against time and the output is a sequential chart of individual particle events superimposed above a continuous baseline. Depending on the dwell time selected, which controls the acquisition frequency, particle events are recorded as pulses (one-reading events) or peaks (several-readings events). Because the duration of nanoparticle events are in the range of 300–1000 μs [10,11], when using dwell times in the millisecond range (3–10 ms) events are recorded as pulses, whereas for dwell times in the microsecond range (10–200 μs), they are recorded as peaks (Fig. 2). The intensity of each particle event is due to the ions detected from each particle and it is quantified as the sum of the individual readings along the event. Thus, the total intensity of an event (measured in counts) is independent of the dwell time, whereas the maximum of the peak decreases with dwell time.

With respect to the baseline, it is due to the background at the mass recorded or to the presence of dissolved forms of the element measured. The noise associated to the baseline is related to the detector of the mass spectrometer, following a Poisson behaviour for secondary electron multipliers currently used in quadrupole and double focusing spectrometers, whereas microchannel plate detectors used in time-of-flight instruments show compound Poisson-distributed noise [12].

Raw time scans can be processed by plotting the event intensity against their frequency, obtaining histograms as shown in Fig. 1B, where the first distribution is due to the background and/or the presence of dissolved forms of the element measured and the second to the nanoparticles themselves. This differentiation may not be so evident and more robust criteria for discrimination of baseline and particle events must be applied, which also have implications on the detection capability of the technique.

Discrimination of particle from baseline events can be accomplished by focusing on the baseline but also on the particles. When particle events are recorded as pulses, the use of a threshold criterion related to the baseline is imperative; however, when they are recorded as transient signals, approaches similar to those applied to the detection of chromatographic peaks can be used [9,13]. When particle events are recorded as pulses, they can be discriminated from baseline readings by applying an iterative algorithm based on the standard deviation of the baseline. A 3-sigma criterion was proposed by Pace et al. [6], although coefficients up to 8 have been applied. Recently, Laborda et al. [14] have demonstrated that a 5-sigma criterion avoid the occurrence of false positives in most acquisition conditions. These algorithms can be implemented by the users, exporting raw data to in-house programs and spreadsheets. A dedicated spreadsheet is freely available from RIKILT (http://www.wageningenur.nl/en/Expertise-Services/Research-Institutes/rikilt/show/Single-Particle-Calculation-tool.htm) for data acquired at milliseconds dwell times. When microsecond dwell times are used, peaks detection algorithms can consider other criteria apart from the baseline threshold, such as the peak width. ICP-MS manufacturers have developed proprietary software for data processing and a program developed by Cornelis is also available freely (Nanocount, http://blogg.slu.se/nanocount/category/description/).

2.2 Analytical information domains and measurands in SP-ICP-MS

Whereas two types of analytes are under the scope of SP-ICP-MS, namely nanoparticles and dissolved species, different measurands can be considered. For dissolved species, the mass concentration of the element monitored is the measurand of interest. For nanoparticles, the primary measurands are the number concentration of particles and the mass of element per particle. When additional information about the shape, composition and density of the particles is available, information about the size of the particles can be obtained, although a spherical shape is commonly assumed and the equivalent spherical diameter is the measurand usually reported. Any population

Table 1 Analytes, analytical information domains and measurands involved in SP-ICP-MS.

Analyte	Information domain	Measurand
Dissolved element	Concentration	Mass concentration of dissolved element
Nanoparticle	Concentration	Number concentration
		Mass concentration of nanoparticulate element
	Element content	Element mass per particle
	Size	Equivalent spherical diameter
	Element content distribution	Histogram showing the number of particles for each of a number of defined element content per particle classes
	Size distribution	Histogram showing the number of particles for each of a number of defined size classes

of particles always exhibits more or less broad size distributions, recorded primarily by SP-ICP-MS as element content distributions, whose measurands are histograms showing the number of particles for each of a number of defined size or element content per particle classes, respectively (Fig. 1C). Table 1 summarizes the information domains and the measurands for each of the analytes involved in SP-ICP-MS.

2.3 Moving from the signal to the information domains: Calibrations

In standard ICP-MS, when a solution of an element M of mass concentration (X^M) is nebulized into the instrument, the relationship between the signal Y_R (ions counted per time unit) and the mass concentration can be expressed as [14]:

$$Y_R = K_R\, X^M = K_{intro} K_{ICPMS} K_M X^M \tag{1}$$

where K_R is the analytical sensitivity obtained from a conventional calibration (signal intensity in cps vs. element mass concentration), $K_{intro}(=\eta Q_{sam})$ is a factor related to the sample introduction, where η the analyte transport efficiency and Q_{sam} the sample introduction flow rate, K_{ICPMS} is the detection efficiency, which represents the ratio of the number of ions detected versus the number of analyte atoms of the measured isotope introduced into

the ICP; and K_M ($=AN_{Av}/M_M$) is a factor related to the element measured, where A is the atomic abundance of the isotope considered, N_{Av} the Avogadro number, and M_M the atomic mass of the element.

When a suspension of nanoparticles sufficiently diluted according to the data acquisition frequency is measured in single particle mode, each recorded event represents a single particle [11]. Under such conditions, the number of particle events counted (Y_N) during an acquisition time (t_i) is directly related to the number concentration of particles (X^N):

$$Y_N = K_N\, X^N = K_{intro} t_i X^N = \eta Q_{sam} t_i X^N \tag{2}$$

where K_N is the analytical sensitivity obtained from a number concentration calibration (number of particle events counted vs. number concentration) which is just related to the sample introduction process and the acquisition time, and it is independent of the nature of the nanoparticles if they are nebulized in the same way as dissolved species.

On the other hand, the net intensity of each particle event ($S_P = Y - Y_B$), where Y is the gross intensity and Y_B is the mean intensity of the baseline distribution, (both measured in counts) is proportional to the number of atoms of the element monitored in each detected particle, and hence to the mass of element per particle (m_P):

$$S_P = K_m\, m_P = K_{ICPMS} K_M m_P \tag{3}$$

where K_m is the slope obtained from a mass per particle calibration (net event intensity vs. element mass per particle), which is independent of the nebulization process and depends on the element, assuming that its detection efficiency is the same for the dissolved and particulate element, which might not be the case. Eq. (3) can be related to the size of the particle if the composition, shape and density of the particle are known or assumed. For solid, homogeneous and spherical particles, Eq. (3) can be written as:

$$S_P = K_d\, d^3 = \frac{1}{6}\pi\rho F_P K_{ICPMS} K_M d^3 \tag{4}$$

where K_d is the slope obtained from a size calibration (net event intensity vs. particle diameter cubed), d is the diameter, ρ the density and F_P the mass fraction of the element in the particle. Fig. 1C shows the corresponding mass of element per particle or size distribution.

The mass concentration of dissolved element (X^D), can be calculated from the net mean baseline signal $S_{\overline{D}} = Y_{\overline{D}} - Y_B$, where $Y_{\overline{D}}$ is the gross mean signal corresponding to baseline and Y_B the mean intensity of the

baseline from a blank, all intensities expressed as counts. Considering Eq. (1) expressed in counts by including the dwell time, the mass concentration of dissolved element is related to the net mean baseline signal through:

$$S_{\overline{D}} = K_R \, t_{dwell} X^D = K_{intro} \, K_{ICPMS} K_M t_{dwell} X^D \quad (5)$$

Eqs (2)–(5) are the fundamental expressions to relate the different signal domains in SP-ICP-MS with the corresponding information domains (Fig. 1). First, from the event intensity signal domain, nanoparticles of different sizes (in fact, of different mass of element per particle) are detected, involving the size (or element mass per particle) domain. Transformation from the event intensity signal domain to the size or the element mass per particle domains implies the use of Eqs (4) and (3), respectively. Once the particle events have been detected and counted, the number of events signal domain (Y_N) can be transformed into the number concentration domain through the use of Eq. (2). Finally, the event intensity signal domain corresponding to the baseline events ($S_{\overline{D}}$) must be considered in relation with the dissolved element mass concentrations domain through the use of Eq. (5).

On the other hand, Eqs (2)–(5) are calibration functions which must be obtained through the measurement of the corresponding standards. Whereas dissolved element mass concentration calibration involves conventional elemental standards prepared from dissolved species of the element of concern, number concentration calibration requires nanoparticle number concentration standards that just recently have become available [15]. Alternatively, nanoparticle suspensions of known average diameter and total element concentration are used, although the number concentrations estimated are prone to bias depending on the polydispersity of the nanoparticles. Finally, size or element mass per particle calibration should involve the use of size standards of nanoparticles with the same composition and shape than the nanoparticles under study. Because such standards are just available for certain nanoparticle compositions and not always in a wide range of sizes, indirect calibrations based on the use of dissolved standards of the element of interest are usually applied.

Size and element mass per particle calibration with dissolved standards need further explanation. Looking at Eqs (3) and (4), such indirect calibrations require knowing K_{ICPMS} and K_M. Whereas K_M can be estimated from the parameters involved (A, N_{Av} and M_M), K_{ICPMS} is calculated from a conventional calibration with dissolved standards (Eq. 1), once the analyte transport efficiency and the sample introduction flow rate are known, and

assuming that the element in dissolved and nanoparticulate forms behaves in the ICP in the same way. The sample introduction flow rate can be determined gravimetrically by weighting the amount of water introduced through the nebulization system during a fixed time. For the determination of the analyte transport efficiency, Pace et al. [6] developed two methods based on the use of nanoparticle standards of known number concentration (particle frequency method) or known size (particle size method) as an alternative to the waste collection method. Apart from a size nanoparticle standard, the particle size method needs dissolved element standards to estimate the analyte nebulization efficiency by combination of Eqs (1) and (3). More recently, Cuello-Nuñez et al. [16] have proposed a method based on the dynamic measurement of mass flows for determination of the sample nebulization efficiency, avoiding the use of nanoparticle standards.

A different calibration of element mass per particle/size approach can also be found in literature [6]. It is based on the transformation of a conventional dissolved element calibration (intensity in cps vs. mass concentration) into an intensity per dwell time vs. mass per dwell time calibration. For a given mass concentration, the corresponding intensity per dwell time is equal to the counts recorded during the selected dwell time and the mass per dwell time is equal to $\eta Q_{sam} t_{dwell} X^M$. The particle intensities measured during each dwell time are interpolated into the calibration to obtain directly the mass of the particle when particle events are recorded as pulses (one-reading events) or as the sum of adjacent masses when recorded as peaks (more than one-reading events). With respect to the determination of number concentrations, Eq. (2) is frequently used directly [6], once the analyte transport efficiency has been determined by the particle frequency method and the sample flow rate is known, which should be considered as a 1-point number concentration calibration. Anyway, the calibrations described by Eqs (2)–(5) offer a unified approach to encompass the different information domains covered by SP-ICP-MS.

3. Quality in SP-ICP-MS

The special features of nanoparticles as analytes, together with a number of challenges and drawbacks still unsolved, have a strong influence on the quality of SP-ICP-MS results, as well as establishing metrological traceability of the measurements, method validation, uncertainty analysis and quality control. The following section reviews all these topics and summarizes their current state with respect to the analysis by SP-ICP-MS. The limited

number of validated methods available in literature are also discussed, along with the application of SP-ICP-MS to samples containing nanoparticles and the types and quality of the information achieved.

3.1 Calibration and traceability

The metrological traceability of an analytical result requires a clearly identified sample, measurand, and an established calibration hierarchy with defined uncertainty [17]. In the case of nanoparticles, their identification usually implies obtaining information about their size and their chemical composition that requires different calibration strategies as discussed in the previous section. Whereas electron microscopy involves the visual detection of nanoparticles together with their morphology (size and shape), SP-ICP-MS detects a nanoparticle containing a specific element as a signal event produced by a cluster of atoms of such element. With respect to the measurands associated to nanoparticles determined by SP-ICP-MS, they have been listed in Table 1 and are related to size and concentration.

The first metrological challenge is related to the definition of the size of a nanoparticle, which depends on the technique selected (e.g. transmission electron microscopy measures the bidimensional projection of the particle, whereas dynamic light scattering measures its hydrodynamic diameter), together with the fact that the sizes of nanoparticle populations follow more or less broad distributions. SP-ICP-MS does not provide the direct measurement of the dimensions of a nanoparticle but the content of a specific element. Thus, if the composition and shape of the nanoparticles are determined by another technique, the size can be calculated considering the bulk density of the substance. If this is not the case, a spherical shape and specific composition are commonly assumed, and an equivalent diameter is usually reported. With respect to the measurands related to nanoparticle concentrations, they are reported as number but also as element mass concentrations. Whereas number concentrations are related to counting processes, which are underpinned by the metrological structure of the SI [18], mass concentrations involve approaches similar to those applied in conventional ICP-MS [19]. In any case, the traceability relies on the use of validated methods and appropriate reference materials and standards, which are not always available in the case of nanoparticles, as discussed below.

Table 2 summarizes the reference materials from metrological organizations in the form of nanoparticle suspensions or packed to prepare a suspension directly. Other reference nanomaterials are also available in solid forms,

Table 2 Available nanoparticle suspensions as reference and quality control materials.

Material	Name	Nominal (value assigned) size (nm)	Concentration	Supplier
Au nanoparticles (citrate)	RM8011	10 (8.9 ± 0.1)[b]	51.56 ± 0.23 μg g^{-1}	NIST
	RM8012[a]	30 (27.6 ± 2.1)[b]	48.17 ± 0.33 μg g^{-1}	NIST
	RM8013[a]	60 (56.0 ± 0.5)[b]	51.86 ± 0.64 μg g^{-1}	NIST
	LGCQC5050	30 (32.7 ± 2.0)	$1.47 \times 10^{11} \pm 0.28 \times 10^{11}$ g^{-1} 45.1 ± 1.5 μg g^{-1}	LGC
Ag nanoparticles (PVP) freezed dried	RM8017	75 (74.6 ± 3.8)[b]		NIST
Ag nanoparticles	BAM-N001	20 (19.4 ± 2.2)	100 μg L^{-1}	BAM
Si nanoparticles (cyclohexane) toluene suspension	RM8027[a]	2 (2.20 ± 0.14)	6.43 ± 0.31 μg g^{-1}	NIST
SiO_2 nanoparticles	ERM-FD100	20 (19.4 ± 1.3)		JRC
	ERM-FD304	40 (27.8 ± 1.5)		JRC
	ERM-FD101b	80 (83.5 ± 2.2)		JRC
	ERM-FD102	20 and 80 (18.2 ± 1.6 and 84.0 ± 2.1)		JRC
Polystyrene nanoparticles	SRM1964	60 (60.39 ± 0.63)	0.5% (m/m)	NIST
	SRM1963a	100 (101.8 ± 1.1)	0.5% (m/m)	NIST
	CRM 5721-a	100 (100.5 ± 2.6)	10 mg mL^{-1}	NMIJ
	CRM 5701-a	120 (118.5 ± 1.8)	10 mg mL^{-1}	NMIJ
	CRM 5702-a	100 (157.9 ± 2.0)	10 mg mL^{-1}	NMIJ
	CRM 5703-a	200 (204.0 ± 2.1)	10 mg mL^{-1}	NMIJ

[a]Out of stock.
[b]Reference value measured by TEM.
Adapted from B. Meermann, V. Nischwitz, ICP-MS for the analysis at the nanoscale—a tutorial review, J. Anal. At. Spectrom. 33 (2018) 1432–1468.

although they were not included because of the additional sources of uncertainty derived from the preparation and stabilization of their aqueous suspensions. The table shows the limited availability of reference materials, most of them just certified for size measurands and total element concentration, with only one quality control material reporting nanoparticle number concentrations (LGCQC5050). This situation has led to the use of commercial nanoparticle suspensions as standards, in spite of the fact that values reported for the different measurands are not sufficiently characterized [20].

As it has been stated in the previous section, the different SP-ICP-MS measurands involve the corresponding calibrations, which would require suitable standards with traceable values in order to report metrologically traceable results. In the case of size calibration, the most straightforward approach is based on the use of one or more nanoparticle reference materials with known shape and size and same composition as the targeted nanoparticle. This approach is subjected to fewer analysis variables [20], allowing to obtain directly the coefficient K_d in Eq. (4). In the case of number concentration, direct calibration for obtaining the coefficient K_N (Eq. 2) should require the use of one or more number concentration reference materials like LGCQC5050 which is directly value assigned for number concentration. Reference materials value assigned for known element mass concentration and mean particle diameter can be used to derive a reference value for number concentration if it is assumed that only particulate species are present. Alternatively, size calibration coefficients can be calculated from a calibration with dissolved element standards, once the analyte transport efficiency and sample flow rate are known (Eq. 4), whereas for the number concentration calibration coefficient, just the analyte transport efficiency and the sample flow rate are needed (Eq. 2), as has been discussed above.

In the present conditions, when size or number concentration standards are not used directly for calibrations, determination of the analyte transport efficiency using any of the methods already discussed in the previous section is required. Whereas the particle frequency method is in fact a number concentration calibration, the particle size method requires dissolved and size nanoparticle standards of the element involved. Only the dynamic mass flow (DMF) method does not rely on an artefact standard (i.e. reference material or certified reference material) and is determined by dynamically weighing the difference between the mass of sample introduced to through the nebulizer and the mass of sample collected as waste. However, the DMF method can only be applied if there is no fractionation of the nanoparticles between the aerosol reaching the plasma and the suspension going to waste.

Isotopic dilution analysis can also be used to improve the calibration of SP-ICP-MS results. Addition of isotopically enriched ^{109}Ag solution has been used for determination of the mass of silver per nanoparticle and hence its equivalent diameter [21,22], avoiding the need of external calibration but still requiring the determination of the nebulization efficiency.

3.2 Method validation

SP-ICP-MS methods must be properly validated through their specific performance characteristics, which must be conveniently adapted to the peculiarities of nanoparticles, as it has been proposed by Linsinger et al. for the detection and quantification of engineered nanoparticles in food [23]. Performance parameters, like limits of detection (LOD), working range, precision or trueness, must be applied to mass/number concentrations, but also to particle size. A number of SP-ICP-MS methods, summarized in Table 3, have been validated following different approaches. Most of the cases involve the addition of nanoparticles to different matrices, such as chicken meat [25], fruit juices [26] or human blood [28], although validation of SP-ICP-MS methods for the size characterization and quantification of TiO_2 nanoparticles present in human tissues [29] and metallic silver nanoparticles (as E-174 food additive) in confectionery [27] have been also reported. It should be noted that the evaluation of trueness in all these methods has to be done by spiking control samples with nanoparticle standards, since no matrix reference materials are still available, as discussed later in this chapter. Validation of the size characterization of gold nanoparticle reference material RM8012 and a series of TiO_2 samples used as food additives (E-171) [24] were carried out directly by comparison with other techniques [20].

In the case of the fruit juices [26], control samples were spiked with commercial nanoparticles of known size and mass concentration and only diluted prior to measurement without any additional sample preparation. Selectivity, calibration range, LOD, bias and precision were studied following the German Society for Toxicological and Forensic Chemistry's guideline. Considering the determination of particle size, calibration with nanoparticle standards was possible (bias $<15\%$), although small sizes and low concentrations might result in less accurate results (bias $>30\%$ for 20 nm Au nanoparticles and precision reaching up to 50%). Authors stated that calibration with dissolved element standards showed lower bias and precision for lower sizes and worked for bigger sizes as well (bias and precision $<10\%$ in most cases),

Table 3 Validated SP-ICP-MS methods and their reported performance parameters.

Samples	Analyte	Linearity	Selectivity	Trueness (%)	Repeatability (%)	Reproducibility (%)	LOD_{size} (nm)	LOD_{number} (L^{-1})	LOD_{mass}	Stability	Ref.
Nanomaterials											
RM 8012	Au NP (30 nm)			Bias <1 (S)	3 (n = 3)						[20]
Pristine E-171 food additive	TiO_2 NP			Recovery 107 (S) 96 (NC)	4.9 (S) 18 (NC) 17 (MC) (n = 3)	8.2 (S) 13 (NC) 23 (MC) (n = 5)	39	2000	50 ng L^{-1}		[24]
Foods											
Chicken meat spiked with NPs	60 nm Ag NP (5–25 mg kg^{-1})	Up to 50 mg kg^{-1}	Analysis of 21 blanks	Recovery 98–99 (S) 91–95 (NC) 98–101 (MC)	<2 (S) <11 (NC) (n = 7)	<6 (S) <16 (NC) (n = 3)			0.1 mg kg^{-1}	3 weeks at 4 °C (digested sample) Not stable (diluted digestions) Not stable (spiked material)	[25]
Fruit juice spiked with NPs	Ag NP Au NPs (different sizes)	Up to 100 nm (Ag NP) 80 nm (Au NP)	No isobaric interferences No interferences from dissolved ions	Bias (S) <14.3 (Ag) <32.7 (Au) bias (NC) 11–73 (Ag) −11-19 (Au)	–	<25 (S) (Ag) <70 (NC) (Ag) <50 (S) (Au) <20 (NC) (Au) (n = 6)	31–34			21 days (Ag) and 7 days (Au) in orange juice	[26]
E-174 food additive and confectionery samples containing E-174	Ag NPs	Up to 2.5 µg L^{-1}	No effect of carbohydrates concentration	Bias <−0.8 (S) −50 (NC)	<4–6 (S) 20 (NC) (n = 3)	1.5–8 (S) 12–27% (NC) (n = 5)	9	0.5 to 1.2×10^7	10 ng L^{-1}		[27]

Biological samples											
Human whole blood spiked with NPs	Ag NP Au NP (30, 50, 100 nm)	Up to 100 nm	No isobaric interferences No interferences from dissolved ions	Bias (S) <−5 (Ag) <−2 (Au) bias (NC) <80 (Ag) <50 (Au)	<3.4 (S) (Ag) <12.9 (NC) (Ag) <1.0 (S) (Au) <8.1 (NC) (Au) (n = 3)	<5.2 (S) (Ag) <16 (NC) (Ag) <1.8 (S) (Au) <25 (NC) (Au) (n = 3)	30			14 days stored at 2–8 °C	[28]
Human tissues of liver and spleen	TiO_2 NP	Up to 500 nm Up to 0.3 mg kg^{-1}	No polyatomic interferences Analysis of 8 blanks	Recovery 32 ± 7	<29 (S) <20 (NC) (n = 2)	<24 (S) <46 (NC) (n = 2)	50	88,000	0.005 mg kg^{-1}	2 days	[29]

(S): size determination, (NC): number concentration determination, (MC): mass concentration determination.

so calibration with nanoparticle standards would not be mandatory (except for the determination of the transport efficiency). With respect to the determination of number concentrations, bias >30% was reported for 30 nm silver nanoparticles. The stability of the nanoparticles in the juices was also studied, with variations >15% in size and concentrations after 4 and 7 days for silver and gold nanoparticles, respectively. In general, bias and precision of particle concentrations strongly depended on particle stability. A similar approach was followed for the analysis of silver and gold nanoparticles in human whole blood [28], with better results in terms of size bias and reproducibility, as shown in Table 3.

Validation of a method for sizing and quantification of 60-nm silver nanoparticles at concentrations of 5–25 $mg\,kg^{-1}$ in chicken meat showed good performance with respect to trueness (98–99% for size, 91–101% for concentration), repeatability (<2% for size, <11% for concentration), and reproducibility (<6% for size, <16% for concentration). The response of the method was linear, and a LOD of 0.1 $mg\,kg^{-1}$ was obtained. Additional experiments showed that the method was robust and digestates were stable for 3 weeks at 4 °C, although once diluted, the stability of the suspensions was limited. Finally, it was shown that silver nanoparticles in chicken meat was not stable, since silver nanoparticles dissolved and were transformed into silver sulphide [25]. A method for the detection and quantification of Ti-bearing nanoparticles in human tissue have been also validated for particle size and both number- and mass-based concentrations [29]. Detection limits for TiO_2 particles were 0.005 mg Ti kg^{-1} with a size LOD of 85 nm, a reproducibility of 39% for titanium dioxide concentration and 24% for particle size. In the case of pristine food additives E-171 (titanium dioxide) [24], the size LOD was 39 nm, with a mass LOD of 50 $ng\,L^{-1}$ after materials were dispersed in ultrapure water by sonication, and reproducibility values lower than 10% in size and 23% in particle mass concentration. The validation of a method for the characterization of silver nanoparticles in E-174 food additive and in products containing E-174 reported reproducibility values from 1% to 8% in size and from 12% to 27% for nanoparticle concentrations, depending on the type of sample. This method also included a study about the uncertainties of the sample preparation, analysis and data interpretation, all around 6% as standard uncertainty.

A method for detection of silver and gold nanoparticles for screening purposes has also been validated and applied to food samples containing metallic additives [30]. Gold, silver and aluminium particles over 25, 31 and 81 nm could be detected in a food matrix, at number concentrations

over ca. 200 particles per mL. Sensitivity and specificity values, which quantify the ability of the method to recognize truly positive and negative test samples, of 81% and 97% were reported, respectively.

3.2.1 Selectivity

Selectivity should be checked against other matrix constituents, other types of nanoparticles and also with respect to different varieties of the same type of nanoparticles (e.g. with different size, shape and/or surface properties) [23]. Although samples often must be diluted to a large extent to prevent coincident particle events, the sample matrix may still interfere with the nebulization because of differences in droplet surface tension and particle surface properties. Changes in the nebulization efficiency may lead to bias on the particle number concentration, whereas changes in the ionization affect particle size. These effects have been studied by the determination of the particle concentration and particle size of 60 nm Au NPs in water containing different matrix components such as sodium dodecyl sulphate (SDS), methanol, sodium chloride, Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) and liver digest [31]. Larger effects were found on the particle concentration (SDS and DMEM being the most serious ones), whereas just NaCl caused some effects on particle size. Other authors have consider the possible polyatomic interferences and the analysis of a chemical blank on each day for selectivity evaluation [29] or sample blanks, such in the case of chicken meat [25].

3.2.2 Precision

The repeatability and reproducibility have been determined on both size and number concentration by the analysis of a variable number of samples or spiked blanks following different schemes, as shown in Table 3. In general, repeatability values around 5% in size and 20% in number concentration have been obtained. These values increase when reproducibility is consider, being larger for number concentration (higher than 10% in all cases, with values up to 70% for Ag NPs in fruit juices [26]). In an interlaboratory study involving the analysis of chicken meat homogenate spiked with 60 nm silver nanoparticles [32], sample preparation did not seem to have influence on the precision of size determination (reproducibility between 15% and 25%). On the other hand, determination of the nanoparticle number concentration was significantly less precise, with reproducibility standard deviations of 70% and 90%.

The study of between-day reproducibility of particle size determination of silver nanoparticles in food products [27] revealed that neither sample preparation nor sample dilution were the driving factors in this parameter, but data processing in relation to the discrimination between baseline and nanoparticle readings, due to the high baseline levels due to dissolved silver and the low number of particles detected was an important factor. In fact, deciding on the limit of particle detection in the case of overlapping distributions between baseline and particle signals is a non-negligible source of variation, since these authors consider that no single algorithm for discrimination works for all types of nanoparticle-matrix combinations. However, sampling and sample preparation contributed more to repeatability in the case of particle concentration than dilution and measurement. They conclude that the precision of SP-ICP-MS concentration analyses is mainly related to the type of matrix.

When comparing the repeatability and reproducibility obtained with the value predicted by the Horwitz ratio, satisfactory results were obtained in the analysis of titanium dioxide particles in human tissues, at concentration levels in the order of 0.01 mg Ti kg^{-1} [29], where the predicted values were 24% and 48% for repeatability and reproducibility, respectively.

3.2.3 Trueness

The lack of certified reference material for nanoparticles in any type of matrix forces the use of recovery tests with matrix-free reference materials or properly characterized commercial nanomaterials for the evaluation of trueness. These recovery tests, based on the spike of nanoparticles, must test not just the recovery of the mass added, but also that the particle size and the particle size distribution remain unchanged, by comparison with nominal median diameter and/or concentration of the spiking standards. For instance, Ag and Au nanoparticles spiked in human whole blood have been used for the study of both particle size and number concentration trueness [28]. In general, bias around −20% were obtained for particle size, whereas number concentration bias as high as +80% were reported. Bias also reflects the problems associated with discrimination of baseline signals from those of small particles and likely partial dissolution processes. Besides, the lack of size standards for some type of nanoparticles, such as TiO_2 that are not spherical in shape, make it impossible to evaluate the trueness for size determination [29], as previously discussed. Also, the instability of the spiked standard in the samples may lead to recoveries as low as 32% [33].

In any case, the confirmation of the results by independent methods is highly recommended when possible. When using electron microscopy, good agreement can be found for the median particle size when compared to the Feret diameter [24], although differences on size distributions can be observed, as reported by Montoro et al. [20] when comparing SP-ICP-MS with high resolution scanning electron microscopy for the analysis of a reference material. SP-ICP-MS broader distributions may be explained by incomplete ionization of the NPs in the plasma, ion counting errors, split events, and coincident particle events. Large tails may be ascribed to differences in the fundamental principles of each method (two dimensional projections vs. mass per particle and assumption of spherical shape). These results point out that the evaluation of the comparability between size distributions is much more challenging than the robust central tendency.

3.2.4 Limits of detection

Given the particularities of SP-ICP-MS, there are not expressions widely accepted to express the limits of detection in the different domains covered by SP-ICP-MS. Recently, Laborda et al. [14] have proposed an harmonizing approach to calculated LODs for validation purposes.

3.2.4.1 Size limits of detection

Discrimination of particle events from the baseline relies on signal to noise ratio approaches and hence most widely applied criteria for calculation of particle size limit of detection are based on using multiples of the baseline standard deviation (n-sigma criterion). Although expressions found in SP-ICP-MS publications are based on the use of 3- to 7-sigma criteria [29], these authors have justified the use of a 5-sigma criterion on a routine basis [14]. In general, size LODs depend on different factors, such as the concentration of the dissolved element, the polyatomic interferences, the way the signal of the dissolved element from the particle signal is subtracted or the type of mass spectrometer (e.g. single vs. triple quadrupole) [34]. Different size LODs have been reported for different nanomaterials and a comprehensive list of size LODs for metallic and oxide nanoparticles using a commercial quadrupole instrument under typical experimental conditions can be found in [14]. Best values (<5 nm) were obtained for elements with negligible baseline signals (such as lanthanides), but LODs around 10 nm and larger were calculated for most common nanoparticles at 100 μs dwell times.

Size LODs have also been calculated from the calibration curves of both particle and dissolved calibration following method validation guidelines for conventional analytes, like in the validation of methods for measuring silver and gold nanoparticles spiked in human blood [28] and fruit juices [26]. Calculating the LOD from particle calibration yielded values of approximately 30 nm, although 20 nm Au nanoparticles could be still detected with sufficient accuracy, which suggest that calculation from the particle calibration curve overestimated the limit, likely due to the lack of sufficiently characterized standards in the lower nanometre range. Using dissolved element calibration data, the LODs for both gold and silver were around 3–6 nm, whereas applying a blank method based on the standard deviation of 10 replicate measurements of a blank resulted in much lower and unrealistic values about 0.6–2 nm. Thus, it can be stated that conventional procedures for concentration LOD cannot be used interchangeably for size LOD and an harmonized procedure for its determination should be adopted [14].

3.2.4.2 Number concentration limits of detection

The number concentration LOD depends on the number of particles events detected in a blank. In an ideal Poisson counting process with zero blank, the signal limit of detection can be rounded to 3 counts. Thus, the number concentration LOD is associated to the capability of counting three nanoparticle events, which can be expressed according to Eq. (2) as [14]:

$$LOD_{number} = \frac{3}{\eta Q_{sam} t_i} \tag{6}$$

Therefore, number concentration LOD depends on the sample introduction to the ICP-MS and the acquisition time, so it can be enhanced by improving nebulization efficiency, increasing the sample flow rate, and/or using longer acquisition times. LOD values of 100 particles per mL have been reported [14] with acquisition times of 60 s, using a cyclonic spray chamber and a concentric nebulizer. The use of a high efficiency nebulizer did not improve these results (500 particles per mL) since the higher transport efficiency achieved was compensated by the lower flow rate used.

Under ideal counting conditions where no particles are detected in a blank, the limit of quantification requires counting 100 particles [35]. Thus, the number concentration limit of quantification can be defined as:

$$LOQ_{number} = \frac{100}{\eta Q_{sam} t_i} \tag{7}$$

which means the minimum limits of quantification around 3000 particles per mL could be achieved for 60 s acquisition time.

In complex samples, matrix-matched 60 nm silver nanoparticles at low concentration level ($0.5\,mg\,kg^{-1}$) [25] have been used to determine the mass LOD and LOQ of silver nanoparticles in chicken meat. LOD was calculated as 3 times the standard deviation obtained at the quoted concentration level, reporting values of $0.07\,mg\,kg^{-1}$. In this case, LOQ was $0.1\,mg\,kg^{-1}$. In human tissues [29], LOD for TiO_2 nanoparticles was $0.005\,mg\ TiO_2\ kg^{-1}$ for 100 nm nanoparticles. LOQ was calculated as the LOD + 10σ, which gave a value of $0.01\,mg\ TiO_2\ kg^{-1}$.

3.2.5 Measurement range

The number concentration measurement range in SP-ICP-MS is limited by its own definition, since nanoparticle events must be due to only one nanoparticle and the occurrence of multiple particle events must be avoided because linearity with respect to number concentration is progressively lost. The probability of one or more than one nanoparticles being detected during a fixed period of time is predicted by Poisson statistics and increases at higher number concentrations, although in the last instance it also depends on the flux of nanoparticles through the plasma and the dwell time [11]. The occurrence of events due to two or more nanoparticles is expected to be significant, as predicted by Poisson statistics which estimates the probability of one or more than one nanoparticle arriving at the plasma during a fixed period of time [11]. Thus, measurement ranges depend on the nebulization system and the range of dwell times (milli or microseconds) used.

With conventional nebulization systems, linear ranges up to $10^7\ L^{-1}$ can be achieved at millisecond dwell times, which can be increased one order of magnitude working at microsecond dwell times. Although many authors report concentration ranges in mass, number concentration is more adequate since mass ranges assume information about the shape, composition and density of the particles.

The linearity of size measurement ranges can be limited by the incomplete vaporization of large particles in the plasma depending on their nature [36], and also by the fact that particles larger than 2–5 μm are transported into the plasma with lower efficiency [37]. Besides, particles in micrometre range can produce a signal intensity that is outside the linear range of the detector [31]. In the case of gold nanoparticles a linear size range up to 150 nm have been reported, whereas for SiO_2 it can increase up to 1000 [38] or 2000 nm [31].

3.3 Uncertainty

A key issue related to traceability and method validation is the evaluation of the uncertainty associated to the results. Montoro et al. [20] evaluated the expanded uncertainty associated with the determination of size by SP-ICP-MS, combining the estimated uncertainties for each component of the measurement process. Values of 0.8 (3%) and 7.6 nm (13%) were obtained for RM 8012 and 8013 (citrate-stabilized nanoparticles with nominal diameters 30 and 60 nm), respectively. The uncertainty associated with the determination of the particle size of RM 8013 was significantly higher due to the large associated uncertainty of RM 8012 size used for the calibration, being the major uncertainty component, which emphasize the importance of using well-characterized nanoparticle standards for SP-ICP-MS calibration, although the use of multiple point calibration can reduce its impact. The evaluation of SP-ICP-MS by using the silver nanoparticle reference material NIST 8017 has demonstrated that calibration of the ICP-MS response using dissolved Ag and the quantification of transport efficiency are the two main sources of uncertainty [33]. Uncertainty has been also calculated considering the standard deviation of the results and the number of measurements, together with the combined uncertainty of the size determination by other techniques used for comparison of the results, such as transmission electron microscopy (TEM) [27]. In this case, relative expanded uncertainty ($k = 2$) values were similar to the value obtained by TEM for aqueous suspensions of NM-300 K silver nanoparticles material (12%).

Expanded uncertainty has been also studied for nanoparticle number concentrations. Relative expended uncertainty values ($k = 2$) around 15% have been reported for 100 nm Au nanoparticles [16], with the transport efficiency (determined by the particle frequency method) as the main contribution factor, given the dependency in its calculation to the size, mass concentration and density of the nanoparticle standard. These uncertainty levels were reduced to 10% when the dynamic mass flow method was used for determination of the nebulization efficiency [16], similar to those values obtained with other techniques such as particle tracking analysis, though biases in the DMF method and applicability to the variety of sample introduction systems available to ICP-MS, have not been widely studied.

The study of the uncertainty in complex samples, which requires a sample preparation step prior to analysis, has followed a top-down approach. Expanded uncertainties values of 16% have been reported for silver nanoparticles sizing in E174-containing food products, increasing up to 23% in

E174 itself [27]. Large silver background concentrations combined with a relatively low number of nanoparticles found in the additive justified this difference, making data interpretation more challenging than in the products. The standard uncertainty related to sample preparation was similar to the analysis itself or the data interpretation (around 5–6% for triplicate analysis). The expanded measurement uncertainty related to the number concentration determination of silver nanoparticles increased up to 25–45% in complex samples, such as silver-coated chocolates containing E-174, and up to 55% for mass concentration in E-171 pristine products [24].

3.4 Quality control

Analysis involving nanoparticles by SP-ICP-MS are far from being considered routine when compared to conventional analytes and other well-stablished analytical techniques. In this regard, nanoparticles, as physicochemical species, can be considered in the realm of speciation analysis [39], sharing the current difficulties and limitations in this field. Additional complications arise due to the fact that nanoparticle measurands can be matrix-dependent and dynamic, responding to various processes such as aggregation, dissolution and surface modification [2]. All this means that conventional quality control procedures may not always being applied in SP-ICP-MS analysis. Whereas the analysis of blanks, duplicates or blind samples can be easily implemented, the use of reference materials is limited to those available from different organizations in the form of pristine nanoparticle suspensions (Table 2), because matrix reference materials are still not available due the long-term stability problems derived from the complexity of most of the matrices [40]. Alternatively, nanoparticle suspensions of different compositions, sizes and coatings are available from different manufacturers, as well as from the nanomaterial repository of the Join Research Centre of the European Commission (https://ec.europa.eu/jrc/en/scientific-tool/jrc-nanomaterials-repository), being commonly used under matrix-free conditions, as well as spiked directly into the samples.

The analysis of nanoparticle standards in ultrapure water allows the assessment of accuracy related to the calibration processes. When more complex suspension media are used instead (e.g. test media in (eco)toxicological assays), information about interferent effects and transformation of the nanoparticles (e.g. dissolution, aggregation) can be detected. In view of all the above-mentioned limitations, the spiking of natural matrix samples with nanoparticle standards can be considered as the rule of thumb for

quality control in SP-ICP-MS. However, the conclusions derived from these analyses may also be misleading, because the nature of the spiked nanoparticles is not necessarily the same as the particles in the sample. This has led the analysis of samples by alternative techniques as the ultimate strategy to confirm the validity of the results obtained. The quality control problems discussed above can be particularized for the different measurands considered (Table 1). Whereas the mass concentration of dissolved elements can be managed in a similar way to their quantitative determinations by ICP-MS, quality control of size, size distribution and number concentration measurements are prone to difficulties.

Table 4 shows a number of representative cases corresponding to the analysis of samples originally containing nanoparticles (not spiked) and the quality controls performed. Samples comprise consumer products and foods, as well as environmental and biological samples. In relation to the information reported, it included mean particle sizes, particle size distributions and particle number concentrations, as well as particle mass and the dissolved element concentration. In many cases, the determination of total element concentrations by ICP-MS was also performed in order to obtain complementary information of the studied samples.

Regarding the quality control procedures followed, triplicate analyses of the samples were included in most of the studies, whereas just some of them included instrumental, field or method blanks. In general, trueness was evaluated with metal or oxide nanoparticles commercially available, although dissolved elements were also used in some cases. Additions were made to the samples themselves or in the corresponding extracts after sample preparation in most cases, to verify the absence of matrix interferences in the measurement step but also in the sample preparation. Trueness was evaluated by measuring recovery of the spiked nanoparticles, mainly based on particle size and number concentration, but also on mass concentration. In general, recoveries obtained ranged from 70% to 120%, although lower recoveries were also reported. Transmission electron microscopy alone or in combination with energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) were alternative techniques usually selected to confirm the size results obtained [41,43,44,48].

The main challenge in the cases shown in Table 4 lies in the unknown nature of the nanoparticles under study. Whereas in an (eco)toxicological assay or any other type of laboratory study, the composition and concentration of the nanoparticles initially added are known, this is not the case with samples such as those included in Table 4, in which the target analytes are

Table 4 Application of SP-ICP-MS methods to the quantitative analysis of different samples containing element-bearing nanoparticles: Reported information and quality control checks.

Samples	Analyte	Blanks	Matrix effects study	Recovery (%)	Repeatability (%)	LOD_{size} (nm)	LOD_{number} (L^{-1})	LOD_{mass} ($ng\,L^{-1}$)	Reported information	Ref.
Consumer products										
Moisturizing creams	Ag-NP	Method	Ag NP spike	90–117 (NC)	7–11 (S) 5 (NC) (n = 3)	4.5–13	2.5×10^5[a]	–	Mean particle size Particle size distribution Particle number concentration Total element concentration	[41]
Foods										
Foods and drinks	Ti-NP Si-NP Ag NP Al-NP Cu-NP	–	Au NP spike	80–112 (S)	1–5 (NC) (n = 3)	18 (Au) 32 (TiO_2) 30 (Ag) >200 (SiO_2)	–	5 (Au) 50–100 (TiO_2) 100 (Ag)	Mean particle size Particle number concentration Total element concentration Dissolved and particulate fraction	[42]
Environmental samples										
Natural waters	Zn-NP	–	ZnO NP spike	–	10–14 (NC) (n = 3)	8–18	$4\text{-}10 \times 10^5$	–	Mean particle size Mass per particle distribution Particle number concentration Particle mass concentration Dissolved element concentration	[43]
Lake water	Ti-NP	Calibration	TiO_2 NP spike	68–74 (NC)	6 (S) 5 (NC) 9 (MC) (n = 6)	27–29	1×10^5	–	Particle size distribution Particle number concentration Particle mass concentration Total element concentration	[44]
River and coastal waters	Ti-NP, Ce-NP Ag-NP	Field Calibration	–	–	–	–	1.0×10^8 9.2×10^7 8.0×10^6 4.8×10^6	–	Mean particle size Particle size distribution Particle number concentration	[45]

Continued

Table 4 Application of SP-ICP-MS methods to the quantitative analysis of different samples containing element-bearing nanoparticles: Reported information and quality control checks.—cont'd

Samples	Analyte	Blanks	Matrix effects study	Recovery (%)	Repeatability (%)	LOD_{size} (nm)	LOD_{number} (L^{-1})	LOD_{mass} ($ng\,L^{-1}$)	Reported information	Ref.
Rain/snow waters	TiO_2 NP	–	Ionic Ti TiO_2 NP spike	102–103 (MC) 92 (NC)	–	20	–	–	Mean particle size Particle size distribution Particle number concentration Particle mass concentration Total element concentration	[46]
Road runoff sediment	Cd-NP Ce-NP Cu-NP Pb-NP Pt-NP Zn-NP Zr-NP	–	Au NP Pt NP spike	100–150 (MC) 37–49 (NC) 57–130 (MC) 17–57 (NC)	8–13 (S) (n = 3)	35 (Cd) 23 (Ce) 102 (Cu) 27 (Pb) 10 (Pt) 36 (Zn) 39 (Zr)	1.5×10^4 (Cd) 4.5×10^4 (Ce) 3.5×10^5 (Cu) 2.7×10^5 (Pb) 1.4×10^4 (Pt) 1.4×10^4 (Zn) 1.8×10^4 (Zr)	120 (Cd) 26 (Ce) 2950 (Cu) 70 (Pb) 5.2 (Pt) 80 (Zn) 110 (Zr)	Particle mass distribution Mean particle size Particle size distribution Dissolved element concentration Total element concentration	[47]
Biological samples										
Fish tissue	Ag-NP	Method	Ag NP ionic Ag spike	100–107 (MC) 77–84 (NC) 107 (S)	4–9 (MC) 3–6 (NC) 1–2 (S) (n = 5–6)	16	0.4×10^6 1.5×10^6 [a]	–	Mean particle size Particle size distribution Particle number concentration Particle mass concentration	[48]
Marine bivalve molluscs	Ag-NP Cu-NP Ti-NP Zn-NP	–	Ag NP CuO NP TiO_2 NP ZnO NP Au NP spike	85–88 (NC) 81–85 (NC) 91–93 (NC) 79–81 (NC) 94–99 (NC)	5–23 (NC) 6–31 (S) (n = 3)	18.0 (Ag) 23.3 (Cu) 27.0 (Ti) 17.6 (Zn)	–	–	Mean particle size Particle size distribution Particle number concentration Total element concentration	[49]

[a] g^{-1}.
(S): size determination, (NC): number concentration determination, (MC): mass concentration determination.

nanoparticles containing the element of interest. Under such constraints, size information should be provided as equivalent diameters, assuming a specific composition, or as element mass per particle information. On the other hand, if the sample contains nanoparticles below the size (or element mass per particle) limit of detection, size information will be overestimated, whereas number/mass concentrations will be underestimated. This situation may be confirmed when just the tail of the size distribution is obtained or the lower end of the size distribution is similar to the size limit of detection. This was the case in the determination of Zn-bearing nanoparticles in natural waters [43], Ti-bearing nanoparticles in rain and snow waters [46] and Ag-bearing nanoparticles in fish tissues [48] and river and coastal waters [45], where partial distributions were obtained. On the other hand, agreement between the total element content determined by acid digestion and conventional ICP-MS with respect to SP-ICP-MS is a good option for confirmation of the results, as was the case for the determination of Ce, Cd and Pt-bearing nanoparticles in road runoff sediments [47].

Under the conditions described above, the size and concentration information reported cannot be considered quantitative and should be restricted to confirm the presence of nanoparticles containing an element over a certain equivalent diameter and number concentration. These were the main conclusions in the studies about the presence of metal-bearing nanoparticles in foods and drinks [42] or in river and coastal waters [45], in spite of providing quantitative information. Following this approach, Table 5 shows a number of cases where SP-ICP-MS was used just as a screening tool for detection of particles. In these cases, quality control relied on measuring different types of blanks (calibration, matrix, method) and calculation of (equivalent) size and number concentration detection limits. Because the objective of these studies was to obtain qualitative information about the presence/absence of nanoparticles and dissolved species of an element, the information was handled from time scans and mostly from partial size distributions.

Although SP-ICP-MS has proved its capability for providing accurate information about mean sizes, size distributions and number concentrations of pristine nanoparticle suspensions, the detection, size characterization and quantification of metal-bearing nanoparticles in complex samples, like those presented in Tables 4 and 5, are prone to suffer the limitations of SP-ICP-MS. Whereas instrumental constraints may hinder detection of the smallest nanoparticles, hence biasing the quantitative information provided, the

Table 5 Application of SP-ICP-MS methods to the screening analysis of different samples containing element-bearing nanoparticles: Reported information and quality control checks.

Samples	Analyte[a]	Blanks	LOD_{size} (nm)	LOD_{number} (L^{-1})	Reported information (source)	Ref.
Industrial materials						
Tattoo inks	Ti-NP Cu-NP Al-NP	Calibration	–	–	Presence of NP (time scan and NP size distribution)	[50]
Consumer products						
Cosmetics	TiO_2 NP Au NP	Method	35 18	–	Presence/absence of NP	[51]
Antimicrobials	Ag NP	Calibration	12–15	–	Presence of NP (partial NP size distribution)	[52]
Sunscreens	ZnO NP TiO_2 NP	Matrix control	50 25	–	Presence of NP	[53]
Lip balm and toothpaste	TiO_2 NP	Method	–	–	Presence of NP (partial NP size distribution)	[54]
Foods						
Decorating powders candy beads	Au NP Ag NP Al NP	Calibration Method Matrix control	25 28–31 48–81	1.6×10^5 1.5×10^5 2.3×10^5	Presence/absence of NP (time scan)	[30]
Noodles	Al-NP	Method	68 (Al_2O_3)	–	Presence of NP (partial NP size distribution)	[55]

Environmental samples						
Wastewaters	Ag-NP	Calibration	–	–	Presence of NP/dissolved (time scan)	[56]
Waters	Ti-NP	–	148–173 (TiO_2)	–	Presence of NP (partial NP size distribution)	[57]
Waters	Ag-NP	Field	18	–	Presence of NP (time scans and partial NP size distributions)	[58]
Biological samples						
Game meat	Pb-NP	Matrix control	43–80	–	Presence of NP (partial NP size distribution)	[59]
human urine	Ag-NP Ti-NP	Method	8–9 15–18	5.7×10^6 4.3×10^6	Presence of NP (partial NP size distribution)	[60]

[a]M NP: nanoparticles composed of M, M-NP: nanoparticles containing M.

lack of information about the nature of the nanoparticles (composition, shape, density) prevents their sizing. In such difficult cases, the analytical information achievable is severely limited, being restricted to the detection of the presence of nanoparticles containing the element measured.

References

[1] F. Laborda, E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: a powerful tool for nanoanalysis, Anal. Chem. 86 (2014) 2270–2278.
[2] M.D. Montaño, J.W. Olesik, A.G. Barber, K. Challis, J.F. Ranville, Single particle ICP-MS: advances toward routine analysis of nanomaterials, Anal. Bioanal. Chem. 408 (2016) 5053–5074.
[3] D. Mozhayeva, C. Engelhard, A critical review of single particle inductively coupled plasma mass spectrometry—a step towards an ideal method for nanomaterial characterization, J. Anal. At. Spectrom 35 (2020) 1740–1783.
[4] C. Degueldre, P.-Y. Favarger, Colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectroscopy: a feasibility study, Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp. 217 (2003) 137–142.
[5] F. Laborda, J. Jiménez-Lamana, E. Bolea, J.R. Castillo, Selective identification, characterization and determination of dissolved silver(i) and silver nanoparticles based on single particle detection by inductively coupled plasma mass spectrometry, J. Anal. At. Spectrom 26 (2011) 1362–1371.
[6] H.E. Pace, N.J. Rogers, C. Jarolimek, V.A. Coleman, C.P. Higgins, J.F. Ranville, Determining transport efficiency for the purpose of counting and sizing nanoparticles via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, Anal. Chem. 83 (2011) 9361–9369.
[7] O. Borovinskaya, B. Hattendorf, M. Tanner, S. Gschwind, D. Günther, A prototype of a new inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometer providing temporally resolved, multi-element detection of short signals generated by single particles and droplets, J. Anal. At. Spectrom 28 (2013) 226–233.
[8] A. Hineman, C. Stephan, Effect of dwell time on single particle inductively coupled plasma mass spectrometry data acquisition quality, J. Anal. At. Spectrom 29 (2014) 1252–1257.
[9] P.N. Shaw, A. Donard, Nano-particle analysis using dwell times between 10μs and 70μs with an upper counting limit of greater than 3x10 7 cps and a gold nanoparticle detection limit of less than 10nm diameter, J. Anal. At. Spectrom 31 (2016) 1234–1242.
[10] V. Geertsen, E. Barruet, F. Gobeaux, J.-L. Lacour, O. Taché, Contribution to accurate spherical gold nanoparticle size determination by single-particle inductively coupled mass spectrometry: a comparison with small-angle X-ray scattering, Anal. Chem. 90 (2018) 9742–9750.
[11] I. Abad-Álvaro, E. Peña-Vázquez, E. Bolea, P. Bermejo-Barrera, J.R. Castillo, F. Laborda, Evaluation of number concentration quantification by single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry: microsecond vs. millisecond dwell times, Anal. Bioanal. Chem. 408 (2016) 5089–5097.
[12] L. Hendriks, A. Gundlach-Graham, D. Günther, Performance of sp-ICP-TOFMS with signal distributions fitted to a compound Poisson model, J. Anal. At. Spectrom 34 (2019) 1900–1909.
[13] K. Newman, C. Metcalfe, J. Martin, H. Hintelmann, P. Shaw, A. Donard, Improved single particle ICP-MS characterization of silver nanoparticles at environmentally relevant concentrations, J. Anal. At. Spectrom 31 (2016) 2069–2077.

[14] F. Laborda, A.C. Gimenez-Ingalaturre, E. Bolea, J.R. Castillo, About detectability and limits of detection in single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, Spectrochim. Acta B At. Spectrosc. 169 (2020) 105883.
[15] LGC, Statement of Measurement. Colloidal Gold Nanoparticles—Nominal Diameter 30 nm Quality Control Material LGCQC5050, 2020.
[16] S. Cuello-Nuñez, I. Abad-Álvaro, D. Bartczak, M.E. del Castillo Busto, D.A. Ramsay, F. Pellegrino, H. Goenaga-Infante, The accurate determination of number concentration of inorganic nanoparticles using spICP-MS with the dynamic mass flow approach, J. Anal. At. Spectrom 35 (2020) 1832–1839.
[17] R. Koeber, T.P.J. Linsinger, H. Emons, An approach for more precise statements of metrological traceability on reference material certificates, Accredit. Qual. Assur. 15 (2010) 255–262.
[18] R.J.C. Brown, P.J. Brewer, Proposals for nomenclature to clarify the expression of units for counting quantities, Metrologia 52 (2015) L1–L3.
[19] M. Sargent, Traceability in analytical atomic spectrometry: elemental analysis comes full circle, J. Anal. At. Spectrom 35 (2020) 2479–2486.
[20] A.R. Montoro Bustos, K.P. Purushotham, A. Possolo, N. Farkas, A.E. Vladár, K.E. Murphy, M.R. Winchester, Validation of single particle ICP-MS for routine measurements of nanoparticle size and number size distribution, Anal. Chem. 90 (2018) 14376–14386.
[21] L. Telgmann, C.D. Metcalfe, H. Hintelmann, Rapid size characterization of silver nanoparticles by single particle ICP-MS and isotope dilution, J. Anal. At. Spectrom 29 (2014) 1265.
[22] C.A. Sötebier, D.J. Kutscher, L. Rottmann, N. Jakubowski, U. Panne, J. Bettmer, Combination of single particle ICP-QMS and isotope dilution analysis for the determination of size, particle number and number size distribution of silver nanoparticles, J. Anal. At. Spectrom 31 (2016) 2045–2052.
[23] T.P.J. Linsinger, Q. Chaudhry, V. Dehalu, P. Delahaut, A. Dudkiewicz, R. Grombe, F. von der Kammer, E.H. Larsen, S. Legros, K. Loeschner, R. Peters, R. Ramsch, G. Roebben, K. Tiede, S. Weigel, Validation of methods for the detection and quantification of engineered nanoparticles in food, Food Chem. 138 (2013) 1959–1966.
[24] E. Verleysen, N. Waegeneers, F. Brassinne, S. De Vos, I.O. Jimenez, S. Mathioudaki, J. Mast, Physicochemical characterization of the pristine E171 food additive by standardized and validated methods, Nanomaterials 10 (2020) 592.
[25] R.J.B. Peters, Z.H. Rivera, G. Van Bemmel, H.J.P. Marvin, S. Weigel, H. Bouwmeester, Development and validation of single particle ICP-MS for sizing and quantitative determination of nano-silver in chicken meat characterisation of nanomaterials in biological samples, Anal. Bioanal. Chem. 406 (2014) 3875–3885.
[26] M. Witzler, F. Küllmer, A. Hirtz, K. Günther, Validation of gold and silver nanoparticle analysis in fruit juices by single-particle ICP-MS without sample pretreatment, J. Agric. Food Chem. 64 (2016) 4165–4170.
[27] N. Waegeneers, S. De Vos, E. Verleysen, A. Ruttens, J. Mast, Estimation of the uncertainties related to the measurement of the size and quantities of individual silver nanoparticles in confectionery, Materials (Basel) 12 (2019) 2677.
[28] M. Witzler, F. Küllmer, K. Günther, Validating a single-particle ICP-MS method to measure nanoparticles in human whole blood for nanotoxicology, Anal. Lett. 51 (2018) 587–599.
[29] P.J.B. Ruud, U.K. Anna, M. Joost, B. van Greet, M. Sandra, B. Hans, N. Peter, S. Wobbe, L.K. van der Martijn, Development and validation of a method for the detection of titanium dioxide particles in human tissue with single particle ICP-MS, Curr. Trends Anal. Bioanal. Chem. 2 (2018) 74–84.

[30] F. Laborda, A.C. Gimenez-Ingalaturre, E. Bolea, J.R. Castillo, Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry as screening tool for detection of particles, Spectrochim. Acta B At. Spectrosc. 159 (2019) 105654.
[31] R. Peters, Z. Herrera-Rivera, A. Undas, M. Van Der Lee, H. Marvin, H. Bouwmeester, S. Weigel, Single particle ICP-MS combined with a data evaluation tool as a routine technique for the analysis of nanoparticles in complex matrices, J. Anal. At. Spectrom 30 (2015) 1274–1285.
[32] S. Weigel, R. Peters, K. Loeschner, R. Grombe, T.P.J. Linsinger, Results of an interlaboratory method performance study for the size determination and quantification of silver nanoparticles in chicken meat by single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry (sp-ICP-MS), Anal. Bioanal. Chem. 409 (2017) 4839–4848.
[33] J. Liu, K.E. Murphy, M.R. Winchester, V.A. Hackley, Overcoming challenges in single particle inductively coupled plasma mass spectrometry measurement of silver nanoparticles, Anal. Bioanal. Chem. 409 (2017) 6027–6039.
[34] O. Geiss, I. Bianchi, C. Senaldi, G. Bucher, E. Verleysen, N. Waegeneers, F. Brassinne, J. Mast, K. Loeschner, J. Vidmar, F. Aureli, F. Cubadda, A. Raggi, F. Iacoponi, R. Peters, A. Undas, A. Müller, A.K. Meinhardt, E. Walz, V. Gräf, J. Barrero-Moreno, Particle size analysis of pristine food-grade titanium dioxide and E 171 in confectionery products: interlaboratory testing of a single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry screening method and confirmation with transmission electron microscopy, Food Control 120 (2021) 107550.
[35] L.A. Currie, Limits for qualitative detection and quantitative determination: application to radiochemistry, Anal. Chem. 40 (1968) 586–593.
[36] K.-S. Ho, K.-O. Lui, K.-H. Lee, W.-T. Chan, Considerations of particle vaporization and analyte diffusion in single-particle inductively coupled plasma-mass spectrometry, Spectrochim. Acta B At. Spectrosc. 89 (2013) 30–39.
[37] M. Loula, A. Kaňa, R. Koplík, J. Hanuš, M. Vosmanská, O. Mestek, Analysis of silver nanoparticles using single-particle inductively coupled plasma–mass spectrometry (ICP-MS): parameters affecting the quality of results, Anal. Lett. 52 (2019) 288–307.
[38] J.W. Olesik, P.J. Gray, Considerations for measurement of individual nanoparticles or microparticles by ICP-MS: determination of the number of particles and the analyte mass in each particle, J. Anal. At. Spectrom 27 (2012) 1143.
[39] L. Liu, Y. Yin, L. Hu, B. He, J. Shi, G. Jiang, Revisiting the forms of trace elements in biogeochemical cycling: analytical needs and challenges, TrAC Trends Anal. Chem. 129 (2020) 115953, https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115953.
[40] R. Grombe, G. Allmaier, J. Charoud-Got, A. Dudkiewicz, H. Emteborg, T. Hofmann, E.H. Larsen, A. Lehner, M. Llinàs, K. Loeschner, K. Mølhave, R.J. Peters, J. Seghers, C. Solans, F. von der Kammer, S. Wagner, S. Weigel, T.P.J. Linsinger, Feasibility of the development of reference materials for the detection of Ag nanoparticles in food: neat dispersions and spiked chicken meat, Accredit. Qual. Assur. 20 (2015) 3–16.
[41] I. Rujido-Santos, L. Naveiro-Seijo, P. Herbello-Hermelo, M.d.C. Barciela-Alonso, P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Piñeiro, Silver nanoparticles assessment in moisturizing creams by ultrasound assisted extraction followed by sp-ICP-MS, Talanta 197 (2019) 530–538.
[42] I. de la Calle, M. Menta, M. Klein, F. Séby, Study of the presence of micro- and nanoparticles in drinks and foods by multiple analytical techniques, Food Chem. 266 (2018) 133–145.
[43] L. Fréchette-Viens, M. Hadioui, K.J. Wilkinson, Quantification of ZnO nanoparticles and other Zn containing colloids in natural waters using a high sensitivity single particle ICP-MS, Talanta 200 (2019) 156–162.
[44] S. Wu, S. Zhang, Y. Gong, L. Shi, B. Zhou, Identification and quantification of titanium nanoparticles in surface water: a case study in Lake Taihu, China, J. Hazard. Mater. 382 (2020) 121045.

[45] J. Sanchís, J. Jiménez-Lamana, E. Abad, J. Szpunar, M. Farré, Occurrence of cerium-, titanium-, and silver-bearing nanoparticles in the Besòs and Ebro Rivers, Environ. Sci. Technol. 54 (2020) 3969–3978.
[46] A. Azimzada, J.M. Farner, M. Hadioui, C. Liu-Kang, I. Jreije, N. Tufenkji, K.J. Wilkinson, Release of TiO 2 nanoparticles from painted surfaces in cold climates: characterization using a high sensitivity single-particle ICP-MS, Environ. Sci. Nano 7 (2020) 139–148.
[47] S. Baur, T. Reemtsma, H.-J. Stärk, S. Wagner, Surfactant assisted extraction of incidental nanoparticles from road runoff sediment and their characterization by single particle-ICP-MS, Chemosphere 246 (2020) 125765.
[48] N.J. Clark, R. Clough, D. Boyle, R.D. Handy, Development of a suitable detection method for silver nanoparticles in fish tissue using single particle ICP-MS, Environ. Sci. Nano 6 (2019) 3388–3400.
[49] L. Xu, Z. Wang, J. Zhao, M. Lin, B. Xing, Accumulation of metal-based nanoparticles in marine bivalve mollusks from offshore aquaculture as detected by single particle ICP-MS, Environ. Pollut. 260 (2020) 114043.
[50] B. Bocca, E. Sabbioni, I. Micetic, A. Alimonti, F. Petrucci, Size and metal composition characterization of nano- and microparticles in tattoo inks by a combination of analytical techniques, J. Anal. At. Spectrom 32 (2017) 616–628.
[51] I. de la Calle, M. Menta, M. Klein, F. Séby, Screening of TiO2 and Au nanoparticles in cosmetics and determination of elemental impurities by multiple techniques (DLS, SP-ICP-MS, ICP-MS and ICP-OES), Talanta 171 (2017) 291–306.
[52] R. Aznar, F. Barahona, O. Geiss, J. Ponti, T. José Luis, J. Barrero-Moreno, Quantification and size characterisation of silver nanoparticles in environmental aqueous samples and consumer products by single particle-ICPMS, Talanta 175 (2017) 200–208.
[53] B. Bocca, S. Caimi, O. Senofonte, A. Alimonti, F. Petrucci, ICP-MS based methods to characterize nanoparticles of TiO2and ZnO in sunscreens with focus on regulatory and safety issues, Sci. Total Environ. 630 (2018) 922–930.
[54] C. Adelantado, Á. Ríos, M. Zougagh, A new nanometrological strategy for titanium dioxide nanoparticles screening and confirmation in personal care products by CE-spICP-MS, Talanta 219 (2020) 121385.
[55] K. Loeschner, M. Correia, C. López Chaves, I. Rokkjær, J.J. Sloth, Detection and characterisation of aluminium-containing nanoparticles in Chinese noodles by single particle ICP-MS, Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess. 35 (2018) 86–93.
[56] D.M. Mitrano, E.K. Lesher, A. Bednar, J. Monserud, C.P. Higgins, J.F. Ranville, Detecting nanoparticulate silver using single-particle inductively coupled plasma-mass spectrometry, Environ. Toxicol. Chem. 31 (2012) 115–121.
[57] A.K. Venkatesan, R.B. Reed, S. Lee, X. Bi, D. Hanigan, Y. Yang, J.F. Ranville, P. Herckes, P. Westerhoff, Detection and sizing of Ti-containing particles in recreational waters using single particle ICP-MS, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 100 (2018) 120–126.
[58] R. Vogt, D. Mozhayeva, B. Steinhoff, A. Schardt, B.T.F. Spelz, A. Philippe, S. Kurtz, G.E. Schaumann, C. Engelhard, H. Schönherr, D.K. Lamatsch, J. Wanzenböck, Spatiotemporal distribution of silver and silver-containing nanoparticles in a prealpine lake in relation to the discharge from a wastewater treatment plant, Sci. Total Environ. 696 (2019) 134034.
[59] B. Kollander, F. Widemo, E. Ågren, E.H. Larsen, K. Loeschner, Detection of lead nanoparticles in game meat by single particle ICP-MS following use of lead-containing bullets, Anal. Bioanal. Chem. 409 (2017) 1877–1885.
[60] K. Badalova, P. Herbello-Hermelo, P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Piñeiro, Possibilities of single particle—ICP-MS for determining/characterizing titanium dioxide and silver nanoparticles in human urine, J. Trace Elem. Med. Biol. 54 (2019) 55–61.

Analytical Methods

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY

CRITICAL REVIEW

Check for updates

Cite this: *Anal. Methods*, 2021, **13**, 2742

Analytical applications of single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: a comprehensive and critical review

Eduardo Bolea, Maria S. Jimenez, Josefina Perez-Arantegui, Juan C. Vidal, Mariam Bakir, Khaoula Ben-Jeddou, Ana C. Gimenez-Ingalaturre, David Ojeda, Celia Trujillo and Francisco Laborda *

Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS) refers to the use of ICP-MS as a particle counting technique. When ICP-MS measurements are performed at very high data acquisition frequencies, information about (nano)particles containing specific elements and their dissolved forms can be obtained (element mass per particle, size and number and mass concentrations). As a result of its outstanding performance, SP-ICP-MS has become a relevant technique for the analysis of complex samples containing inorganic nanoparticles. This review discusses the maturity level achieved by the technique through the methods developed for the detection, characterisation and quantification of engineered and natural (nano)particles. The application of these methods in different analytical scenarios is comprehensively reviewed and critically discussed, with special attention to their current technical and metrological limitations. The emergent applications of SP-ICP-MS in the field of nanoparticle-tagged immunoassay and hybridization methods are also reviewed.

Received 4th May 2021
Accepted 7th June 2021

DOI: 10.1039/d1ay00761k

rsc.li/methods

SP-ICP-MS: a fast-developing technique

The use of inductively coupled plasma mass spectrometers in single particle mode has led to the emergence of a particle counting technique known as single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS). Although the origins of the technique can be traced back to the 1970's,[1] a series of key papers by Degueldre *et al.*,[2–6] published between 2003 and 2006, are considered its starting point. However, the application of SP-ICP-MS to the analysis of engineered nanomaterials,[7,8] followed by its implementation in commercial ICP-MS instruments,[9–11] became the main driving force behind the success of the technique in recent years.

The birth and evolution of SP-ICP-MS resembles that of the ICP-MS technique itself (Fig. 1). After their initial conception, it took some time to get the first ICP-MS research instrument, as well as the first application to nanomaterials in the case of SP-ICP-MS. But from then on, it took only about three years for manufacturers to launch the first commercial ICP-MS instruments, or the first

Group of Analytical Spectroscopy and Sensors (GEAS), Institute of Environmental Sciences (IUCA), University of Zaragoza, Pedro Cerbuna 12, Zaragoza, 50009, Spain. E-mail: flaborda@unizar.es

The authors belong to the Group of Analytical Spectroscopy and Sensors (GEAS) of the University of Zaragoza. The main research area of the group lies in the development and application of analytical techniques and methods in Nanometrology for the detection, characterization and quantification of natural and engineered nanoparticles. The group has made significant contributions in single particle ICP-MS and flow field flow fractionation hyphenated to ICP-MS. The authors have a long experience in these techniques but also in hydrodynamic chromatography, electron microscopy, as well as X-ray and electroanalytical techniques, which leads to a broad analytical platform for solving complex problems involving nanoparticles and colloids. The group has more than 10 year of experience and 40 publications in this field of Analytical Nanometrology.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

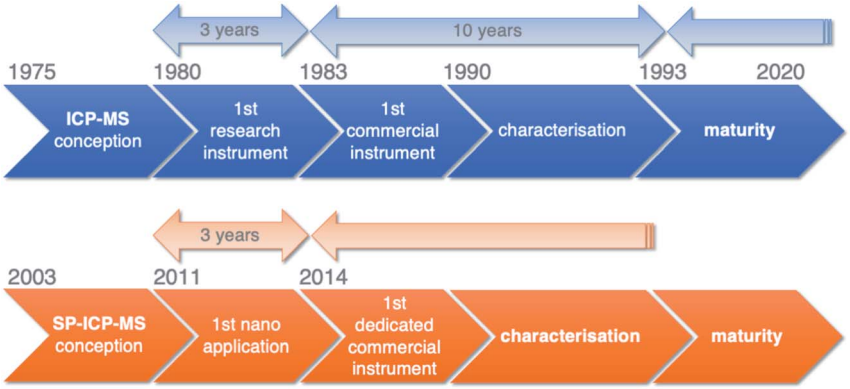


Fig. 1 Comparison of the evolution of SP-ICP-MS with respect to ICP-MS (adapted from Horlick[12]).

dedicated instruments in the case of SP-ICP-MS. Thereafter, conventional ICP-MS evolved in a fast way, becoming a mature technique in about ten years.[12] According to Horlick, a mature technique is characterised by the fact that their methods are applied to a wide range of analytical problems and determinations, and become established as a routine tool with broad commercialisation. Before the maturity stage, a technique goes through a characterisation stage, a period of intense research activity aimed at achieving a complete picture of the technique at instrumental, metrological and methodological levels. On the other hand, during the characterisation stage the new technique seems to have no limits and to be able to solve all the problems, whereas with maturity comes the realization that not all is ideal and there are a number of problems that will not be solved. In the case of SP-ICP-MS, the question is whether the technique can be considered to have reached maturity or is still in the characterisation phase. The final aim of this comprehensive review is to gather the publications involving SP-ICP-MS and critically evaluate the current state of the technique, its limitations and its level of maturity level. Special attention is paid to the problem-solving analytical methods developed and their application under different relevant analytical scenarios.

Basic principles

When an ICP-MS instrument is used at very high reading frequencies, ICP-MS becomes a particle counting technique, being able to deliver information in a particle-by-particle basis. The basics of SP-ICP-MS measurements were established by Degueldre *et al.*[2] Basically, when a diluted suspension of nanoparticles is nebulized into an ICP-MS, and an isotope of the element present in the nanoparticles is measured at acquisition frequencies over *ca.* 100 Hz, a series of events corresponding to individual nanoparticles are recorded over a continuous baseline. The intensity of these events is related to the mass of the element in the nanoparticle, and hence to its size if additional information about the composition, shape and density of the nanoparticle are available, whereas the frequency of events is proportional to the number concentration of nanoparticles. Subsequently, Laborda *et al.*[7] revealed that information about dissolved forms of the element measured could also be obtained from the baseline. Whereas the dissolved species are homogeneously distributed in all the aerosol droplets, the nanoparticles are present randomly in some of them. Thus, a constant signal (baseline) is produced by the dissolved species, whereas the nanoparticles give rise to individual signal events, as it can be seen in a typical time scan (Fig. 2a).

As the SP-ICP-MS measurements are performed in time resolved mode, the data acquisition frequency (or the number of events along a fixed acquisition time), controlled through the dwell time of the instrument, is one of the most relevant parameters. Considering that the ion cloud generated in the plasma from a single nanoparticle can be detected during 300–1000 μs,[13,14] nanoparticle events can be recorded in two different forms, depending on the dwell time selected. When using dwell times in the millisecond range (3–10 ms), larger that the duration of the ion cloud in the instrument, events are recorded as one-reading signals (pulses), whereas for dwell times in the microsecond range (10–200 μs), they are recorded as peaks (transient signals), comprising several readings (see the insets in Fig. 2a). For pulses, the intensity event is given by the reading itself, whereas for peaks, the intensity is calculated as the sum of the individual readings along it. With respect to the acquisition frequency, it is worth to mention that the commercial launch of SP-ICP-MS in 2014 was linked to quadrupole spectrometers with higher reading frequencies, allowing dwell times down to 10 μs,[10] instead of just working at milliseconds. In the meantime, time-of-flight[9] and double focussing[11] spectrometers have become commercially available with minimum dwell times of 33 and 10 μs, respectively.

Raw data from both milli- and microsecond time scans can be processed by plotting the event intensity *vs.* the number of events, obtaining histograms as shown in Fig. 2b, where the first distribution is due to the background and/or the presence of dissolved forms of the element measured and the second to the nanoparticles themselves. The second distribution is further processed to convert the event intensities to mass of element per nanoparticle or size distributions (Fig. 2c). Instrumental and metrological issues related to measurements, data acquisition and data processing have been summarized and described in detail in a number of reviews[1,15–18] and articles therein. It is worth to mention that the different types of quantitative information on nanoparticles achievable by SP-ICP-MS, and discussed in the next section, require different calibrations with nanoparticle size and number concentration

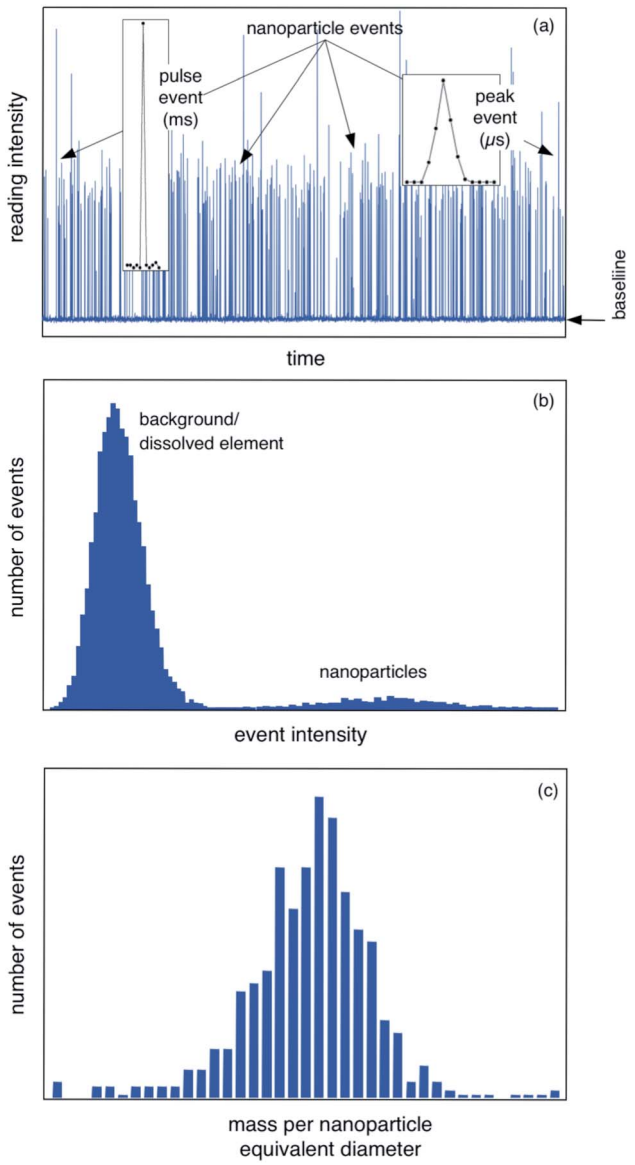


Fig. 2 (a) Time scan of suspension containing nanoparticles and dissolved forms of the same element. (b) Event intensity histogram of data from (a). (c) Mass per nanoparticle/size distribution of spherical nanoparticles calculated from the second intensity distribution in (b).

standards. If size standards of the particles under study are not available, indirect calibrations based on the use of dissolved standards are usually applied. In these cases, sample introduction flow rate and the analyte nebulization efficiency have to be known to determine the mass of element per nanoparticle and hence the nanoparticle size. The analyte nebulization efficiency is commonly determined using the methods developed by Pace *et al.*[8] An overview of calibration issues in SP-ICP-MS can be found in Laborda *et al.*[19]

Analytical information: analytes and measurands

The strength of SP-ICP-MS lies in the different types of analytical information that the technique can provide from very simple measurements. As we have seen above, two types of analytes are under the scope of SP-ICP-MS, namely (nano) particles and dissolved species. The term "nanoparticle" is going to be used here in a broad sense, although in most cases it will coincide with the ISO definition (nano-object with its three dimensions in the nanoscale, 1–100 nm).[20] Other nano-objects, like nanofibers/nanotubes or nanoplates (two and one dimensions in the nanoscale, respectively) may be suitable of being analysed by SP-ICP-MS, depending on the magnitude of the other dimensions that are not in the nanoscale. Thus, particles over 100 nm, even in the micrometre range, have been successfully analysed, although issues related to their nebulization and ionization must be considered.[21]

In any case, the information provided by SP-ICP-MS can be: (i) qualitative, about the presence of (nano)particulate and dissolved forms of specific elements; (ii) quantitative contents, as number and mass concentrations; and (iii) characterisation, about the mass of element/s per nanoparticle and nanoparticle size.

For dissolved species, the mass concentration of the element monitored is the measurand of interest, whereas for nanoparticles, the primary measurands of concern are the number concentration and the mass of element per particle. When additional information about the shape, composition and density of the particles is available, information about the size of the particles can be obtained. Nevertheless, a spherical shape is commonly assumed and the equivalent spherical diameter is the measurand usually reported. Any population of particles always exhibits more or less broad size distributions, recorded primarily by SP-ICP-MS as element content distributions, whose measurands are histograms showing the number of particles for each of a number of defined size or element content per particle classes, respectively. Table 1 summarises the quantitative and characterisation information with the corresponding measurands for each of the analytes involved in SP-ICP-MS. Qualitative information about the presence/absence of dissolved species and/or nanoparticles over a certain concentration and size cannot be disregarded because of the practical limitations of the technique when analysing complex samples, as it will be shown below. In addition, other types of information can be obtained from SP-ICP-MS measurements (*e.g.*, porosity,[22] density,[23] aggregation,[24,25] agglomeration[26]), although they will not be discussed in detail.

Scientific production and evolution stage

Since the publication of the first article by Degueldre and Favarger in 2003, almost 400 studies directly related to SP-ICP-MS have been published in peer-reviewed journals until the end of 2020. These publications include a limited number of reviews, tutorials and divulgation articles; whereas most of them consists of articles on fundamentals and basic aspects of the technique, the development of methods, as well as their application. As it has been stated above, the analysis of engineered nanomaterials is behind the success of SP-ICP-MS, and

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

Table 1 Analytes, analytical information and measurands involved in SP-ICP-MS

Analytical information		Analyte	Measurand
Qualitative	Presence/ absence	Nanoparticle Dissolved element	
Quantitative content	Concentration	Nanoparticle	Number concentration Mass concentration of nanoparticulate element
	Concentration	Dissolved element	Mass concentration of dissolved element
Characterisation	Element content	Nanoparticle	Element mass per particle
	Size	Nanoparticle	Equivalent spherical diameter
	Element content distribution	Nanoparticle	Histogram showing the number of particles for each of a number of defined element content per particle classes
	Size distribution	Nanoparticle	Histogram showing the number of particles for each of a number of defined size classes

most of the works deal with manufactured nanoparticles, although natural and incidental nanoparticles have also been analysed. SP-ICP-MS has proved its usefulness in other areas, like nanoparticle tag-based immunoassay and hybridization methods, as it will be discussed in a specific section.

The scientific production from 2003 to the end of 2020 has been organized in four fields, namely "Reviews", "Fundamentals", "Method Development" and "Applications". With respect to the "Reviews" field, one tutorial,[15] five reviews[1,16–18,27] and two divulgation articles[28,29] on the specific topic of SP-ICP-MS have been published to date. However, the technique is being included in most reviews on ICP-MS[30,31] or about the analysis of natural[32] or engineered[33–35] nanomaterials. The "Fundamentals" field covers publications whose main objective is the study of basic aspects of the technique (*e.g.*, instrumentation, plasma processes, sample introduction, data acquisition and processing). All these studies have been performed with nanoparticle standards, although synthetic matrices have been considered in some cases, but always under controlled laboratory conditions. The "Method Development" field includes publications focused on the development of proofs-of-concept methods, based on the use of in-lab synthesized nanoparticles, nanoparticle standards or samples spiked with standards. When the method has been applied to samples containing original nanoparticles, it has been considered under the "Applications" field. Analysis of samples from laboratory tests (*e.g.*, *in vivo*, *in vitro*, migration) involving nanoparticle standards have also been considered within this field, as it will be justified below.

Fig. 3 summarizes the distribution of publications in the four fields cited above directly related with the analysis of nanomaterials or samples containing nanomaterials, as well as their chronological evolution. The analysis of these data may give light about the maturity and the expected evolution of SP-ICP-MS. As it has been stated above, the rise of SP-ICP-MS publications started from 2011, with a constant increase in the total number of publications related to both "Fundamentals" and "Method Development" until 2016, showing some stabilization in recent years, whereas the number of publications about "Applications" is steadily growing. Following the evolution stages proposed by Horlick, and despite some overlap between them is unavoidable, the trend in publications suggests that SP-ICP-MS has passed the stage of characterisation and would be at the beginning of the maturity stage. However, other indicators than the extent of application of the technique, namely metrological indicators like method validation and traceability, should also be considered. While traceability of results is out of question in conventional ICP-MS because of the availability of validated methods, standards and reference materials,[36] this is not the case in SP-ICP-MS. As will be seen in the following sections, the number of SP-ICP-MS methods developed for the most diverse applications is increasing, although the number of validated ones is still limited. On the other hand, due to the special features of nanoparticles, the availability of standards and reference materials is still scarce, conditioning in the end the traceability of the results obtained.

Analytical methods based on SP-ICP-MS: validation

In spite of the significant evolution of the technique discussed above, method validation in SP-ICP-MS is still at an early stage,

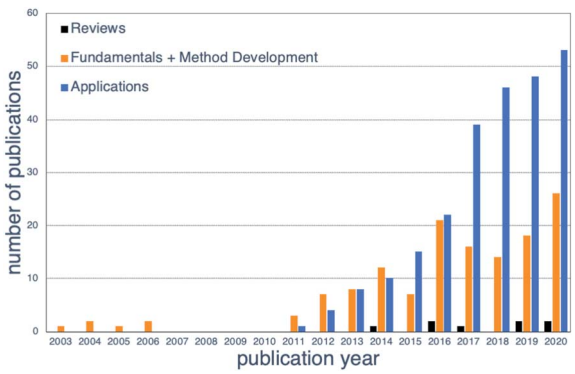


Fig. 3 Evolution of SP-ICP-MS publications related to reviews, fundamentals, method development and applications.

lacking the harmonization of other fields in analytical chemistry, mainly because of the special features of nanoparticles as analytes. Whereas conventional analytes consist of identical entities (mostly atoms in ICP-MS) identified by their chemical composition (*e.g.*, silver, titanium dioxide), identification of particles (*e.g.*, 10 nm spherical silver or titanium dioxide nanoparticles) requires determining their chemical composition but also their morphology (size and shape). This means that validation parameters, like limits of detection and quantification, working range, precision or trueness, must be applied to mass/number concentrations but also to particle size. With respect to size, it must keep in mind that particles always exhibit more or less broad size distributions, entailing that particles cannot be considered as truly identical entities. An additional drawback in relation to validation is the lack of certified reference materials for nanoparticles in any type of matrix, which forces to use recovery tests with matrix-free reference materials or properly characterised commercial nanoparticles for the evaluation of trueness. These recovery tests, based on the spike of nanoparticles, must test not only the recovery of the mass added, but also that the particle size and its distribution remain unchanged. For all these reasons, Linsinger *et al.*[37] proposed an adaptation of conventional validation schemes to the detection and quantification of engineered nanoparticles, although the number of validated methods already published is still scarce. In most cases, the scheme has been based on the addition of nanoparticles to different matrices, such as surface waters,[38] fruit juices,[39] chicken meat,[40] human liver and spleen tissues[41] or human blood.[42] In these cases, particle stability in the matrices has a strong influence on trueness and precision of the results, as it was reported for silver nanoparticles in chicken meat, since metallic nanoparticles were transformed into silver sulfide.[40] Only in a few cases, samples with nanoparticles originally present, such as Ag nanoparticles in confectionery,[43] have been described in validated methods. Finally, some methods for screening purposes have also been validated for detection of silver and gold nanoparticles in foods[44] and TiO_2 nanoparticles in confectionery products.[45]

Validation parameters commonly determined in these studies include trueness, selectivity, precision, detection limits, linearity and robustness.[37] The evaluation of trueness has been done mostly by spiking control samples with nanoparticle standards, ensuring that the particle size and size distribution remain unchanged, together with the recovery of the mass added. In general, larger bias, as high as +80% have been reported for number concentration compared to particle size, with bias around −20%.[19] Comparison with nominal median diameter and/or concentration of the standard added is the common rule, although the confirmation of the results by independent methods is highly recommended when possible. Thus, validation of the size characterisation has been performed by comparison with electron microscopy techniques (TEM or SEM), such in the characterisation of a series of TiO_2 materials used as food additives[46] or with the gold nanoparticle reference material RM8012,[47] showing differences on size distributions.

Selectivity has been evaluated considering possible (poly) atomic interferences[38,40,41] and other matrix constituents, which may cause changes in nebulization efficiency or in the ionization, affecting to particle concentration and size, respectively.[48] In any case, the effect of other nanoparticles or nanoparticles of the same composition but with different properties (size, coating…) should also be evaluated.

Respect to precision, determination of the nanoparticle number concentration is usually less precise than size determination, with reproducibility that reach up to 90% in some cases.[49] Data processing, is the driving factor in this parameter over sample preparation or sample dilution, especially at high baseline levels that make discrimination of nanoparticle readings more difficult.[43] It should be noted that satisfactory results have been obtained when comparing the repeatability and reproducibility obtained with the values predicted by the Horwitz ratio in the analysis of TiO_2 particles at concentration levels in the order of 0.01 mg Ti per kg.[41]

Despite there are not expressions widely accepted for the calculation of the limits of detection in the different domains covered by SP-ICP-MS, Laborda *et al.*[17] have proposed a harmonizing approach to calculated LODs for validation purposes. Most widely applied criteria for calculation of size detection limits are based on the use of multiples of the baseline standard deviation (*n*-sigma criterion). Multiples from 3- to 8-sigma criteria can be found in SP-ICP-MS publications,[41] although the use of 5-sigma criteria has been justified by these authors[17] on a routine basis. In general, size LODs depend on different factors, such as the concentration of the dissolved element, the strategy used for substracting the baseline signal to the particle signal or the type of mass spectrometer.[45] A comprehensive list of size LODs for metallic and oxide nanoparticles using a commercial quadrupole instrument under typical experimental conditions can be found in Laborda *et al.*[17] Size LODs around 10 nm and larger were obtained for most common nanoparticles at 100 μs dwell times. Incomplete vaporization of large particles in the plasma can limit the linearity of the size measurement ranges, hence larger particles, in the micrometre range, can produce signals outside the linear range of the detector.[50] For instance, a linear size range up to 150 nm has been reported for gold nanoparticles, whereas for SiO_2 it can increase up to 1000 (ref. 51) or 2000 nm.[50] Besides, particles larger than 2–5 μm are transported into the plasma with lower efficiency.

With respect to the number concentration LOD, it depends on the number of particles events detected in the blank, the sample introduction to the ICP-MS and the acquisition time. The use of conventional procedures for concentration LOD based on the blank standard deviation as in size LOD results in unrealistic values[9,42] and therefore, they cannot be used interchangeably. LOD values of 100 particles per mL have been reported[17] with acquisition times of 60 s, using a cyclonic spray chamber and a concentric nebulizer. The number concentration measurement range is limited by the occurrence of multiple particle events, which cause a progressively loss of linearity. The occurrence of events due to two or more nanoparticles is predicted by Poisson statistic and is expected to be

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

significant, depending on the nebulization system and the range of dwell times (milli or microseconds) used.[13] Linear ranges up to 10^7 L^{-1} can be achieved with conventional nebulization systems at millisecond dwell times, which can be increased one order of magnitude working at microsecond dwell times.

Robustness has been evaluated commonly by changing different parameters that affect the measurement results, such as sample pre-treatment or dilution factor,[40] although in some cases only the element total concentration has been considered for robustness evaluation.[41]

Other studies have included quality control procedures, such as the evaluation of trueness by spiking nanoparticles standards to natural matrix samples, considering that conventional procedures cannot be directly applied in SP-ICP-MS analysis due to the limitations described above. Thus, trueness has been evaluated by measuring recovery of the spiked nanoparticles, mainly based on number concentration, and the use of alternative techniques to confirm size results, such as for the sizing and quantification of Ag nanoparticles in food simulants,[52] moisturizing creams,[53] fish tissue,[54] or ZnO[55] and TiO_2 nanoparticles[56] in natural waters. This strategy has also been applied to the detection of naturally occurring iron oxide nanoparticles in crude oil and residual fuel oil by spiking in-lab synthesized silica-shelled Fe_3O_4 nanoparticles.[57] Alternatively, the agreement between the total element content determined by acid digestion and ICP-MS can be used for confirmation of the results, as in the determination of Ce, Cd and Pt-bearing nanoparticles in road runoff sediments[56] or Au nanoparticles in tumour cells after alkaline digestion.[58]

However, if the sample contains nanoparticles smaller than the LOD,[54–56] size information will be overestimated and number/mass concentration underestimated in consequence. In such situations, SP-ICP-MS should be restricted to confirm the presence of nanoparticles containing the element monitored over a certain equivalent diameter and concentration.

Applications of SP-ICP-MS: analytical scenarios

In relation to the application of SP-ICP-MS to real-world analytical problems, Fig. 4 shows four different analytical scenarios that can be considered. Whereas the first one (type 0) corresponds to the analysis of pristine nanoparticles commonly produced at laboratory or industrial-scale, which just involves their characterisation, the other three correspond mainly to the needs of analytical information arising from the risk assessment of nanomaterials and nanoproducts in relation to environment, health and safety, as well as to legal regulations, which involve the detection, characterisation and/or quantification of nanoparticles in the presence of, more or less, complex matrices. Type 1 scenario includes the analysis of industrial and consumer products containing nanoparticles (*e.g.*, cosmetics, textiles, polymers). Type 2 scenarios consider laboratory tests with pristine nanoparticles or products containing nanoparticles to assess their release, fate, and behaviour (2.1) as well as their (eco)toxicity in a variety of exposure conditions (*e.g.*, environmental micro and mesocosms, migration in food simulants, gastrointestinal digestions, *in vitro* and *in vivo* (eco) toxicity test) (2.2). Finally, type 3 scenarios are related to the monitoring of the occurrence of nanoparticles in foods (3.1) environment (3.2) and organisms (3.3).

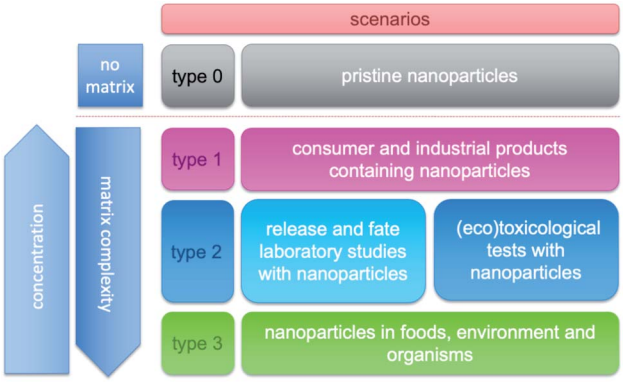


Fig. 4 Analytical scenarios related to nanoparticles (adapted from Laborda *et al.*[59]).

Leaving aside the scenario type 0, where the nanoparticles are the sample because of the lack of matrix, each of the three other scenarios involve samples containing nanoparticles and, in general terms, represent a progressive increase in analytical complexity, from the point of view of both the matrix and the decreasing concentrations.

The use and application of SP-ICP-MS methods has been organized according to the scenario classification presented in Fig. 4. Fig. 5 shows the distribution of the number of publications in relation to these different scenarios. The chart shows that two thirds of applications correspond to laboratory tests (scenario 2), whereas one fourth involves samples originally containing nanoparticles (scenario 3). The analysis of pristine nanomaterials (scenario 0) and products containing nanoparticles (scenario 1) account for 16%, most probably because they are usually analysed by other well-established techniques (*e.g.*, electron microscopy, DLS). The following sections provide a detailed reviewing of the SP-ICP-MS application in the different scenarios considered.

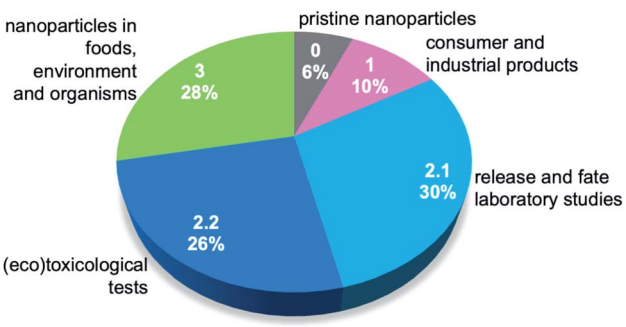


Fig. 5 Distribution of publications (2011–2020) related to applications of SP-ICP-MS in different analytical scenarios.

Scenario 0: analysis of pristine nanoparticles

The analysis of pristine nanoparticles is regarded as the least complex scenario, since there is no matrix in which they are contained. Engineered nanomaterials commonly produced at laboratories for research or industrial purposes,[61,63–72,75,76] but also commercial suspensions,[60,62,73,74] have been considered in this section. Table 2 summarizes the applications of SP-ICP-MS to the analysis of such pristine nanoparticles. In any case, the main aim of the analysis is focused on the characterisation of the nanoparticles, although the effect on size of different factors (stability,[60] kinetics,[61] use of specific reagents[67,76]) along their synthesis have also been studied by some authors.

Pure nanoparticles of metallic Au,[63–65] Ag,[60,61,63] Pd and Ni,[68] as well as TiO_2,[71] have been analysed by SP-ICP-MS. The nanoparticles were usually obtained by chemical synthesis, although they were also produced by milling.[60] Most of the nanoparticles were available as suspensions, however, those presented as powders had to be prepared as stable suspensions, requiring convenient dilutions in all cases. Only in the work by Lahtinen *et al.*[76] nanoparticles had to be extracted with water, because they were obtained by reduction of tetrachloroaurate adsorbed onto 3-D filters.

In relation to the analytical information delivered, size distributions and mean/median sizes were typically reported, although mass[61,68] and number concentration[64,68] were also considered when samples were originally presented as suspensions. In this scenario, characterisation was not only limited to sizing. Kálomista *et al.*[65] were able to provide information about the shape of the nanomaterial, differentiating between spherical nanoparticles and nanorods of Au by comparing the signal-time profiles of the peaks recorded. Merrifield *et al.*[62] characterised and quantified Au–Ag core–shell nanoparticles, whereas Kéri *et al.*,[63] following a similar methodology to Kalomista,[65] were able to distinguish between Au–Ag alloyed and core–shell nanoparticles, providing average Au : Ag molar ratios.

The analysis by SP-ICP-MS of composite particles consisting of polymer[66] or silica[72] particles containing metallic nanoparticles allowed to obtain the mass of Au or Pt per particle, respectively, as well as the corresponding distributions and the number of metallic nanoparticles per composite particle when their size was known. Complex nanomaterials, like upconversion nanoparticles ($NaYF_4$ and $NaGdF_4$ doped with Yb or Er), could also be characterised by decreasing the element mass per particle detection limit; this could be done by reducing the resolution of the quadrupole and hence increasing the transmission of ions.[70]

Although carbon nanotubes are not directly detectable by SP-ICP-MS, their metal impurities have been used as proxies for their detection. In that way, the yttrium contained in nanotubes allowed their detection,[73,74] although the concentration was underestimated due to the difficulties of detecting nanotubes with low loads of yttrium.

The characterisation of pristine nanoparticle by SP-ICP-MS has been complemented by electron microscopy techniques for size and shape characterisation[57,61,64,65,68–70,73,74] and XRD[68,69,72,75] for confirmation of their nature through their crystalline structure.

Scenario 1: analysis of consumer and industrial products containing nanoparticles

Owing to their specific properties at the nanoscale level, nanoparticles are currently contained in numerous consumer and industrial products. The nano-enhanced products analysed by SP-ICP-MS are summarized in Table 3; they consist of consumer, mainly cosmetics,[53,77–85] and industrial products, including food additives[43,46,89] and other materials, like steel,[90] petroleum products[57,91] or tattoo inks.[92,93]

Nanoparticles in cosmetics are mainly focused on sunscreens,[77–79,84] in which TiO_2 is the most frequent nanocomponent due to its photocatalytical properties, although ZnO has also been studied in this type of products.[80,81] TiO_2 was the target analyte in other cosmetics and personal care products, like toothpastes,[82,83] lip balms,[82,84] creams[84] and shampoos.[84] Aluminium oxide and silver nanoparticles in toothpastes[83] and moisturizing creams,[53] respectively, have also been measured by SP-ICP-MS, as well as plastic microparticles added as abrasives in exfoliant creams.[85] Sample preparation of cosmetics always requires their dispersion in ethanol or water, in most cases by adding a surfactant, although a previous defatting step with hexane is typical for sunscreens and lip balms.[79,82,84] When refractory nanoparticles like TiO_2 or Al_2O_3 are involved, a previous matrix digestion with hydrogen peroxide has been applied.[83] Other consumer products considered have been antibacterial sprays containing silver nanoparticles,[86–88] although the occurrence of other elements like Sn or Zn in these products has also been checked.[88]

TiO_2 and metallic Ag are approved food additives, labelled as E171 and E174, respectively. Raw samples of E171 [46,89] and E174 [43] have been characterised by SP-ICP-MS in combination with other techniques to obtain information about the nanoparticulate fraction in these materials. In the case of steels,[90] the aim of the analysis was the characterisation of refractory particles of titanium and niobium carbonitrides, whereas in petroleum products (crude and fuel oil,[57] and asphaltene solutions[91]) was the detection of iron and molybdenum containing particles. In a similar way, tattoo inks[92,93] were analysed to study the occurrence of nanoparticulate Al, Ti, Cu, Cr, Zn and Pb from the pigments used in their fabrication, or the presence of copper nanoparticles in homeopathic medicines.[94]

Given the nature of the materials considered and their commercial purpose, many of the studies were placed under the European Commission regulation and its definition of nanomaterial.[43,46,79,81,83,84,93] The principal objective of the use of SP-ICP-MS was therefore focused on the characterisation of the nanoparticle fraction, being the mean size and the particle size distribution the main measurands of concern.

Although concentration is not a serious constrain in this scenario, a common limitation when using SP-ICP-MS is the detection of the smallest fraction of the nanoparticles present with these samples. This can lead to partial histograms since complete size distributions are not always obtained. This was

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

Table 2 Scenario 0: analysis of pristine nanoparticles

Sample	Nanoparticle composition	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Suspension	Ag	—	5 ms	Q	No	Qualitative (NP)	NP size distribution	TEM DLS	60
	Ag	—	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration DE mass concentration	TEM DLS	61
	Au@Ag (Ag shell)	—	50 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	AF4-UV-Vis	62
	Au–Ag alloy	—	6 ms 20 μs	Q	No	Characterisation (NP)	molar ratios Au : Ag	—	63
	Au	—	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration	TEM	64
	Au (NP and nanorods)	—	6 ms 20 μs	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size	TEM DLS UV-Vis	65
	Au/polymer composite	—	100 μs	Q	No	Characterisation (NP)	Mean mass per NP NP mass distribution	ICP-MS TEM AF4-ICP-MS CFFF-ICP-MS	66
	CuO FeOOH	—	50 μs	DF	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	SEM XRD DLS	67
	Ni	—	500 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	SEM TEM XRD	68
	Pd	—	50 μs	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	SEM SAXS XRD	69
	$NaYF_4$ (Yb doped) $NaYF_4$ (Er doped) $NaGdF_4$ (Yb doped) $NaGdF_4$ (Er doped)	—	100 μs	Q	No	Characterisation (NP)	NP size distribution	TEM XRD	70

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

Table 2 (*Contd.*)

Sample	Nanoparticle composition	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Powder	TiO_2	Dispersion in 2% PVP	50 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution DE mass concentration	DLS TEM	71
	SiO_2/Pt	Dispersion	10 ms	Q	He	Characterisation (NP)	Mean mass per NP	ICP-MS SEM-EDS TEM XPS	72
	CNT (trace metals)	Dispersion in 1% Triton X-100	10 ms	Q	No	Qualitative (NP) Quantitative (NP)	— CNT number concentration	SEM-EDS NTA	73
	CNT (trace Y)	Dispersion in 1% Na deoxycholate	100 μs	Q	No	Qualitative (NP) Quantitative (NP)	— CNT mass concentration	ICP-MS TEM NTA UV-Vis	74
	TiO_2 (Mn)	—	100 μs	Q	No	Characterisation (NP)	Mean mass per NP NP mass distribution	SEM TEM SAM AES XPS XRD Raman	75
Filters	Au	Water extraction	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	HIM SEM-EDS XRD UV-Vis	76

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

Table 3 Scenario 1: analysis consumer and industrial products containing nanoparticles

Sample	Nanoparticle composition[a]	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision /reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Cosmetics									
Sunscreen	TiO_2	Dispersion in ethanol	50 μs	DF	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	—	77
	TiO_2	Dispersion in 1% Triton X-100	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS SEM-EDS	78
	TiO_2	Defatting with hexane + filtration	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration DE mass concentration	ICP-MS SEM TEM DLS AF4-MALS-ICP-MS	79
	TiO_2 ZnO	Dispersion in 1% Triton X-100	—	—	—	Characterisation (NP)	NP mean size	TEM-EDS XRD	80
	TiO_2 ZnO	Dispersion in 1% Triton X-100	5 ms	Q	He	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration NP mass concentration	AF4-MALS-ICP-MS	81
Lip balm	TiO_2	Defatting with hexane + filtration	100 μs	Q	He	Characterisation (NP)	NP size distribution	ICP-MS CE-ICP-MS	82
Toothpaste	TiO_2	Dispersion in 0.1% SDS	100 μs	Q	He	Characterisation (NP)	NP size distribution	ICP-MS CE-ICP-MS	82
	TiO_2 Al_2O_3	H_2O_2 digestion + dilution in 0.1% SDS	10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	ICP-MS STEM-EDS DLS AF4-MALS-ICP-MS HDC-ICP-MS	83

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

Table 3 (*Contd.*)

Sample	Nanoparticle composition[a]	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision /reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Sunscreen Lip balm Toothpaste Creams Shampoo	TiO_2	Defatting with hexane Dispersion in 0.1% SDS	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration DE mass concentration	ICP-MS ICP-OES DLS	84
Moisturizing cream	Ag	Dispersion in methanol	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS FESEM TEM	53
Exfoliant	Plastic polymers (C-)	Dispersion in water	200 μs	Q	No	Qualitative (NP)	—	FESEM	85
Other consumer products									
Antibacterial spray	Ag	—	3 ms	Q	No	Qualitative (NP) Qualitative (DE)	—	HPLC-ICP-MS TEM	86
	Ag	—	10 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	ICP-MS	87
Commercial sprays	Ag- Sn- Zn-	—	5 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size	ICP-MS DLS SEM-EDS TEM-EDS SMPS	88
Food additives									
E174	Ag	Ethanol wetting + dispersion in 0.05% BSA	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	TEM	43

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

Table 3 (*Contd.*)

Sample	Nanoparticle composition[a]	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision /reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
E171	TiO_2	Dispersion in water	3 ms	Q	NH_3	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	TEM-EDS HAADF-STEM-EDS	46
	TiO_2	Dispersion in 0.05% BSA	3 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	SEM NTA AF4-MALS AF4-ICP-MS	89
Other materials									
Steel	NbCN TiNbCN	Extraction 0.5 M H_2SO_4/0.1% Disperbyk-2012 + centrifugation	1.8 ms	TOF	No	Characterisation (NP)	NP size distribution Mass per NP distribution	STEM	90
Petroleum products	Fe_3O_4	Dilution (*o*-xylene)	100 μs	Q	He	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration DE mass concentration	ICP-OES TEM	57
Asphaltene solutions	Mo- Fe-	Dilution (*o*-xylene)	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS	91
Tattoo inks	Al_2O_3 TiO_2 Cu-	—	5 ms	Q	He	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	TEM DLS AF4-MALS	92
	Ti- Al- Cr- Cu- Zn- Pb-	—	5 ms	Q	He	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS	93
Homeopathic medicine	Cu	—	—	Q	—	Qualitative (NP)	—	DLS NTA SEM-EDS	94

[a] M: nanoparticle with composition M. M-: nanoparticle containing element M.

the case for titanium in some cosmetics[77–79,82] and food additives,[46] as well as for silver.[43,53,86,87] For microplastics,[85] the sizes of detectable particles were restricted at both size range limits. At lower size range, it is restricted due to the inherent limitations of carbon detection by ICP-MS, and at the upper size range due to low nebulization efficiency of large particles, being limited to sizes from 1 up to 5 μm.

Scenario 2.1: laboratory tests involving nanoparticles or products containing nanoparticles

The applications developed under scenario 2.1, summarized in Table 4, include laboratory tests under controlled conditions, involving pristine nanoparticle or products containing nanoparticles. Laboratory tests with materials originally containing nanoparticles are devoted to studying their release into aqueous media under selected conditions, whereas the study of the fate and behaviour of nanoparticles in different media, or along different relevant processes, requires the addition of pristine nanoparticles to the samples of concern.

Release studies. The risk assessment of consumer and industrial products containing engineered nanoparticles involves knowing the human and environmental exposure to the nanoparticles released from such products along their whole life cycle. These release studies are usually performed at laboratory scale under controlled simulation conditions.

Direct human exposure to engineered nanoparticles and/or their transformation products might arise from the ingestion of foods stored in containers bearing nanoparticles (*e.g.*, Ag, nanoclays). Migration test from existing regulations for conventional analytes, based on the use of model food simulants (acetic acid, ethanol), have been applied to plastic food containers[95–99] and packaging films,[100] as well as to cookware.[101] The procedures are straightforward; after incubation of the samples at selected temperatures during fixed time periods, simulants are diluted conveniently and analysed by SP-ICP-MS. In addition to plastic containers, polymers doped with Fe_2O_3 [109] and ZnO[110] have also been studied by using these migration tests. In the case of baby products containing silver nanoparticles, release studies were performed by leaching in artificial saliva to simulate the exposure route for children.[98] In a similar way, silver release from toothbrushes was studied by leaching in tap water.[102] The dermal exposure from surfaces containing nanoparticles was simulated through wiping tests by using artificial sweat, followed by the extraction with water of the nanoparticles from the wipes.[103] Water extraction has also been applied to study the release of Ag nanoparticles from antibacterial plasters[104] or TiO_2 from textiles.[105]

Environmental exposure to engineered nanoparticles from nano-enhanced products is related to their release and transformations that they undergo during their life cycle. Most commonly, materials like wood,[116] leather[117] or polymers[108,109] have been subjected to direct leaching in water, whereas for paints[111,113] or conductive inks,[114] the release from painted surfaces or printed circuits have been considered, respectively. More realistic studies have involved the use of different model waters to study the leaching of metal bearing particles under end-of-life conditions from photovoltaic cells,[115] or the leaching of TiO_2 particles from painted surfaces by snow and rainwater under weathering conditions.[112] Mitrano *et al.*[106] studied the life cycle of nano-enhanced textiles subjected to different aging and washing processes to understand the release and transformation of the silver nanoparticles from the textiles. The release of metal containing particles from environmental samples, like road dust[119] and mine tailings,[120] has also been studied by leaching in different media as a source of environmental pollution.

Regarding the composition of the nanoparticles, silver[95–98,100,102–104,106,107,114,115,117] and titanium[101,105,112,113] are the most frequently studied, although zinc[110] and copper[103,111,116] have also been considered. Multielement monitoring has also been performed, as in the case of photovoltaic cells,[115] cookware[101] or the emission of particles from paper printing and shredding.[118] The release of carbon nanotubes from polymer nanocomposites was followed by monitoring the yttrium present in the nanotubes,[108] as it was described for pristine carbon nanotubes in scenario 0.[73,74] Detection of plastic microparticles released from food containers has also been possible by using the carbon-13 isotope.[85]

Although SP-ICP-MS allows to obtain detailed quantitative information about nanoparticle size and concentration, the technique has been used in some release studies only to confirm the presence of the nanoparticles in the food simulants[85,95,99] or the leaching media,[115,117,118] as well as of dissolved forms of the element monitored.[97] In these cases, the recorded time scans (Fig. 2a) allow to obtain the qualitative information required, once the adequate metrological criteria have been applied.[44] In many other studies, detailed information about mean/median sizes, size distributions and number/mass concentration of the nanoparticles released were reported, although the profiles of the size distributions revealed that the nanoparticle distribution had been partially recorded due to the attainable size limits of detection, hence underestimating the actual concentrations and overestimating mean sizes.

Fate studies. Whereas the release studies discussed above involve consumer and industrial products, fate studies are mostly based on the use of pristine and well-characterised nanoparticles, commercially available or synthesized at the laboratory, although aged nanoparticles have also been used.[164] The nanoparticles are spiked in the matrix of interest and the samples analysed directly or after undergoing the simulated process under study (*e.g.*, gastrointestinal digestion, laundry, wastewater treatment, environmental exposure). The main advantage of these controlled experiments is that both size and concentration of the spiked nanoparticles can be selected as desired. Although concentration is not a serious limitation for SP-ICP-MS, allowing even to work at realistic environmental concentrations,[135,138,141] attainable size LODs can be a critical drawback when using SP-ICP-MS with real samples, as it has been discussed above and it will be shown again in relation to scenario 3.

Fate studies performed with spiked Ag nanoparticles in food simulants complement the migration tests of silver from food containers discussed above, allowing to obtain information

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

Table 4 Scenario 2.1: laboratory tests involving pristine nanoparticles or products containing nanoparticles

Sample	Nanoparticle composition[a]	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Release studies									
Migration									
Food containers	Ag-	Migration: - 3% acetic acid - 50% ethanol	100 μs	Q	No	Qualitative (NP)	—	ICP-MS SEM-EDS	95
	Ag-	Migration: - 3% acetic acid - 10% ethanol	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS TEM-EDS	96
	Ag-	Migration: - Water - 3% acetic acid - 10% ethanol - 90% ethanol	10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Qualitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration —	ICP-MS SEM-EDS	97
	Ag-	Migration: - Water - 3% acetic acid - 10% ethanol	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	ICP-MS TEM-EDS	98
	Clays (Al-)	Migration: - 3% acetic acid - 10% ethanol	100 ms	Q	No	Qualitative (NP)	—	ICP-MS SEM-EDS	99
	Plastic polymers (C-)	Water	200 μs	Q	No	Qualitative (NP)	—	FESEM	85
Food packaging films	Ag-	Migration: - Water - 3% acetic acid - 10% ethanol	5 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	ICP-MS STEM-EDS	100
Cookware	Al- Ti- Si-	Migration in 3% acetic acid	3 ms	Q	H_2	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration	ICP-MS SEM-EDS	101
Consumer products									
Baby products	Ag-	Leaching in artificial saliva	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	ICP-MS TEM-EDS	98

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

Table 4 (*Contd.*)

Sample	Nanoparticle composition[a]	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Toothbrush	Ag-	Leaching in tap water	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS TEM-EDS	102
Dermal transfer from surfaces (keyboard and painted surface)	Ag- Cu-	Wiping test (artificial sweat) + water extraction	100 μs	Q	No He	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS SEM-EDS TEM-EDS	103
Plaster	Ag-	Water extraction + filtration + CPE	10 ms	Q	No	Quantitative (NP)	Mass concentration NP	ICP-OES TXRF SEM-EDS	104
Textiles	TiO_2	Leaching in water	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS TEM-EDS	105
	Ag	Leaching under washing conditions	5 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	ICP-MS SEM TEM-EDS XANES	106
Washing machine effluent	Ag	—	4 ms 1 ms	DF	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration	ISE TEM-EDS NTA	107
Industrial materials									
CNT polymer nanocomposite	CNT (trace Y)	Leaching in water + surfactant stabilization	100 μs	Q	No	Quantitative (NP)	NP number concentration	XPS ATR-FTIR FESEM	108
Pigmented polyethylene	Fe_2O_3	Leaching in: - 0.05% SDS - Water - Hard EPA water - SRNOM Migration in: - Water - 3% acetic acid - 10% ethanol	5 ms	Q	H_2	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration	ICP-MS TEM AUC FTIR	109

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

Table 4 (*Contd.*)

Sample	Nanoparticle composition[a]	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
ZnO doped polymers	ZnO	Migration to: - Orange juice - Chicken meat - Tris–HCl extraction	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	FAAS TEM-EDS FTIR DLS	110
Antifouling paint	Cu_2O	Leaching in freshwater from painted surface	100 μs	Q	No	Characterisation (NP)	NP size distribution	DLS XRD XPS SEM-EDS TEM-EDS	111
Paint	TiO_2	Leaching in rainwater/snow from painted surface + filtration	50 μs	DF	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS	112
	TiO_2	Leaching in water from painted surface	100 μs	Q	No	—	—	SEM-EDS TEM HRTEM XRD UV-Vis XPS XRD	113
Printed circuits	Ag	Leaching in water	100 μs	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size	SEM AFM AF4-ICP-MS	114
Photovoltaic cells	Ag- Al- Cd- Mo- Se- Zn-	Leaching in: - Model freshwater - Model seawater - Model acidic rainwater	30 ms	Q	No	Qualitative (NP)	—	ICP-MS	115
Wood	Cu-	Leaching in water	—	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	AAS ICP-OES SEM-EDS ATR-FTIR	116
Leather	Ag	Leaching in water	50 μs	Q	No	Qualitative (NP)	—	XPS FESEM	117

Table 4 (*Contd.*)

Sample	Nanoparticle composition[a]	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Paper	Multielement	Collection of airborne particles in filter + suspension in DMEM	—	Q	No	Qualitative (NP)	—	SEM-EDS TEM-EDS	118
Environmental samples									
Road dust	Pt-	Leaching in stormwater runoff	5 ms	Q	He	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	ICP-MS	119
Mine tailings	Th- U-	Leaching in different media + filtration	50 μs	DF	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration DE mass concentration	ICP-MS	120
Fate studies									
Food simulants									
Water Acetic acid (3%) Ethanol (10%)	Ag (spiked)	—	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration NP mass concentration	TEM AF4-MALS	121
Water Acetic acid (3%) Ethanol (10–50%) Olive oil Milk	Ag (spiked)	—	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS	122
In vitro digestion									
Gastric fluid	Au Ag ZnO CeO_2 (spiked)	Gastric step	50 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP number concentration DE mass concentration	SEM	123
Digestion fluids	Ag (spiked)	3-steps *in vitro*-human gastro-intestinal digestion	—	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	SEM-EDS TEM DLS	124
Chicken meat (spiked)	Ag (spiked)	3-steps *in vitro*-human gastro-intestinal digestion	10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP number concentration DE mass concentration	ICP-MS TEM-EDS	125

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

Table 4 (*Contd.*)

Sample	Nanoparticle composition[a]	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Orange juice Chicken meat	ZnO	3-steps *in vitro*-human gastro-intestinal digestion	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	FAAS TEM-EDS FTIR DLS	110
Laundry process									
Washing solutions	Ag (spiked)	—	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration DE mass concentration	STEM-EDS	126
Waters									
Synthetic moderately hard water + NOM	Pt (spiked)	—	50 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	—	127
	Au@Ag (spiked)	—	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	—	128
Ozonized water	Ag (spiked)	—	5 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	ICP-OES DLS	129
Lake water	Ag (spiked)	—	5 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	ICP-MS AF4-UV-Vis	130
	Ag (lake spike)	—	5 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP size distribution NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS	131
	Ag (lake spike)	—	10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS CPE + ICP-MS AF4-ICP-MS	132
	Ag (lake spike)	—	50 μs	DF	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration DE mass concentration	ICP-MS DGT + ICP-MS	133

Table 4 (*Contd.*)

Sample	Nanoparticle composition[a]	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
River water	Ag Ag_2S (spiked)	CPE	500 μs	Q	He	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	HAADF-STEM-EDX	134
	Ag CeO_2 Fe_2O_3 (spiked)	Digestion ($Na_4P_2O_7$)	50 μs	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	ICP-OES AF4-ICP-MS	135
	TiO_2 ZnO (spiked)	—	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	—	136
	Au Ag (spiked)	Fractions collected from HDC	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration	DLS AUC	137
Fresh waters	Ag	—	10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP mass concentration	AF4-ICP-MS	138
Synthetic seawater	Au (spiked)	—	3 ms	Q	No	Characterisation (NP)	Size distribution	AF4-UV-Vis DLS	139
Seawater	Ag Ag_2S AgCl (spiked)	CPE	500 μs	Q	He	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	ICP-MS TEM-EDS	140
Seawater	Ag (spiked)	—	10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration NP mass concentration	TEM	141
Seawater	Ag (spiked)	—	10 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	—	142

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

Table 4 (*Contd.*)

Sample	Nanoparticle composition[a]	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Waste water treatments									
Synthetic wastewater	Ag (spiked)	SPE (Chelex-100)	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	NTA	143
	TiO_2 CeO_2 (spiked)	—	—	Q	No	Qualitative (NP) Qualitative (DE)	—	ICP-MS	144
	Fe + adsorbed Cd(II)	—	3 ms	Q	H_2 (MS/MS)	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	ICP-MS XRD	145
Wastewater	Ag (spiked)	—	500 μs	Q	No	Characterisation (NP)	NP size distribution	EDM-HSI DLS TEM	146
Wastewater	Ag (spiked)	—	1 ms 100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP number concentration DE mass concentration	TEM TOF-SIMS XPS UV-Vis	147
Wastewater	TiO_2 Ag (spiked)	—	3 ms	Q	No	Characterisation (NP)	Average size	ICP-MS STEM-EDS	148
Wastewater River water	Au (spiked)	—	3 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	—	149
Wastewater River water	Ag (spiked)	Centrifugation	10 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	TEM-EDS DLS HDC-RI AF4-UV-Vis-MALS-RI	150
Wastewater River water	Ag (spiked)	HDC online separation	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration	HDC-ICP-MS	
Activated sludge	CNT (trace Y) (spiked)	Centrifugation + ultrafiltration	10 ms	Q	No	Quantitative (NP)	NP mass concentration	ICP-MS TEM-EDS	151
Activated sludge	Ag	Settling	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	—	152

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

Table 4 (*Contd.*)

Sample	Nanoparticle composition[a]	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Biofilm reactor	Ag (spiked)	Settling	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS TEM-EDS	153
Biofilm reactor	Ag (spiked)	Settling	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS TEM-EDS	154
Drinking water treatments									
Fresh water	Ag Au TiO_2 CeO_2 ZnO (spiked)	—	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	TEM-EDS	155
Soils and sediments									
Soil	Ag ZnO TiO_2 CeO_2 (spiked)	Water extraction + centrifugation + filtration	10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	SEM-EDS	156
	Ag (spiked)	Water extraction + filtration + CPE	10 ms	Q	No	Quantitative (NP)	Mass concentration NP	ICP-OES TXRF SEM-EDS	104
	Ag (spiked)	Water extraction + centrifugation + filtration Extraction (DTPA 5 mM) + centrifugation + filtration	10 ms	Q	No	Qualitative (NP)	—	ICP-OES	157
	Ag (spiked)	Extraction (2.5 mM $Na_4P_2O_7$)	50 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	DLS TEM	158
	Ag (spiked)	Extraction (2.5 mM $Na_4P_2O_7$) + settling	50 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration	ICP-MS	159
	Ag (spiked)	Water extraction + centrifugation + filtration	50 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP mass concentration	ICP-MS ISE TEM-EDS DLS	160

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

Table 4 (*Contd.*)

Sample	Nanoparticle composition[a]	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Soil colloids	CuO (spiked)	—	5 ms 100 μs	Q	H_2	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration	DLS	161
Soil sediment	Au (spiked)	Water extraction + centrifugation	10 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	ICP-MS AF4-MALS-UV-ICP-MS DLS	162
Soil sediment	Ag (spiked)	Extraction (2.5 mM $Na_4P_2O_7$) + settling	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration	—	163
Sediment column	Aged Ag (spiked)	Extraction (different media) + centrifugation (+filtration)	5 ms	Q	No	Qualitative (NP)	(Presence of aggregates)	ICP-MS ICP-OES ETAAS TEM SEM-EDS HDC-ICP-MS	164
Sand column	Au (spiked)	—	3 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP size distribution	SEM	165
Biological fluids									
Artificial sweat	Ag (spiked)	—	100 μs	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size	DLS UV-Vis XAS SEM-EDS	166
Plasma Cellular blood fractions	Fe_3O_4 (spiked)	—	100 μs	Q	H_2	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	TEM AF4-UV-MALS-ICP-MS	167

[a] M: nanoparticle with composition M. M-: nanoparticle containing element M.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

about the oxidation of silver nanoparticles to dissolved forms.[121,122] In relation to the potential human exposure to engineered nanoparticles through ingestion, the behaviours of Ag,[123,124] but also of Au,[123] CeO_2 [123] and ZnO[110,123] nanoparticles along *in vitro* gastrointestinal digestions have been studied by SP-ICP-MS through the direct spiking of the digestion fluids[123,124] or foods submitted to the *in vitro* digestions.[110,125] With respect to the dermal exposure to consumer products containing Ag nanoparticles, laboratory experiments with artificial sweat have allowed to detect changes in size of the nanoparticles.[166] The stability of iron oxide nanoparticles in ferumoxytol, an intravenous preparation for treatment of the anaemia, was studied in human plasma and cellular blood fractions.[167] In relation to the life cycle of silver nano-enhanced textiles and their environmental implications, the fate and behaviour of pristine Ag nanoparticles in the washing solutions during the laundry process has also been studied.[126]

Environmental scenarios for studying the fate of nanoparticles by SP-ICP-MS have included different types of real and synthetic surface waters (lake,[130–133] river,[134–137] sea[140–142]) and wastewaters,[143–150,275] as well as soils[104,156–161] and sediments.[162,163] Whereas spiked water samples were usually analysed directly or after dilution, soil analysis required the extraction and the separation of the nanoparticles from the soil matrix. This was done by using water or other extractants, like sodium pyrophosphate,[158,159,163] followed by centrifugation or/and filtration.

Apart from works devoted to demonstrate the capability of SP-ICP-MS for detecting specific nanoparticles in water[142,150] and soil[159,161,163] samples, fate experiments focus mainly on studying the stability[129,143] and transformations (dissolution/oxidation,[128,138] aggregation[127,135]…) of nanoparticles under laboratory controlled conditions, although experiments adding nanoparticles into natural aquifers have also been performed.[131–133] Special attention has been paid to the fate of nanoparticles in relation to drinking and wastewater treatments. The stability of Ag nanoparticles under ozonisation conditions[129] and the removal of different engineered nanoparticle through coagulation processes[155] and wastewater treatments[151–154] have been studied. Soil studies have focused on the interaction of the nanoparticles with soil components, that control their transformations as well as their retention and mobility.[157,162,164,165]

Most studies with environmental samples have focused on Ag nanoparticles,[104,121–126,129–135,137–143,146–148,150,152–160,163,164,166,275] as well as their transformation products, Ag_2S and AgCl.[134,140] Other nanoparticles studied include TiO_2,[136,144,148,155,156] ZnO,[136,155,156] CeO_2,[135,144,155,156] CuO,[161] Fe_2O_3,[135] Pt[127] and Au.[137,149,155,165] Less common nanoparticles like core–shell Au@Ag nanoparticles[128] and carbon nanotubes[151] have also been considered. The influence of the coating[104,129,130,138,141,142,146,157,162,163] and the size[123,126,149,150,155,159,163,165,166,275] of the spiked nanoparticles on the transformations studied have also been considered.

Fate studies focus on the transformations of the nanoparticles in relation to their potential toxicity.[130–132,136,138,141,149,155,164] In general, the mean/median size and size distributions are the most frequent measurands. These measurands are related to the stability of the nanoparticles, but also to their aggregation[110,122–129,131,133,136,138,139,141,145,148,152,157,158,162–164,166] and dissolution.[138,143,144,147,151] For this reason, the concentration of the dissolved element has also been considered in different studies.[122,123,125,126,131,133,136,144,147,153,154,158] To confirm the formation of aggregates, electron microscopy techniques (SEM, TEM),[110,123–125,141,147,151,158,164] DLS[110,124,129,139,158,162,166] or NTA[143] have been used as complementary techniques.

Scenario 2.2: *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo* (eco)toxicological tests

Risk assessment of nanomaterials must be based on exposure information but also on their toxicological behaviour in humans, animals and the environment. Hence, *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo* (eco)toxicological essays worth studying in order to assess these behaviours and effects on living organisms. However, unravelling the mechanisms of action of nanoparticles for the correct interpretation of (eco)toxicity data requires the availability of detailed analytical information from characterising and quantifying nanoparticles and their transformation products in biological media.[34] In this context, SP-ICP-MS has proved to be a valuable technique in recent years, as it is summarized in Table 5. As in the case of the fate studies discussed above, (eco)toxicological test use mostly pristine and well-characterised nanoparticles, commercially available or synthesized at laboratory, allowing to select their size and coating, as well as their concentration levels.

***In vitro* studies.** Bacteria, fungi and algae have been microorganisms used to assess the uptake, biotransformation and ecotoxicity of nanoparticles under laboratory-controlled conditions, in a similar way that it has been done with different types of cells for toxicity assessment.

Because many *in vitro* studies were performed with in-lab synthesised nanoparticles, SP-ICP-MS has been used in combination with other techniques only for characterisation of these pristine nanoparticles.[168,169] The uptake of Te nanoparticles by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was studied by the direct addition of spherical nanoparticles into the culture medium. Their biotransformation to nanorods when they were incorporated into the bacterial strains was confirmed by TEM and XRD, whereas SP-ICP-MS was applied after bacteria lysis to determine the number of particles per bacteria and to infer dimensional information of the rod-shaped Te nanoparticles.[170] The effect of TiO_2, ZnO and Ag nanoparticles on a river bacterial community was studied by mixing river water with artificial treated wastewater containing added nanoparticles. After three days of exposure, water samples were analysed by SP-ICP-MS to determine the mean size and size distributions, as well as the concentration of nanoparticles and dissolved species.[171]

Algae are commonly used in ecotoxicity testing. In this context, the dissolution of Ag nanoparticles and the bioavailability of silver to the model green algae *Chlamydomonas reinhardtii* was studied in a wastewater matrix,[172] using SP-ICP-MS for monitoring the aggregation and dissolution of the nanoparticles. Speciation studies with chromium(III) and (VI) in ISO

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

Table 5 Scenario 2.2: *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo* (eco)toxicological tests

Sample	Nanoparticle composition[a]	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
***In vitro* studies**									
Fungi									
Aspergillus flavus *Aspergillus parasiticus* *Aspergillus carbonarius* *Aspergillus niger* *Aspergillus ochraceus* *Aspergillus steynii* *Aspergillus westerdijkiae* *Penicillium verrucosum*	Ag (spiked)	—	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	TEM DLS	168
Bacteria									
Pseudomonas aeruginosa *Staphylococcus aureus*	Ag (spiked)	—	5 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	TEM-EDS XRD FTIR	169
Staphylococcus aureus *Escherichia coli*	Te (internalized)	Bacteria lysis + centrifugation	5 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	TEM XRD	170
River bacterial community	TiO_2 ZnO Ag (spiked)	—	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	DLS	171
Algae									
Chlamydomonas reinhardtii	Ag (spiked)	Ultracentrifugation	0.5 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS	172
Raphidocelis subcapitata	Cr-(biosynthesis)	Filtration	50 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP size distribution NP number concentration DE mass concentration	AAS TEM NTA	173
Cells									
Human umbilical vein endothelial cells	Au (spiked)	TMAH digestion	10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	FIB-SEM Flow cytometry Confocal microscopy	174

Table 5 (*Contd.*)

Sample	Nanoparticle composition[a]	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Human macrophages and exosomes	Au (spiked)	Ultracentrifugation + lysis	5 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration	TEM NTA Flow cytometry Confocal microscopy	175
Human breast cancer cells	Au (spiked)	TMAH digestion	5 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration	ICP-MS	58
Human epithelial colorectal adenocarcinoma cells Human colon adenocarcinoma mucus secreting cells	Ag (spiked)	Lysis	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS DLS TEM-EDS Confocal microscopy	176
Mouse embryonic stem cells	Ag Ag_2S (spiked)	—	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS TEM DLS	177
Mouse neuroblastoma cells	TiO_2 Ag (spiked)	Lysis	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP number concentration	ICP-MS LA-ICP-MS TEM DLS	178
Trout liver cells	TiO_2 (spiked)	Lysis	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS TEM-EDS DLS Confocal microscopy	179
***In vivo* studies**									
Plants									
Tomato	Au (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10)	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration DE mass concentration	TEM DLS	180
Tomato Pumpkin	CeO_2 (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10)	100 μs	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	ICP-MS TEM	181

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

Table 5 (*Contd.*)

Sample	Nanoparticle composition[a]	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Soybean Cucumber						Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP number concentration DE mass concentration		
Thale cress	Ag (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10)	50 μs	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	ICP-MS TEM	182
Garden cress White mustard	Pt (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10) + filtration	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration DE mass concentration	ICP-MS	183
Thale cress	Ag Cu ZnO (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10)	3 ms	Q	No	Qualitative (NP)	—	ICP-MS SEM-EDS TEM-EDS DLS	184
Cucumber Wheat	Ag_2S (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10)	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP size distribution NP number concentration	DLS SEM-EDS XAS	185
White mustard	Pd (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10)	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	ICP-MS TEM	186
Lettuce	Ag (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10)	10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP size distribution NP mass concentration DE mass concentration	ICP-OES XAS	187
	ZnO (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10)	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration DE mass concentration	ICP-MS HPLC-ICP-MS HPLC-QTOF-MS HPLC-FT-orbitrap-MS	188
	CuO $Cu(OH)_2$ (spiked)	Methanol extraction (50%)	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	ICP-MS TEM	189
Lettuce Kale Collard green	CuO (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10)	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration DE mass concentration	FESEM TEM	190

Table 5 (*Contd.*)

Sample	Nanoparticle composition[a]	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Wheat	Ag (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10)	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS TEM DLS	191
	Ag Au (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10)	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP size distribution NP mass concentration DE mass concentration	TEM	192
Rice	TiO_2 (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10)	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP size distribution NP number concentration	ICP-OES DLS STEM-EDS	193
Rice Soybean	Ag (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10)	50 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (DE)	NP size distribution DE mass concentration	TEM-EDS	194
Radish	CeO_2 CuO (spiked)	Gastrointestinal digestion	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS	195
	TiO_2 (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10)	100 μs	Q	O_2/H_2 (MS/MS)	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS	196
	CeO_2 (spiked)	Enzymatic digestion (macerozyme R-10) + filtration	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	ICP-MS LA-ICP-MS	197
Soil organisms									
Lumbriculus variegatus	Ag Au (spiked)	TMAH digestion	10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS	198
Lumbriculus variegatus	Ag (spiked)	Water extraction + centrifugation + filtration	—	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	ICP-OES TEM DLS AF4-ICP-MS	199

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

Table 5 (*Contd.*)

Sample	Nanoparticle composition[a]	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Lumbriculus rubellus	Ag (spiked)	Enzymatic digestion (collagenase + hyalunoridase + proteinase K) + centrifugation	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS FESEM-EDS DLS	200
Caenorhabditis elegans	Au (spiked)	TMAH digestion	10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP size distribution NP number concentration	ICP-MS SEM-EDS TEM DLS ICP-MS	201
Aquatic organisms									
Daphnia magna	Ag Au (spiked)	TMAH digestion	10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS	198
	Ag nanowire (spiked)	Collection of hemolymph	10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS SEM TEM	202
Mussel	TiO_2 (spiked)	Enzymatic digestion (proteinase K)	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	ICP-MS TEM	203
Zebra fish (liver, intestine, gills)	Au Ag (spiked)	TMAH digestion + filtration	1 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP mass concentration	TEM	204
Zebra fish (intestine, liver, gills, brain)	CeO_2 TiO_2 (spiked)	Enzymatic digestion (proteinase K) + H_2O_2 digestion	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS TEM DLS	205
Trout (liver)	Ag (spiked)	TMAH digestion	3 ms	Q	He	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	—	54

Table 5 (*Contd.*)

Sample	Nanoparticle composition[a]	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Rat tissues									
Spleen	Au (spiked)	TMAH digestion	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	—	206
	TiO_2 (spiked)	Enzymatic digestion (proteinase K)	3 ms	Q	NH_3	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	SEM-EDS TEM	207
Liver	Au (spiked)	Lysis + centrifugation	10 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP size distribution	TEM HPLC-ICP-MS	208
	SiO_2 (spiked)	Enzymatic digestion (proteinase K)	3 ms	Q	CH_4	Characterisation (NP)	NP mean size	ICP-MS TEM	209
Liver Lung	CeO_2 TiO_2 (spiked)	Enzymatic digestion (proteinase K)	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP size distribution NP mass concentration	ICP-MS DLS TEM	210
Lung Kidney Blood	TiO_2 nanorods (spiked)	HCl/HNO_3 digestion + filtration	—	Q	—	Qualitative (NP)		TEM SEM-EDS DLS	211
Foetus, resorption, placenta, lung, liver, spleen, kidney, mammary gland	Ag (spiked)	TMAH digestion	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	TEM-EDS	212
Stomach, intestinal content, liver, spleen, kidney, lungs, blood	Ag (spiked)	Enzymatic digestion (proteinase K)	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP mass concentration DE mass concentration	AAS TEM DLS	213
Chicken tissues									
Liver Yolk	Ag (spiked)	Enzymatic digestion (proteinase K)	2 ms	DF	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	AAS SEM-EDS	214
***Ex vivo* studies**									
Human placenta	Ag (spiked)	Enzymatic digestion (proteinase K)	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	TEM DLS	215

[a] M: nanoparticle with composition M. M-: nanoparticle containing element M.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

Table 6 Scenario 3.1: analysis of foods

Sample	Nanoparticle composition[a]	Sample preparation	Dwell time	Mass analysers	Collision/reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Confectionery									
Cakes Candy Chewing gum	TiO_2	H_2O_2 digestion	3 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP size distribution	ICP-MS AF4-ICP-MS	216
Chewing gum	TiO_2	Water extraction	10 ms	Q	NH_3 (MS/MS)	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP size distribution NP number concentration		217
Silver pearls	Ag	Water extraction	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS TEM-EDS HAADF-STEM	218
Silver pearls Decoration dusting powder	Ag Al Au	Water extraction + centrifugation	5 ms	Q	No	Qualitative (NP)		ICP-MS	44
Custard cream Candies Pearls Confectionery masses	TiO_2		100 μs	Q	No	Qualitative (NP)		TEM-EDS CLS	219
Candies	TiO_2	Water extraction + filtration	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration DE mass concentration	AF4-MALS-ICP-MS DLS	79
Candies	TiO_2	Centrifugation	100 μs	Q	No	Characterisation (NP)	NP size distribution	SEM	220
Silver coated chocolate and pearls	Ag	Ethanol wetting + dispersion in 0.05% BSA	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	TEM	43

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

Table 6 (*Contd.*)

Sample	Nanoparticle composition[a]	Sample preparation	Dwell time	Mass analysers	Collision/reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Meat									
Game meat	Pb	Enzymatic digestion (proteinase K)	5 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS	221
Miscellaneous									
Noodles	Al-	Enzymatic digestion (α-amylase)	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution DE mass concentration	ICP-MS	222
Drinks Chocolate Coffee Chewing gum Silver pearls	Ti- Si- Ag-	Water extraction + filtration	100 μs	Q	He	Characterisation (NP) Quantitative (DE)	NP mean size DE mass concentration	ICP-MS DLS AF4-MALS-ICP-MS	223
Surimi sticks	TiO_2	Enzymatic digestion (pancreatin and lipase)	100 μs	Q	He	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration DE mass concentration	ICP-MS TEM	224

[a] M: nanoparticle with composition M. M-: nanoparticle containing element M.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

8692 algal medium showed the formation of Cr-bearing nanoparticles, detected by SP-ICP-MS, which could contribute to the ecotoxicity of chromium to *Raphidocelis subcapitata*.[173]

The risk assessment of nanoparticles in living beings involves the proper evaluation of their behaviour at cellular level by *in vitro* assays. Within this framework, SP-ICP-MS has been used in a number of studies with human cell lines (umbilical vein endothelium,[174] macrophages and exosomes,[175] breast cancer,[58] human epithelial colorectal adenocarcinoma and colon adenocarcinoma mucus secreting cells[176]) but also mouse (embryonic stem[177] and neuroblastoma[178]) and liver trout[179] cells. The uptake of nanoparticles by cells was demonstrated to be dependent on their concentration in the media,[174] exposure time and cell line.[58] SP-ICP-MS allowed to study their biotransformations,[176] as well as their dissolution and agglomeration[176] within the cells. Moreover, the release of internalised nanoparticles by macrophages through exosomes could also be confirmed.[175]

Au nanoparticles have been more frequently used in these *in vitro* studies with cells,[58,174,175] although Ag,[176–178] Ag_2S[177] and TiO_2 (ref. 178 and 179) have also been investigated. After exposure in the culture media containing the nanoparticles, cells were separated by centrifugation and lysed[175,176,178,179] or digested with TMAH[58,174] as a previous step to the analysis by SP-ICP-MS.

***In vivo* studies.** Release of engineered nanoparticles to the environment may end up and accumulate in edible plants, which is a potential pathway to human exposure. SP-ICP-MS has been used to study the uptake of nanoparticles by different types of plants in suitable growing media (hydroponic solutions[185,187,192] and soils[180–184,186,188,191,193–197]) containing known concentrations of nanoparticles of selected compositions and sizes. Edible plants like tomato, pumpkin, soybean, cucumber, thale cress, garden cress, white mustard, lettuce, kale, collard green, wheat, rice, soybean and radish have been selected for these experiments. Most of uptake studies have involved Ag nanoparticles,[182,184,187,191,192,194] but also Ag_2S,[185] Cu,[184] CuO/$Cu(OH)_2$,[189,190,195] ZnO,[184,188] CeO_2,[181,195,197] TiO_2,[193,196] Au,[180,192] Pd[186] and Pt.[183] By analysing different parts of the plants (roots, leaves, fruits), the uptake of nanoparticles through the roots and their translocation to other parts as intact particles or dissolved has been followed.[183,196] In addition to the uptake of nanoparticles through the roots, the foliar exposure has been also assessed for Ag[194] and CuO[189,190] nanoparticles. In the case of silver, the transformation of Ag nanoparticles after foliar exposure to ionic silver was reported.

In most cases, plant tissues were enzymatically digested by using macerozyme R-10, an enzyme mixture able to break down vegetal cell walls maintaining nanoparticles intact, as confirmed by several authors.[182,190] To avoid dissolution of CuO/$Cu(OH)_2$ nanoparticles, Laughton *et al.*[189] proposed the use of methanol for extraction of the nanoparticles from lettuce leaves as an alternative to the enzymatic digestion.

The assessment of the nanoparticle ecotoxicity in aquatic and terrestrial environments is based on the use of model organisms. In this context, the bioaccumulation of Ag[198–200] and Au[198,201] nanoparticles in spiked sediments and soils has been studied in the earthworms *Lumbriculus variegatus*,[198,199] *Lumbriculus rubellus*[200] and *Caenorhabditis elegans*.[201] Homogenates of the whole organisms were submitted to enzymatic[200] or alkaline[198,201] digestions, as well as to water extraction[199] prior to SP-ICP-MS analysis.

In relation to ecotoxicity studies in aquatic environments, the uptake of Ag[198,202] and Au[198] nanoparticles by *Daphnia magna* was studied by analysing the hemolymph of the daphnids,[202] as well as whole organisms after alkaline digestion with TMAH.[198] In the case of mussels, Gallocchio *et al.*[203] suggested the *in vivo* formation of TiO_2 nanoparticles after their exposure to both ionic and particulate titanium. Zebra fish[204,205] and trout[54] have also been used as target species for ecotoxicological studies with Ag, Au, TiO_2 and CeO_2 nanoparticles. The bioaccumulation of these nanoparticles was assessed by analysing different organs of the fishes (liver, intestine, gills, brain) by SP-ICP-MS after their digestion with TMAH or proteinase K.

Rats has been used extensively as model mammals for the toxicity assessment of nanomaterials. Different nanoparticles have been administered in a number of ways (oral gavage,[207,213] intravenous injection,[206] intratracheal instillation,[210] nose inhalation[212] or intraperitoneal injection[208]) and their bioaccumulation and distribution in tissues were investigated by SP-ICP-MS. van der Zande *et al.*[213] reported the detection of silver nanoparticles in all the tissues studied after oral gavage, although the target organs were liver and spleen. Usually, samples were subjected to digestion with TMAH or proteinase K prior to SP-ICP-MS. Gallocchio *et al.*[214] evaluated the oral administration of PVP-stabilized 20 nm Ag nanoparticles to chickens, detecting 16 nm nanoparticles in liver, but only ionic silver in egg yolks.

***Ex vivo* studies.** Experiments involving human tissues are scarce, nonetheless Vidmar *et al.*[215] conducted an *ex vivo* study involving human placentas obtained from pregnancies after caesarean section. The SP-ICP-MS analysis of the perfusion experiment confirmed the translocation and accumulation of Ag nanoparticles, although it could not be confirmed if the Ag-containing particles detected in the foetal circulation were translocated pristine Ag nanoparticles or Ag-bearing particles formed from dissolved silver that crossed the placental barrier.

Scenario 3.1: analysis of foods

A number of inorganic substances are approved as food additives by different regulations. Whereas metallic aluminium (E173), silver (E174) and gold (E175) are used to colour the external coating of confectionery, TiO_2 (E171) is added to provide a whitening effect, and SiO_2 (E551) as anticaking agent. All these additives have been re-evaluated recently by the European Food Safety Authority in relation to their safety, recommending that information about particle size and percentage (in number) of particles in the nanoscale should be included in their specifications when present in powder forms. Thus, as it has been seen in scenario 1 with E171 and E174 additives, regulatory requirements are the main driving factors for monitoring these elements by SP-ICP-MS, along with studying their occurrence as nanoparticles in foods. Table 6

Table 7 Scenario 3.2: analysis of environmental samples

Sample	Nanoparticle composition[a]	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Soils, sediments and sludges									
Soil	Fe-	Water extraction + centrifugation	3 ms	Q	NH_3	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	ICP-MS NTA DLS TEM AF4-UV-ICP-MS	225
Mine tailings	$FeAsO_4 \cdot 2H_2O$ (scorodite)	Water extraction + centrifugation	5 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP size distribution NP mass distribution	ICP-MS EXAFS XAS TEM-EDS	226
Lake sediment	Ag-	Water extraction + centrifugation + filtration	50 μs	DF	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS	227
	Ag- Ti-	Extraction (TMAH)	50 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS	228
Road runoff sediment	Cu- Zn- Zr- Cd- Ce- Pt- Pb-	Surfactant extraction + centrifugation	5 ms	Q	H_2 + He	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean mass NP size distribution NP mass distribution NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS	229
Sewage sludge	Ti-	Digestion (HNO_3 + H_2O_2) + filtration	3–10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS	230
	Ti- Fe- Zn-	Extraction (acetic acid) and centrifugation	100 μs	Q	n.r.	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS FESEM-EDS TEM-EDS LDA	231
	Ti-	Extraction (sodium pyrophosphate) + centrifugation	—	TOF	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mass distribution NP number concentration	ICP-MS TEM	232

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

Table 7 (*Contd.*)

Sample	Nanoparticle composition[a]	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Waters									
Fresh waters	Ti-	Filtration	50 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS TEM-EDS	56
	TiO_2	Filtration	50 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP number concentration DE mass concentration	SEM-EDS FESEM	233
	Ti-	—	10 ms	Q	No	Quantitative (NP)	NP number concentration	ICP-MS ICP-OES SEM-EDS	234
	Ti-	Centrifugation	4 ms 3 ms	Q TOF	NH_3 + He (MS/MS) No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP size distribution NP number concentration	TEM	235
	Ti-	—	50 μs	DF	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	—	77
	Ti-	—	3 ms	Q	No	Quantitative (NP)	NP number concentration	ICP-MS ICP-OES	236
	Ti-	Filtration	10 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	CPE/TEM-EDS	237
	Ti-	Filtration	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	ICP-MS ICP-AES TEM-EDS HPLC-UV	238
	Ag-Ti-	—	50 μs	Q	No	Characterisation Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS	228

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

Table 7 (*Contd.*)

Sample	Nanoparticle composition[a]	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
	Ag	Filtration	50 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP number concentration DE mass concentration	—	239
	Ag	Filtration	1 ms	DF	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	ICP-MS ICP-AES IC	240
	Ag-	Cloud point extraction	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP size distribution NP mass concentration	ICP-MS ETAAS	241
	Ag- Ti- Ce-	—	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	—	38
	Ag- Ti- Au-	—	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration DE mass concentration	FESEM-EDS	242
	Ce- Zn-	—	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration DE mass concentration	—	243
	Ti- Ce-	Filtration	1 ms	DF	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP size distribution NP number concentration	ICP-MS ICP-AES FESEM-EDS IC	244

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

Table 7 (*Contd.*)

Sample	Nanoparticle composition[a]	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
River water Rainwater	Ce- La-	—	50 μs	DF TOF	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	—	245
	Zn-	Ion exchange (on line)	50 μs	DF	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP mean mass NP mass distribution NP number concentration DE mass concentration	TEM-EDS	55
Seawater	Ag- Ti- Cu- Zn-	—	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	ICP-MS	246
Sea water Fresh water	Ag- Ti- Ce-	Filtration	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	—	247
Wastewater	Ag-	Filtration	5 μs	Q	No	Characterisation (NP)	NP size distribution	ICP-MS ICP-OES	248
	Ag-	Settling	20 ms	Q	No	Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mass concentration DE mass concentration	—	249
	Ag-	Filtration	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration DE mass concentration	—	250
	Ag- Ti- Ce-	Filtration	100 μs	DF	No	Quantitative (NP)	NP number concentration	—	251
Wastewater River water	Zn-	Cation exchange separation	0.5 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP mass concentration DE mass concentration	—	252

Table 7 (*Contd.*)

Sample	Nanoparticle composition[a]	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Wastewater River water	Zn-	Settling and filtration	100 μs 3 ms	Q TOF	No H_2 + He	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	ICP-OES	253
Wastewater River water Lake water	Ag-	—	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	CPE + ETAAS	254
Tap water	Ag- Ti- Pb- Sn- Cu- Fe-	—	10 ms	Q	n.r.	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP size distribution NP mass concentration DE mass concentration	TEM-EDS	255
	Ag-	Cloud point extraction	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	ETAAS	256
Various types of waters	Ag-	—	0.5 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	—	257
Throughfall water	Cu-	—	100 μs	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size	ICP-MS DLS AF4-MALS-ICP-MS	258
Acid mine drainage	Fe- Cu-	—	100 μs	Q	NH_3	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP size distribution NP number concentration	ICP-OES STEM-EDS IC	259
Landfill leachates	Ti-	Filtration + surfactant stabilization (0.1% NovaChem 100)	3 ms	Q	NH_3	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP size distribution NP number concentration	ICP-OES SEM-EDS STEM-EDS DLS	260
Miscellaneous									
Cigarette smoke	As-	Electrostatic trapping	100 μs	Q	No	Qualitative (NP)		ICP-MS HPLC-ICP-MS	261

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

Table 7 (*Contd.*)

Sample	Nanoparticle composition[a]	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Gas condensate	Hg-	Dilution with THF	100 μs	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size	ICP-MS	262
							NP size distribution	STEM-EDS	
						Quantitative (NP)	NP number concentration	AF4-UV-MALS-ICP-MS	
							NP mass concentration		
						Quantitative (DE)	DE mass concentration		

[a] M: nanoparticle with composition M. M-: nanoparticle containing element M. n.r.: not reported.

summarises the applications of SP-ICP-MS in relation with food analysis.

TiO_2 has been studied in different confectionery products, such as candies,[79,216,219,220,223] chewing gum,[216,217,223] pastry products[219] or cakes,[216] but also in drinks[223] and surimi sticks.[224] These samples were typically subjected to water extraction, followed by centrifugation or filtration,[79,217,219,220] although Peters *et al.*[216] proposed the digestion with hydrogen peroxide to release the particles from the coating of the products. For the analysis of surimi sticks, samples underwent enzymatic digestion with pancreatin and lipase.[224] The occurrence of particulate and dissolved aluminium in noodles was studied by Loeschner *et al.*,[222] after enzymatic digestion with α-amylase of the food products. Metallic silver, aluminium and gold are available as decorating powders or found as coatings of confectionery products.[43,44,218] In these cases, samples had to be dispersed or extracted with water, or adding albumin as stabilising agent.[43] A different issue was addressed by Kollander *et al.*,[221] who studied the presence of Pb nanoparticles from ammunition in meat of hunted wild animals. Samples from the shot areas were digested with proteinase K and analysed by SP-ICP-MS, detecting Pb nanoparticles.

Although some analysis only focused on detecting the presence of nanoparticles in the samples,[44,219] most of them covered their size characterization and the determination of number and mass concentrations as well. Moreover, most works included the determination of the total content of the elements under study in their analysis schemes, as well as considering the use of electron microscopy techniques[43,218–220,224] or AF4 separations[79,216,223] to verify or complement the results obtained by SP-ICP-MS.

Scenario 3.2: analysis of environmental samples

The widespread use of engineered nanomaterials in consumer products has increased their potential risk of environmental contamination, and consequently, the need and demand of analysis of environmental samples (waters, soils, sediments, sludges…) to provide reliable field information about their actual occurrence. On the other hand, SP-ICP-MS is also a suitable technique for monitoring naturally occurring or incidental nanomaterials.[32] In fact, an still unresolved challenge in this scenario is the discrimination between engineered and natural occurring nanomaterials, which will be discussed below.

Table 7 summarizes different environmental samples analysed by SP-ICP-MS. Most cases refer only to the detection of nanoparticles containing the monitored element because the chemical composition of the particles was not available. Thus, the size information reported was based on assuming a specific composition (*e.g.*, metallic Ag, TiO_2) and a spherical shape. When the authors did not confirm the composition of the nanoparticles by an alternative technique, nanoparticles in Table 7 are referred as nanoparticles containing a specific element (*e.g.*, Ag-, Ti-, Ce- instead of Ag, TiO_2, CeO_2).

In most studies, total element concentrations were determined by ICP-MS or other atomic spectrometry techniques (ICP-OES, AAS) to obtain complementary information of the

samples. The use of complementary techniques, like TEM/FESEM or EXAF/XAS, for confirming the presence of nanoparticles or aggregates and obtaining information about morphology, size and composition of the particles was limited to samples containing particles at high enough concentrations.[55,56,225,226,231–234,237,238,242,244,255,259]

Soils, wastes, sediments and sludges. Solid environmental samples analysed by SP-ICP-MS include soils,[225] mine wastes,[226] sediments[227–229] and sludges from wastewater treatment plants.[230–232] In the latter case, these analyses were complemented by the analysis of the influent and the treated effluent of the plants,[230,231] or the analysis of the sediments of lake where discharges were carried out.[229] The nanoparticles of interest were diverse, comprising particles containing elements such as Ag,[227,228] As,[226] Ti,[228,230–232] Fe,[225,231] Zn,[229,231] Cu,[229] Pb,[229] Pt,[229] Cd,[229] Ce,[229] or Zr.[229] Sample preparation involved the extraction of the particulate matter with ultrapure water,[225–227] the addition of surfactants[229] or other reagents (sodium pyrophosphate,[232] acetic acid[231] or TMAH[228]); in the case of particles containing Ti, stronger procedures based on microwave acid digestion have also been applied.[230] These treatments were followed by a separation step consisting of centrifugation, filtration, or both sequentially, prior to the analysis of the corresponding supernatant or filtrate.

In relation to the information reported, only Gomez-Gonzalez *et al.*[226] determined by EXAFS and XAS the nature of the As-containing particles detected by SP-ICP-MS in mine tailings ($FeAsO_4 \cdot 2H_2O$, scorodite), providing real size information confirmed by TEM. Due to the unknown nature of the particles detected, Baur *et al.*[229] reported mean mass per particle and mass per particle distributions instead of information as equivalent size, which was the characterisation information typically reported, along with particle mass and number concentrations, as well as dissolved element concentrations.

Waters. Different types of waters have been analysed by SP-ICP-MS, including fresh waters from lakes, rivers and dams, as well as rain, sea, tap, pool and waste waters. The reasons for carrying out these analyses are diverse. The monitoring of titanium in river, lake and swimming pool waters is associated to the release of TiO_2 nanoparticles from sunscreens.[234–238] Silver has been monitored in different types of waters, although the most relevant studies are related to the removal of silver containing particles in wastewater treatment plants,[248–251,254] which has been also the case for Ti-,[251] Zn-[252,253] and Ce-containing particles.[251] In the case of cerium, CeO_2 nanoparticles can be released into the air by diesel emissions being detected in rain water[245] and other natural waters.[38,243–245,247,251] Tap waters have been analysed in relation to the release of incidental nanoparticles containing different metals from copper pipes.[255,256] Throughfall water from the wash-off of vine leaves treated with Cu-based fungicides has also been analysed by SP-ICP-MS in combination with other techniques to study the mobilization of Cu-containing particles.[258] The occurrence of Zn-,[246] Ag-,[246,247] Ti-,[246,247] Cu-[246] and Ce-[247] containing particles[45] has also been monitored in seawaters. SP-ICP-MS was used to study acid mine drainage by monitoring Fe- and Cu-containing particles and the effects of water chemistry,[259] as well as the release of titanium from construction and demolition landfills by analysing their leachates.[260]

With respect to the preparation of water samples, the simplest procedures only involved the dilution of the sample, although settling, centrifugation or filtration were also applied when suspended matter was present.

In relation to the information reported, a reduced number of works provided qualitative information,[236,248,258,274] relying on time scans (Fig. 2a) to prove the presence of particles, whereas most of articles provided quantitative information, including mean/median particle sizes, particle size distributions and particle mass and number concentrations, despite that partial size distributions were obtained in some cases.[226,235,241,248,259] In this regard, although Rand and Ranville[259] have demonstrated the utility of SP-ICP-MS for detecting incidental nanoparticles in natural systems, they also recommended caution in the data treatment and their interpretation.

In an attempt to discriminate between anthropogenic engineered nanoparticles from natural ones, the measurement of element ratios has been proposed. This strategy assumes that engineered nanoparticles are high purity substances, containing a single major element, while natural nanoparticles have heterogeneous multielement compositions. The Ce/La ratio has been reported for identification of CeO_2 nanoparticles,[244,245,247] whereas for TiO_2 nanoparticles, the Ti/Al and Ti/V ratios have been considered.[232,234–236,238,244,247] Whereas SP-ICP-MS with quadrupole instruments is limited to the measurement of two isotopes in an individual particle, TOF instruments are able to record the whole mass spectrum from each particle. In this respect, a promising approach for discrimination of anthropogenic and natural particles was proposed by Praetorius *et al.*[276] based on the combination of single particle multielement analysis by SP-ICP-TOF-MS and machine learning data treatment.

Miscellaneous. The analysis of gaseous systems by SP-ICP-MS has been limited to condensates from cigarette smoke to study the presence of arsenic containing particles.[261] Condensates from cigarette smoke were accumulated in an electrostatic trapping device followed by washing with methanol. Whereas different inorganic and organoarsenic dissolved species were determined by HPLC-ICP-MS, no As containing particles were detected by SP-ICP-MS. Gas condensates from petroleum hydrocarbon samples were analysed by a number of techniques, including SP-ICP-MS, confirming the presence of Hg-containing nanoparticles by direct analysis of the samples diluted in THF.[262]

Scenario 3.3: analysis of biological samples

The potential exposure of living organisms, including humans, to engineered nanoparticles has led to study their occurrence in such biological systems. Other applications include the detection of wear metal particles from prothesis in human fluids and tissues, as well as nanoparticles biosynthesised by microorganisms. Table 8 summarizes the applications under this scenario involving biological samples originally containing nanoparticles. As in scenario 3.2, in most works total element concentrations were determined by ICP-MS and also electron

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

Table 8 Scenario 3.3: analysis of biological samples

Sample	Nanoparticle composition[a]	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Microorganisms									
Yeast	Se	Enzymatic digestion (protease)	5 ms 100 μs	Q	H_2	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	ICP-MS SEC-ICP-MS TEM-EDS	263
Aquatic organisms									
Molluscs	Ag-	Enzymatic digestion (pancreatin/ lipase)	50 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	ICP-MS SEM	264
	Ti-	Enzymatic digestion (pancreatin/ lipase)	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	ICP-MS DLS	265
	Ag- Ti- Cu- Zn-	Enzymatic digestion (pancreatin/ lipase)	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS	246
	20 elements	Alkaline digestion (TMAH) + filtration	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	ICP-MS	266
Various (plankton, crustaceans, molluscs, fish)	Ag- Ti-	Alkaline digestion (TMAH)	50 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS	228
Human fluids and tissues									
Blood	Ag	—	5 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP) Quantitative (DE)	NP mean hydrodynamic diameter NP mean mass per particle NP number concentration NP mass concentration DE mass concentration	HDC-SP-ICP-MS μXRF μXANES	267

Table 8 (*Contd.*)

Sample	Nanoparticle composition[a]	Sample preparation	Dwell time	Mass analyser	Collision/ reaction cell gas	Analytical information	Measurands	Complementary techniques	Ref.
Urine	Ag- Ti-	—	100 μs	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	ICP-MS	268
Hip fluid	Co- Cr-	Enzymatic digestion (proteinase K)	3 ms	Q	No	Characterisation (NP)	NP mean size NP size distribution	ICP-MS AF4-UV-MALS AF4-ICP-MS	269
Periprosthetic tissue	Ti- Ta- Co- Cr- Mo- Al- V-	—	3 ms	Q	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP number concentration	ICP-MS SEM	270
Liver Spleen Kidney Intestine	TiO_2 SiO_2	Enzymatic digestion (proteinase K)	2 ms 100 μs	DF Q	No H_2	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP mean size NP size distribution NP mass concentration	ICP-MS SEM-EDS	271
Liver Spleen	TiO_2	Enzymatic digestion (proteinase K)	2 ms	DF	No	Characterisation (NP) Quantitative (NP)	NP size distribution NP number concentration NP mass concentration	ICP-MS SEM-EDS	272
Exhaled breath condensate	SiO_2	—	3 ms	Q	He	Qualitative (NP)	—	TEM-EDS	273
Miscellaneous									
Gunshot residue wash from shooter's hand	Sb- Ba- Pb-	Washing with water Swabbing + water extraction	30 μs	Q	No	Qualitative (NP)	—	—	274

[a] M: nanoparticle with composition M. M-: nanoparticle containing element M.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

microscopy techniques were applied to obtain complementary information.

Microorganisms. Nanoparticles synthesized by microorganisms from dissolved precursors can be analysed by SP-ICP-MS in a similar way than those internalized from culture media once the microorganisms have been selectively digested, as it has been seen in scenario 2.2. This was the case of selenium-rich yeast,[263] where biogenic-selenium nanoparticles where detected by SP-ICP-MS and confirmed by TEM-EDS, revealing the significance of nanoparticles in the speciation of metals and metalloids in biological systems.

Aquatic organisms. The analysis of aquatic organisms has included plankton,[228] crustaceans,[228] molluscs[228,246,264–266] and fishes.[228] In all cases, prior to SP-ICP-MS analysis, nanoparticles were extracted by digestion of the biological matrices. Enzymatic digestions included the use of pancreatin/lipase,[246,264,265] whereas alkaline digestions were based on the use of TMAH.[228,266] The most studied elements have been Ti[228,246,265] and Ag,[228,246,264] although nanoparticles containing Cu,[246] Zn[246] or different rare earth elements[266] have been also considered. In relation to the information reported, all the articles provided quantitative information of particle mass and number concentration, particle size distribution and mean size. Reported size detection limits and size distributions allowed to confirm that nanoparticle distribution were incomplete in some cases.[246,264,266] Moreover, and although SEM and DLS were used in some studies, these techniques did not provide conclusive information, hence the studies only confirmed the occurrence of particles containing the elements detected and not their specific nature.

Human body fluids and tissues. Although the monitoring of Ag-, Ti- and Si-bearing nanoparticles is supported by the potential exposure to Ag, TiO_2 and SiO_2 engineered nanoparticles,[268,271,272] human fluids and tissues have also been analysed in relation with the release of incidental nanoparticles containing different elements from metal prothesis[269,270] and their migration from wound dressings.[267] Moreover, exhaled breath condensates were analysed to detect the presence of respirable silica particles in quarry workers.[273] In this latter work, the combination of SP-ICP-MS and TEM-EDS allowed to confirm the presence of silica and silicate particles in the breath condensates. Post-mortem tissues (liver, spleen, kidney, intestine) from deceased persons were analysed after enzymatic digestion with proteinase K, providing detailed information about the SiO_2 and TiO_2 found in the tissues and confirmed by SEM-EDS.[271,272] On the other hand, periprosthetic tissues and hip fluids from arthroplasty patients were also analysed by SP-ICP-MS, confirming the presence of particles containing Co, Cr, Ti, V, Al, Ta and Mo and the importance of *in vivo* exposure assessments for realistic appraisal of metal toxicity and associated risks in arthroplasty.[269,270]

Urine[268] and blood[267] samples were analysed directly after dilution with 1% glycerol or ultrapure water, respectively. Whereas particles containing Ti and Ag were detected in urine, only dissolved Ag was detected in blood from burned patients treated with wound dressings containing Ag nanoparticles.

SP-ICP-MS has also been used with forensic purposes for the direct analysis of gunshot residues.[274] Residues were sampled from the hands of shooters by washing with ultrapure water or swabbing (followed by water extraction from the swabs) to obtain the nanoparticle suspensions, which were analysed directly for screening the presence of Sb-, Ba- and Pb-bearing particles.

Instrumentation and data acquisition

As explained above, SP-ICP-MS was originally developed in commercial quadrupole mass spectrometers with data acquisition frequencies in the range of 1–100 Hz, by using dwell times in the millisecond range. The implementation of single particle detection in quadrupole instruments by manufacturers implied that higher acquisition frequencies became feasible by working at dwell times in the microsecond range, removing the settling time of the quadrupole between readings and improving the capability for transmission and storage of data. Although this new generation of instruments was commercially available since 2014, Tables 2–8 show that both ranges of dwell times are being currently used, mostly depending on the availability of instruments, with 45% and 55% of applications using microsecond and millisecond dwell times, respectively. In any case, the duration of the particle events limits the selection of dwell times. Dwell times longer than twice the duration of the events are recommended[17] when working at millisecond dwell times to record the particle events as pulses, whereas for microseconds, they should be shorter than half the duration of the events. Working at dwell times longer than 10 ms increases the number of events corresponding to two or more nanoparticles, whereas dwell times around the duration of a single nanoparticle event (300 μs to 1 ms) makes difficult to confirm whether the recorded events correspond to one or more nanoparticles. In any case, an adequate dilution of the sample must be made, if needed, in accordance with the dwell time used, because it also affects to the number concentration linear range.[13] In spite of these constraints, dwell times in the range of 0.5–2 ms have been used in several works, compromising the quality of their results.

The feasibility of using microsecond dwell times with double focusing ICP-MS also depends on the instrument, with last generation instruments capable of working down to 10 μs.[11] In a similar way, a new design of TOF mass spectrometer with a temporal resolution of 33 μs became commercially available recently.[9] In either case, their less widespread use is reflected in the low number of applications found in Tables 2–8. The main feature of TOF instruments lies in their simultaneous multielement capability, recording nearly the whole mass spectrum within each reading. Although applications of SP-TOF-ICP-MS are still scarce, the technique offers unique performance for multi-element and isotope ratio analysis in individual nanoparticles, and for discerning between naturally occurring and engineered nanoparticles.[32] Although multielement SP-ICP-MS with quadrupole instruments has also been reported,[277] it is limited to monitoring up to two isotopes, and is not commercially available yet.

Apart from resolving spectral interferences, double focusing instruments provide better transmission efficiency and hence improved sensitivity with respect to quadrupole and TOF instruments, resulting in the lowest available size LODs.[77] The lower resolution of quadrupole ICP-MS is compensated by using single quadrupole instruments with collision/reaction cells (see Tables 2–8), as well as multipole instruments in MS/MS mode,[145,196,217,235] to reduce polyatomic interferences and improve size limits of detection for nanoparticles containing Ti, Fe, Si or Se. However, the collisions/interactions of the ion cloud generated by each particle with the collision/reaction gases increase the duration of the particle events, affecting the performance of the measurements.[278] In fact, the use of short dwell times instead of collision/reaction cell technologies has been proposed as an alternative for improving size LODs for silica particles.[279]

Sample preparation

When ICP-MS is used in single particle mode, the preservation of most of the properties of the nanoparticles is mandatory, hence sample treatments should be reduced to the minimum required. Apart from the extraction of the nanoparticles from solid samples, sample treatments prior to SP-ICP-MS measurements have been limited to clean-up procedures for removal of large particles or fats, the separation of nanoparticles from dissolved species and the preconcentration of the formers.

As it has been shown in the different scenarios discussed above, extraction of nanoparticles from solid samples can involve just the use of water or aqueous solutions containing surfactants, although 50% methanol has been proposed to avoid the dissolution of copper oxide nanoparticles.[189] However, for more refractory nanoparticles, like TiO_2, SiO_2 or CeO_2, more aggressive treatments based on the use of strong acids and/or hydrogen peroxide have been applied.[83,205,216,230] Nanoparticles from soils and sediments have been often extracted with tetrasodium pyrophosphate,[158,159,163] commonly used to disperse soil heteroaggregates. On the other hand, biological samples require the degradation of the organic matrix by using alkaline reagents, like TMAH, or enzymes. In this regard, enzymatic digestions of plant samples have relied exclusively on the use of macerozyme R-10, a mixture of cellulase, hemicellulase and pectinase, whereas for animal samples, proteinase K has been most often selected, although also mixtures of pancreatin/lipase[224] and amylase[222] have been used. In this regard, there is not a general agreement about the best digestion approach. For example, Loeschner *et al.*[206] reported that both TMAH and proteinase K provided similar size distributions for gold nanoparticles in animal tissues, although mass recoveries with proteinase K were not quantitative. In contrast, it was shown that enzymatic treatment with proteinase K was more suitable for silver nanoparticles in human placental tissue, as TMAH treatment appeared to change the nanoparticles, most likely by silver ion precipitation and/or nanoparticle aggregation.[280]

Once nanoparticles have been extracted from a solid sample, it is usual to separate the liquid phase containing the nanoparticles from the solid residue to remove large particles that may clog the nebulisers. This is also the case in release and fate studies involving solid materials as well as in the analysis of waters. Both filtration and centrifugation have been used for this purpose, although several authors have reported significant losses of nanoparticles in membrane filters.[126,159,163,245] Thus, filtration should be discouraged unless quantitative recoveries have been proved, therefore settling or centrifugation should be used on a routine basis if removal of large particles is needed. Other clean-up procedures involved the defatting of cosmetics by using hexane.[79,82,84]

The presence of dissolved species of the measured element has a negative effect on the size LODs, hence methods including their removal by ion exchange[55,252] or chelating resins[143] prior to SP-ICP-MS measurements have been reported.

Nanoparticle concentration is not a serious limiting factor for SP-ICP-MS in most scenarios due to its low limits of detection down to 100 particles per millilitre. When lower LODs are required, cloud point extraction has proved to be a valid approach for the isolation and concentration of nanoparticles, while preserving their core size and morphology.[104,132,140,241,256,281] Cloud point extraction involves the addition of a non-ionic surfactant (*e.g.*, Triton X114) at concentrations over the critical micellar concentration, the incorporation of the nanoparticles in the micellar aggregates and the separation of the surfactant phase from the aqueous one by mild heating (*ca.* 40 °C). Besides the addition of a complexing agent allows the selective extraction of the nanoparticles in the presence of the corresponding cations.[282] Finally, a further dilution of the surfactant phase in a mixture of ethanol and water is required before SP-ICP-MS measurements.

As it has been discussed in the previous section, nanoparticle concentration of the measured suspensions should be low enough to be within the linear range, below 10^7–10^8 L^{-1} depending on the instrumental and acquisition conditions,[13] and hence the adequate dilution of the suspensions must be considered in each case.

Separation techniques coupled to SP-ICP-MS

Separation techniques like asymmetrical flow and centrifugal field flow fractionation, capillary electrophoresis, differential mobility analysis, hydrodynamic chromatography, as well as other chromatography modes (size exclusion, reverse phase, ion exchange) have been coupled to ICP-MS. In this situation, the ICP-MS instrument acts as an element specific detector of inorganic nanoparticles that are separated according to their size, density, surface properties or charge.[283] However, the coupling of an ICP-MS working in single particle mode allows to obtain additional information related to the homo/hetero-aggregation/agglomeration of primary inorganic nanoparticles as well as the element content in complex nanoparticles or nanocomposites, in addition to the information obtained directly through the separation itself.

Although methods based on the online coupling of SP-ICP-MS to HDC,[284] AF4,[285] capillary electrophoresis[286] and DMA[287]

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

have been reported since 2012, most of them must be considered as proofs-of-concept because their applications to complex scenarios are still scarce or absent, as in the case of capillary electrophoresis and DMA.

The online coupling of HDC to SP-ICP-MS was first described by Pergantis *et al.*[284] for the simultaneous determination of nanoparticle size, number concentration and metal content, by using pristine Au nanoparticles. Subsequently, the capability of HDC-SP-ICP-MS to identify and characterize nanoparticle homoagglomerates in complex media by determining the mass and the hydrodynamic diameter of the separated particles was also demonstrated.[288]

Roman *et al.*[267] developed an algorithm to deconvolute the SP-ICP-MS signals of dissolved element and nanoparticles separated by HDC, providing information about the concentration of dissolved silver and the distribution of Ag nanoparticles in terms of hydrodynamic diameter, mass-derived diameter, number and mass concentration. The approach was suitable to study quantitatively the dynamics and kinetics of silver nanoparticles in complex biological fluids, including processes such as agglomeration, dissolution and formation of protein coronas. The method was applied to investigate the presence of Ag nanoparticles in the blood of burn patients treated with silver dressings, although only dissolved species were detected.

Under less complex conditions, HDC-SP-ICP-MS has been successfully applied to simultaneously determine both the hydrodynamic radius and the content of Au nanoparticles in liposomes used as carriers of Au nanoparticles.[289] It was possible to distinguish between subpopulations of liposomes with different hydrodynamic diameters and various nanoparticle loads. The application of HDC-SP-ICP-MS to the analysis of river and wastewaters under optimized conditions did not allow to detect silver nanoparticles in the samples, although Cu-containing nanoparticles could be identified.[275]

The feasibility of using AF4 online coupled with SP-ICP-MS to detect and quantify inorganic nanoparticles at environmentally relevant concentrations was firstly investigated by Huynh *et al.*[285] by using Ag and Ag–SiO_2 core shell nanoparticles. Later on, Hetzer *et al.*[100] used AF4-SP-ICP-MS to evaluate the migration behaviour of Ag nanoparticles from food packaging films with varying nanosilver content into three different food simulants (water, 3% acetic acid and 10% ethanol), verifying that both silver nanoparticles and silver nanoparticles/polymer heteroaggregates were released in water.

An alternative to online couplings is the analysis of the fractions collected from the effluents of HDC or AF4 by SP-ICP-MS. This was the approach followed by Proulx *et al.*,[137] who demonstrated the feasibility of using HDC offline coupled to SP-ICP-MS for detecting of 20 nm Ag nanoparticles spiked in a river water sample, as well as by Woo-Chun *et al.*[290] who analysed tap, river and waste waters spiked with 30, 60 and 100 nm silver nanoparticles. However, the nanoparticle concentrations used in both studies, in the range of mg L^{-1}, were well above those expected in the environment. In a simpler scenario, the content of metal nanoparticles in composite particles consisting of Au nanoparticles embedded in polymeric particles was determined by using both asymmetrical flow and centrifugal field-flow fractionation.[66] Nanoplastics were separated according to their hydrodynamic diameter and buoyant mass, respectively, and the collected fractions analysed by SP-ICP-MS, confirming the presence of between 1 and more than 8 Au nanoparticles per plastic particle. Under more complex conditions, the SP-ICP-MS analysis of fractions collected from AF4 separations allowed to obtain complementary information about Ag nanoparticles in chicken meat digestates[291] and Al_2O_3 and TiO_2 nanoparticles in toothpaste.[83]

Techniques complementing SP-ICP-MS: analytical platforms

As it has been highlighted through the previous sections, SP-ICP-MS has opened the way for analysing a variety of samples in different scenarios, allowing the detection of nanoparticles, the determination of their concentrations and their characterization to a certain level. However, SP-ICP-MS shows intrinsic limitations, mainly with respect to morphological characterization (size, shape, aggregation/agglomeration) and composition, therefore SP-ICP-MS is usually complemented by using additional techniques (see column "Complementary techniques" in Tables 2–8), leading to advanced analytical platforms which are required for solving complex analytical problems. In the end, the size information provided by SP-ICP-MS has to be estimated from the content of the element directly measured in the particles together with their shape and composition, which must be determined by other complementary techniques; otherwise, these morphological parameters must be assumed and only an equivalent size could be reported. The first purpose of these complementary techniques is to provide additional information on nanoparticle size and shape, to supplement or validate the SP-ICP-MS information. In this way, dynamic light scattering, nanoparticle tracking analysis, and particularly electron microscopy are the most common techniques.

Due to its high spatial resolution, below 1 nm, TEM is one of the most powerful techniques to visualize nanoparticles, and then to obtain information not only about their size, but also shape and aggregation state. This technique is essential in the characterization of pristine nanoparticles (scenario 0), to verify the success of the synthesis of new nanoparticles and to confirm their properties. When more complex analytical scenarios are considered, SEM often substitutes TEM. Current SEM instruments, working with field-emission electron sources (FESEM), offer improved spatial resolutions, reaching competitive ranges for the determination of nanoparticle size and shape in complex samples with easier sample preparation than TEM. Moreover, FESEM provides images of larger sample areas, obtaining more representative size distributions. In any case, electron microscopy plays a significant role to evaluate shapes and possible aggregations of nanoparticles in scenarios 1 and 2, and even in scenario 3 if concentrations of nanoparticles are high enough.

On the other hand, unlike light scattering techniques, electron microscopy enables the determination of the chemical composition of the nanoparticles. Most SEM and TEM instruments include several detectors and are usually coupled to EDS,

obtaining elemental composition of the nanoparticles for their identification, allowing the verification of their nature, but also studying their reactivity, stability and transformations. Although EDS is frequently coupled to TEM or SEM in any analytical scenario, other techniques like electron diffraction and electron energy-loss spectroscopy have also been considered to obtain structural information. The use of transmission electron microscopes working in scanning mode (STEM),[83,90,100,126,148,193,259,260,262] with high-angle annular dark-field detection,[46,134,218] allows to obtain Z-contrast images that can also add information about the chemical composition of the nanoparticles.

Even though XAS techniques do not provide information on nanoparticle morphology, they have also been considered in some works[166,182,185,187,226] because of the interest for improving the information about the composition of the nanoparticles in complex samples. Whereas XANES has been used to obtain information on the geometry and oxidation state of the elements,[106,267] EXAFS has done it on element coordination.[226] However, these techniques have been applied occasionally because of their limitations in sensitivity, data interpretation and availability of synchrotron radiation facilities. XRD is also a technique to be considered to obtain structural information of nanoparticles, although limited to pristine nanoparticles (scenario 0) or scenarios in which nanoparticle concentration is not a limitation (scenarios 1 and 2). Finally, the determination of the total element content in the samples under study is included in most works, to evaluate mass balances and recoveries, by using atomic spectrometry techniques (ICP-MS, ICP-OES, AAS) after a suitable digestion step.

SP-ICP-MS based immunoassay and hybridization methods

ICP-MS-based immunoassay methods for determination of biomolecules has gained increasing interest in recent years.[292] Immunoassays are based on the use of an antibody (or antigen) as a biorecognition agent of the analyte of interest, which acts as antigen (or antibody), respectively. Immunoassays are very widely used in clinical diagnostics, environmental and food safety, covering a range of analytes from small molecules to macromolecules. The high selectivity and affinity of an antibody against its antigen allows their specific binding in the presence of complex matrices (*e.g.*, whole blood, serum, urine, foods). Most immunoassays require the labelling of the antibody (or the antigen) with easily detectable markers (*e.g.*, radioisotopes, enzymes, small molecule light absorbers, fluorophores, nanoparticles). ICP-MS immunoassays are based on the use of elemental tags of metal ions, nanoparticles or metal containing polymers. Although element-tagged immunoassays were firstly proposed in the 1970s,[293] it was not until the advent of ICP-MS that this methodology started to be relevant, largely due to its higher sensitivity in comparison with other atomic spectrometry techniques and its multiplexing capability.[294,295]

The use of metal nanoparticles as labels provides significant advantages, owing to their stability, biocompatibility, and easy conjugation to antibodies/antigens without modifying their binding properties. Moreover, when used in combination with an ICP-MS operated in single particle detection mode a further improvement in sensitivity is achieved. Whereas ICP-MS immunoassays are based on the conventional quantification of the tagging element, reaching detection limits in the range of 50–5000 pg mL^{-1}, these detection limits can be decreased to 1–15 pg mL^{-1} when SP-ICP-MS is used.[292] The improvement lies in the fact that the biomolecule concentration is related to the number concentration of nanoparticles determined by SP-ICP-MS and not to the total content of element measured by ICP-MS.

The first immunoassay based on SP-ICP-MS was reported in 2009. α-Fetoprotein was determined by a competitive immunoassay, using 45 nm Au nanoparticles as labels. A detection limit of 16 pg mL^{-1} was achieved, lower than using other immunoassay strategies.[296] Rabbit-anti-human immunoglobulin G was determined by a sandwich type immunoassay using 45 nm Au nanoparticles with detection limits of 100 pg mL^{-1}.[297] A self-validated homogeneous immunoassay was also proposed for the carcinoembryonic antigen quantification by monitoring both frequency and intensity of the gold nanoparticles used as labels. The method provided accurate results in human serum samples with detection limits in the pM level.[298] ZnSe quantum dots were used for tagging antibodies in a sandwich-type magnetic immunoassay for determination of carcinoembryonic antigen in human serum with a detection limit of 6 pg mL^{-1} by monitoring ^{64}Zn.[299] The determination of cytokeratin fragment antigen 21-1, carbohydrate antigen, and carcinoembryonic antigen was carried out by a simultaneous sandwich-type immunoassay using antibody-immobilized magnetic beads and Au, Ag and ZnSe nanoparticle labels, respectively.[300] The method was successfully applied to detect the three biomarkers in human lung cancer serum samples.

Besides immunoassay, SP-ICP-MS has also been applied in DNA hybridization and RNA methods.[301–304] A homogeneous DNA assay based on a target-induced hybridization chain reaction to achieve controlled spherical nucleic acid assembly has been reported. The strategy relies on the mediation of the hybridization chain reaction in the assembly of a nanogold core with oligonucleotide shell to generate controllable large Au nanoparticle aggregates and significant ^{197}Au counts as compared with the background of a simple dispersed Au nanoparticle. This homogeneous assay could determine DNA within the range of 5 fM to 10 pM.[302]

A rRNA detection platform was achieved by combining a sandwich type hybridization reaction with a single-molecule magnetic capture and SP-ICP-MS for the absolute and relative quantification of *E. coli* rRNA. This method was applied to the direct quantification of rRNA from dangerous human pathogens in milk samples with a detection limit of 10 fM.[304]

Table 9 summarises the SP-ICP-MS based immunoassay and hybridization methods developed up to date. Au nanoparticles have been more frequently used, although methods based on Ag and Pt nanoparticles have also been reported, as well as ZnS quantum dots. Quadrupole instruments have been used in all

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

Table 9 SP-ICP-MS-based immunoassay and hybridization methods for the quantification of biomolecules

Analyte	Sample	Assay type	Nanoparticle label	Dwell time	LOD	Ref.
α-Fetoprotein	Human serum	Competitive immunoassay	Au (45 nm)	10 ms	16 pg mL^{-1}	296
Rabbit-anti-human IgG	Human serum	Sandwich immunoassay	Au (45 nm)	10 ms	100 pg mL^{-1}	297
Carcinoembryonic antigen	Human serum	Homogeneous immunoassay	Au (30 nm)	50 μs	210 pg mL^{-1} (1.2 pM)	298
	Human serum	Sandwich magnetic immunoassay	ZnSe (2.6 nm)	100 μs	6 pg mL^{-1}	299
Cytokeratin fragment antigen	Human serum	Sandwich magnetic immunoassay	Au (29 nm)	100 μs	20 pg mL^{-1}	300
Carcinoembryonic antigen			ZnSe (2.6 nm)		6 pg mL^{-1}	
Carbohydrate antigen			Ag (14 nm)		0.25 mU mL^{-1}	
DNA	—	Homogeneous DNA hybridization	Au (28 nm)	0.5 ms	1 pM	301
	Human serum	Homogeneous DNA hybridization chain reaction	Au (30 nm)	5 ms	3 fM	302
Human immunodeficiency virus	Human serum	Multiplexed heterogeneous sandwich DNA hybridization	Au (25 nm)	0.5 ms	<1 pM	303
Hepatitis B virus			Ag (25 nm)			
Hepatitis C virus			Pt (20 nm)			
E. coli RNA	Milk	Sandwich hybridization with magnetic particles	Au (30 nm)	—	10 fM	304

works, with dwell times in the range of milliseconds, but also at microseconds. In some cases, immunoassay and hybridization schemes use antibody-immobilised magnetic particles, that greatly improve the efficiency of the washing and separating steps of the captured antigens under a magnetic field.[298,302]

Conclusions

The features of SP-ICP-MS for the detection, quantification and characterization of nanoparticles have led to the development of this technique and its increasing application in many different fields under analytical scenarios of varying complexity, which have been comprehensively covered in this review. However, its implementation in commercial instruments by most ICP-MS manufacturers can be considered the key to its success. Despite the rapid evolution of SP-ICP-MS in the last ten years, in 2020 the number of publications related to fundamental aspects of the technique and the development of methods was still 1 out of 3 with respect to the number of publications dedicated to specific analytical applications. For this reason, by following Horlick's approach,[12] although SP-ICP-MS is on the way of becoming a mature technique, its characterization stage cannot be considered finished yet. Moreover, its progress towards maturity is currently hampered by other issues like the availability of validated methods and the traceability of their results. Both issues are conditioned by the availability of reference materials, which are currently restricted to pristine nanoparticles of specific compositions, whereas matrix reference materials are still not available due long-term stability problems.[19] This situation entails using nanoparticle suspensions supplied from a reduced number of manufacturers as standards for calibrations and quality control. Furthermore, since standards for only a small number of nanoparticle compositions are available, indirect calibrations based on the determination of the nebulisation efficiency and the use of dissolved standards are applied routinely to obtain quantitative information. This approach requires that not only the element in dissolved and particulate forms behave in the ICP in the same way, but also the nebulisation for the standards and the samples. These two factors cannot be disregarded to obtain unbiased results, which is particularly challenging when dealing with complex matrices.

The analytical scenarios in which SP-ICP-MS is more frequently applied are those related to studies about fate and (eco)toxicity under controlled laboratory conditions involving the use of pristine nanoparticles (type 2 scenarios). The main reason is that both size and concentration of the nanoparticles added can be selected according to the experiment design and the detection capability, although there is an increasing trend to perform these studies at realistic concentrations. In any case, the most complex challenge for SP-ICP-MS is the analysis of samples originally containing nanoparticles, namely foods and environmental and biological samples (scenarios type 3), because of the complexity of the matrices and the low concentrations expected, but also nano-enhanced products (scenario 1). The main drawback with these samples is that the nature of the particles is unknown in many cases. Consequently, only masses of element per particle or equivalent sizes (assuming an expected composition and shape) can be reported, unless complementary techniques are used to obtain such information. An additional difficulty with this samples arises when part of the particle size distribution is missed due to the attainable size LODs. In such cases, nanoparticle concentrations will be underestimated and mean sizes overestimated. Hence, results should include these limitations, only reporting the occurrence of particles in the sample over a certain (equivalent) size and number concentration, considering SP-ICP-MS as a screening technique instead of a fully quantitative one. On the other hand, particles are not the only targets of SP-ICP-MS, its capability for the simultaneous quantification of dissolved elements has also

been exploited in many of the applications involving nanoparticles prone to oxidation or dissolution, like those made of Ag, CuO or ZnO.

Although SP-ICP-MS is mostly involved in methods for the analysis of samples containing nanoparticles, the technique is also suitable for being used in methods where nanoparticles are not analytes but analytical tools. This is the case of immunoassay and hybridization methods for the analysis of biomolecules, where nanoparticles are used as elemental labels conjugated to antibodies and oligonucleotides. By selecting the adequate nanoparticles, SP-ICP-MS can provide better limits of detection for these bioassays due to its high sensitivity in terms of number concentration. The applications of SP-ICP-MS in immuno- and hybridization assays are still scarce but show very promising results.

List of acronyms

AAS	Atomic absorption spectrometry
AES	Auger electron spectroscopy
AFM	Atomic force microscopy
AF4	Asymmetric flow field flow fractionation
ATR-FTIR	Attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy
AUC	Analytical ultracentrifugation
BSA	Bovine serum albumin
CE	Capillary electrophoresis
CFFF	Centrifugal field flow fractionation
CLS	Centrifugal liquid sedimentation
CNT	Carbon nanotube
CPE	Cloud point extraction
DE	Dissolved element
DF	Double focussing
DGT	Diffusive gradient in thin film
DLS	Dynamic light scattering
DMA	Differential mobility analysis
EDM-HSI	Enhanced darkfield microscopy-hyperspectral imaging
EDS	Energy dispersive X-ray spectroscopy
ETAAS	Electrothermal atomic absorption spectrometry
EXAFS	Extended X-ray absorption fine structure
FAAS	Flame atomic absorption spectrometry
FESEM	Field-emission scanning electron microscopy
FIBSEM	Focused ion beam scanning electron microscopy
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
HAADF	High-angle annular dark-field
HDC	Hydrodynamic chromatography
HIM	Helium ion microscopy
HPLC	High performance liquid chromatography
HRTEM	High resolution transmission electron microscopy
IC	Ion chromatography
ICP-MS	Inductively coupled plasma-mass spectrometry
ICP-OES	Inductively coupled plasma-optical emission spectrometry
ISE	Ion selective electrode potentiometry
LA	Laser ablation
LDA	Laser diffraction analysis
LOD	Limit of detection
MALS	Multiangle light scattering
NOM	Natural organic matter
NP	Nanoparticle
NTA	Nanoparticle tracking analysis
Q	Quadrupole
RI	Refractive index
SAM	Scanning Auger mapping
SDS	Sodium dodecylsulphate
SEC	Size exclusion chromatography
SEM	Scanning electron microscopy
SIMS	Secondary-ion mass spectrometry
SMPS	Scanning mobility particle sizer
SP-ICP-MS	Single particle-inductively coupled plasma-mass spectrometry
STEM	Scanning transmission electron microscopy
TEM	Transmission electron microscopy
TMAH	Tetramethyl ammonium hydroxide
TOF	Time of flight
TXRF	Total reflection X-ray fluorescence
UV-Vis	Ultraviolet visible absorption
XANES	X-ray absorption near edge structure
XAS	X-ray absorption spectroscopy
XPS	X-ray photoelectron spectroscopy
XRD	X-ray diffraction

Author contributions

Eduardo Bolea: writing – review & editing; Maria S. Jimenez: writing – original draft; Josefina Perez-Arantegui: writing – original draft; Juan C. Vidal: investigation, writing – original draft, Mariam Bakir: investigation, writing – original draft; Khaoula Ben-Jeddou: investigation, writing – original draft; Ana C. Gimenez-Ingalaturre: investigation, writing – original draft; David Ojeda: investigation, writing – original draft, Celia Trujillo: investigation, writing – original draft; Francisco Laborda: conceptualization, supervision, visualization, writing – review & editing.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities and the European Regional Development Fund, project RTI2018-096111-B-I00 (MICINN/FEDER). K. B.-J. thanks funding from the EU Horizon 2020 programme under the Marie Sklowdowska-Curie grant agreement no. 801586. A. C. G. thanks the Government of Aragón (DGA) for a predoctoral contract. C. T. thanks the University of Zaragoza for a predoctoral contract.

References

1 M. D. Montaño, J. W. Olesik, A. G. Barber, K. Challis and J. F. Ranville, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 5053–5074.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

2 C. Degueldre and P.-Y. Favarger, *Colloids Surf., A*, 2003, **217**, 137–142.
3 C. Degueldre and P.-Y. Favarger, *Talanta*, 2004, **62**, 1051–1054.
4 C. Degueldre, P.-Y. Favarger and C. Bitea, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **518**, 137–142.
5 C. Degueldre, P.-Y. Favarger, R. Rossé and S. Wold, *Talanta*, 2006, **68**, 623–628.
6 C. Degueldre, P. Favarger and S. Wold, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **555**, 263–268.
7 F. Laborda, J. Jiménez-Lamana, E. Bolea and J. R. Castillo, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2011, **26**, 1362–1371.
8 H. E. Pace, N. J. Rogers, C. Jarolimek, V. A. Coleman, C. P. Higgins and J. F. Ranville, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 9361–9369.
9 O. Borovinskaya, B. Hattendorf, M. Tanner, S. Gschwind and D. Günther, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2013, **28**, 226–233.
10 A. Hineman and C. Stephan, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2014, **29**, 1252–1257.
11 P. Shaw and A. Donard, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2016, **31**, 1234–1242.
12 G. Horlick, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1994, **9**, 593–597.
13 I. Abad-Álvaro, E. Peña-Vázquez, E. Bolea, P. Bermejo-Barrera, J. R. Castillo and F. Laborda, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 5089–5097.
14 V. Geertsen, E. Barruet, F. Gobeaux, J.-L. Lacour and O. Taché, *Anal. Chem.*, 2018, **90**, 9742–9750.
15 F. Laborda, E. Bolea and J. Jiménez-Lamana, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 2270–2278.
16 F. Laborda, E. Bolea and J. Jiménez-Lamana, *Trends Environ. Anal. Chem.*, 2016, **9**, 15–23.
17 F. Laborda, A. C. Gimenez-Ingalaturre, E. Bolea and J. R. Castillo, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2020, **169**, 105883.
18 D. Mozhayeva and C. Engelhard, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2020, **35**, 1740–1783.
19 F. Laborda, A. C. Gimenez-Ingalaturre and E. Bolea, in *Analysis and Characterisation of Metal-Based Nanomaterials*, ed. R. Milacic, J. Scancar, J. Vidmar and H. Goenaga-Infante, Elsevier, 1st edn, 2021.
20 ISO/TC 229, *ISO/TS 80004-2:2015 Nanotechnologies — Vocabulary — Part 2: Nano-objects*, 2015.
21 F. Laborda, C. Trujillo and R. Lobinski, *Talanta*, 2021, **221**, 121486.
22 A. Kéri, A. Sápi, D. Ungor, D. Sebők, E. Csapó, Z. Kónya and G. Galbács, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2020, **35**, 1139–1147.
23 N. Joo and H. B. Lim, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2019, **40**, 1087–1092.
24 H.-A. Kim, B.-T. Lee, S.-Y. Na, K.-W. Kim, J. F. Ranville, S.-O. Kim, E. Jo and I.-C. Eom, *Chemosphere*, 2017, **171**, 468–475.
25 N. D. Donahue, E. R. Francek, E. Kiyotake, E. E. Thomas, W. Yang, L. Wang, M. S. Detamore and S. Wilhelm, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2020, **412**, 5205–5216.
26 S. V. Jenkins, H. Qu, T. Mudalige, T. M. Ingle, R. Wang, F. Wang, P. C. Howard, J. Chen and Y. Zhang, *Biomaterials*, 2015, **51**, 226–237.
27 K. Flores, R. S. Turley, C. Valdes, Y. Ye, J. Cantu, J. A. Hernandez-Viezcas, J. G. Parsons and J. L. Gardea-Torresdey, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2019, 1–26.
28 L. C. Jones, E. Soffey and M. Kelinske, *Spectroscopy*, 2019, **34**, 10–20.
29 C. Stephan and R. Thomas, *Spectroscopy*, 2017, **32**, 12–25.
30 B. Meermann and V. Nischwitz, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2018, **33**, 1432–1468.
31 R. M. Galazzi, K. Chacón-Madrid, D. C. Freitas, L. F. Costa and M. A. Z. Arruda, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2020, **34**, e8726.
32 M. D. Montaño, F. von der Kammer, C. W. Cuss and J. F. Ranville, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2019, **34**, 1768–1772.
33 Z. Gajdosechova and Z. Mester, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2019, 4277–4292.
34 F. Abdolahpur Monikh, L. Chupani, M. G. Vijver, M. Vancová and W. J. G. M. Peijnenburg, *Sci. Total Environ.*, 2019, **660**, 1283–1293.
35 G. E. Schaumann, A. Philippe, M. Bundschuh, G. Metreveli, S. Klitzke, D. Rakcheev, A. Grün, S. K. Kumahor, M. Kühn, T. Baumann, F. Lang, W. Manz, R. Schulz and H. Vogel, *Sci. Total Environ.*, 2015, **535**, 3–19.
36 M. Sargent, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2020, **35**, 2479–2486.
37 T. P. J. Linsinger, Q. Chaudhry, V. Dehalu, P. Delahaut, A. Dudkiewicz, R. Grombe, F. von der Kammer, E. H. Larsen, S. Legros, K. Loeschner, R. Peters, R. Ramsch, G. Roebben, K. Tiede and S. Weigel, *Food Chem.*, 2013, **138**, 1959–1966.
38 R. J. B. Peters, G. van Bemmel, N. B. L. Milani, G. C. T. den Hertog, A. K. Undas, M. van der Lee and H. Bouwmeester, *Sci. Total Environ.*, 2018, **621**, 210–218.
39 M. Witzler, F. Küllmer, A. Hirtz and K. Günther, *J. Agric. Food Chem.*, 2016, **64**, 4165–4170.
40 R. J. B. Peters, Z. H. Rivera, G. van Bemmel, H. J. P. Marvin, S. Weigel and H. Bouwmeester, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, **406**, 3875–3885.
41 P. Ruud JB, U. Anna K, M. Joost, B. Greet van, M. Sandra, B. Hans, N. Peter, S. Wobbe and L. Martijn K van der, *Curr. Trends Anal. Bioanal. Chem.*, 2018, **2**, 74–84.
42 M. Witzler, F. Küllmer and K. Günther, *Anal. Lett.*, 2018, **51**, 587–599.
43 N. Waegeneers, S. De Vos, E. Verleysen, A. Ruttens and J. Mast, *Materials*, 2019, **12**, 2677.
44 F. Laborda, A. C. Gimenez-Ingalaturre, E. Bolea and J. R. Castillo, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2019, **159**, 105654.
45 O. Geiss, I. Bianchi, C. Senaldi, G. Bucher, E. Verleysen, N. Waegeneers, F. Brassinne, J. Mast, K. Loeschner, J. Vidmar, F. Aureli, F. Cubadda, A. Raggi, F. Iacoponi, R. Peters, A. Undas, A. Müller, A. K. Meinhardt, E. Walz, V. Gräf and J. Barrero-Moreno, *Food Control*, 2021, **120**, 107550.
46 E. Verleysen, N. Waegeneers, F. Brassinne, S. De Vos, I. O. Jimenez, S. Mathioudaki and J. Mast, *Nanomaterials*, 2020, **10**, 592.
47 A. R. Montoro Bustos, K. P. Purushotham, A. Possolo, N. Farkas, A. E. Vladár, K. E. Murphy and M. R. Winchester, *Anal. Chem.*, 2018, **90**, 14376–14386.

48 R. Peters, Z. Herrera-Rivera, A. Undas, M. van der Lee, H. Marvin, H. Bouwmeester and S. Weigel, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2015, **30**, 1274–1285.
49 S. Weigel, R. Peters, K. Loeschner, R. Grombe and T. P. J. Linsinger, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2017, **409**, 4839–4848.
50 R. Peters, Z. Herrera-Rivera, A. Undas, M. Van Der Lee, H. Marvin, H. Bouwmeester and S. Weigel, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2015, **30**, 1274–1285.
51 J. W. Olesik and P. J. Gray, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2012, **27**, 1143–1155.
52 T. P. J. Linsinger, R. Peters and S. Weigel, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, **406**, 3835–3843.
53 I. Rujido-Santos, L. Naveiro-Seijo, P. Herbello-Hermelo, M. d. C. Barciela-Alonso, P. Bermejo-Barrera and A. Moreda-Piñeiro, *Talanta*, 2019, **197**, 530–538.
54 N. J. Clark, R. Clough, D. Boyle and R. D. Handy, *Environ. Sci.: Nano*, 2019, **6**, 3388–3400.
55 L. Fréchette-Viens, M. Hadioui and K. J. Wilkinson, *Talanta*, 2019, **200**, 156–162.
56 S. Wu, S. Zhang, Y. Gong, L. Shi and B. Zhou, *J. Hazard. Mater.*, 2020, **382**, 121045.
57 J. Nelson, A. Saunders, L. Poirier, E. Rogel, C. Ovalles, T. Rea and F. Lopez-Linares, *J. Nanopart. Res.*, 2020, **22**, 304.
58 J. Noireaux, R. Grall, M. Hullo, S. Chevillard, C. Oster, E. Brun, C. Sicard-Roselli, K. Loeschner and P. Fisicaro, *Separations*, 2019, **6**, 3.
59 F. Laborda and E. Bolea, in *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, Elsevier, 2018, pp. 1–9.
60 J. D. Martin, L. Telgmann and C. D. Metcalfe, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2017, **98**, 589–594.
61 H. Zhang, Y. Huang, J. Gu, A. Keller, Y. Qin, Y. Bian, K. Tang, X. Qu, R. Ji and L. Zhao, *New J. Chem.*, 2019, **43**, 3946–3955.
62 R. C. Merrifield, C. Stephan and J. R. Lead, *Talanta*, 2017, **162**, 130–134.
63 A. Kéri, I. Kálomista, D. Ungor, Á. Bélteki, E. Csapó, I. Dékány, T. Prohaska and G. Galbács, *Talanta*, 2018, **179**, 193–199.
64 J.-B. Chao, J.-R. Wang and J.-Q. Zhang, *Chin. J. Anal. Chem.*, 2020, **48**, 946–954.
65 I. Kálomista, A. Kéri, D. Ungor, E. Csapó, I. Dékány, T. Prohaska and G. Galbács, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2017, **32**, 2455–2462.
66 A. Barber, S. Kly, M. G. Moffitt, L. Rand and J. F. Ranville, *Environ. Sci.: Nano*, 2020, **7**, 514–524.
67 S. G. F. Eggermont, A. Rua-Ibarz, K. Tirez, X. Dominguez-Benetton and J. Fransaer, *RSC Adv.*, 2019, **9**, 29902–29908.
68 R. P. Lamsal, M. S. E. Houache, A. Williams, E. Baranova, G. Jerkiewicz and D. Beauchemin, *Anal. Chim. Acta*, 2020, **1120**, 67–74.
69 K. Walbrück, F. Kuellmer, S. Witzleben and K. Guenther, *J. Nanomater.*, 2019, **2019**, 1–7.
70 S. Meyer, R. Gonzalez de Vega, X. Xu, Z. Du, P. A. Doble and D. Clases, *Anal. Chem.*, 2020, **92**, 15007–15016.
71 S. Salou, C. Cirtiu, D. Larivière and N. Fleury, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2020, **412**, 1469–1481.
72 A. Sápi, A. Kéri, I. Kálomista, D. G. Dobó, A. Szamosvölgyi, K. L. Juhász, A. Kukovecz, Z. Kónya and G. Galbács, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2017, **32**, 996–1003.
73 R. B. Reed, D. G. Goodwin, K. L. Marsh, S. S. Capracotta, C. P. Higgins, D. H. Fairbrother and J. F. Ranville, *Environ. Sci.: Processes Impacts*, 2013, **15**, 204–213.
74 J. Wang, R. S. Lankone, R. B. Reed, D. H. Fairbrother and J. F. Ranville, *NanoImpact*, 2016, **1**, 65–72.
75 P. M. P. Danty, A. Mazel, B. Cormary, M. L. De Marco, J. Allouche, D. Flahaut, J. Jimenez-Lamana, S. Lacomme, M. H. Delville and G. L. Drisko, *Inorg. Chem.*, 2020, **59**, 6232–6241.
76 E. Lahtinen, E. Kukkonen, V. Kinnunen, M. Lahtinen, K. Kinnunen, S. Suvanto, A. Vaïsänen and M. Haukka, *ACS Omega*, 2019, **4**, 16891–16898.
77 M. Hadioui, G. Knapp, A. Azimzada, I. Jreije, L. Frechette-Viens and K. J. Wilkinson, *Anal. Chem.*, 2019, **91**, 13275–13284.
78 Y. Dan, H. Shi, C. Stephan and X. Liang, *Microchem. J.*, 2015, **122**, 119–126.
79 I. de la Calle, M. Menta, M. Klein, B. Maxit and F. Séby, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2018, **147**, 28–42.
80 P. J. Lu, S. W. Fang, W. L. Cheng, S. C. Huang, M. C. Huang and H. F. Cheng, *J. Food Drug Anal.*, 2018, **26**, 1192–1200.
81 B. Bocca, S. Caimi, O. Senofonte, A. Alimonti and F. Petrucci, *Sci. Total Environ.*, 2018, **630**, 922–930.
82 C. Adelantado, Á. Ríos and M. Zougagh, *Talanta*, 2020, **219**, 121385.
83 M. Correia, T. Uusimäki, A. Philippe and K. Loeschner, *Separations*, 2018, **5**, 1–25.
84 I. de la Calle, M. Menta, M. Klein and F. Séby, *Talanta*, 2017, **171**, 291–306.
85 F. Laborda, C. Trujillo and R. Lobinski, *Talanta*, 2021, **221**, 121486.
86 Y. Yang, L. Luo, H. P. Li, Q. Wang, Z. G. Yang, Z. P. Qu and R. Ding, *Talanta*, 2018, **182**, 156–163.
87 J. Therkorn, L. Calderón, B. Cartledge, N. Thomas, B. Majestic and G. Mainelis, *Environ. Sci.: Nano*, 2018, **5**, 544–555.
88 S. Losert, A. Hess, G. Ilari, N. von Goetz and K. Hungerbuehler, *J. Nanopart. Res.*, 2015, **17**, 293.
89 J. P. F. G. Helsper, R. J. B. Peters, M. E. M. van Bemmel, Z. E. H. Rivera, S. Wagner, F. von der Kammer, P. C. Tromp, T. Hofmann and S. Weigel, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 6679–6691.
90 A. Hegetschweiler, O. Borovinskaya, T. Staudt and T. Kraus, *Anal. Chem.*, 2019, **91**, 943–950.
91 J. Nelson, M. Yamanaka, F. Lopez-Linares, L. Poirier and E. Rogel, *Energy Fuels*, 2017, **31**, 11971–11976.
92 B. Bocca, E. Sabbioni, I. Micetic, A. Alimonti and F. Petrucci, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2017, **32**, 616–628.
93 B. Battistini, F. Petrucci, I. De Angelis, C. M. Failla and B. Bocca, *Chemosphere*, 2020, **245**, 125667.
94 M. Van Wassenhoven, M. Goyens, E. Capieaux, P. Devos and P. Dorfman, *Homeopathy*, 2019, **108**, 073–074.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

95 Y. Echegoyen and C. Nerín, *Food Chem. Toxicol.*, 2013, **62**, 16–22.
96 A. Mackevica, M. E. Olsson and S. F. Hansen, *J. Nanopart. Res.*, 2016, **18**, 5.
97 K. Ramos, M. M. Gómez-Gómez, C. Cámara and L. Ramos, *Talanta*, 2016, **151**, 83–90.
98 R. Ding, P. Yang, Y. Yang, Z. Yang, L. Luo, H. Li and Q. Wang, *Food Addit. Contam., Part A*, 2018, **35**, 2052–2061.
99 Y. Echegoyen, S. Rodríguez and C. Nerín, *Food Addit. Contam., Part A*, 2016, **33**, 530–539.
100 B. Hetzer, A. Burcza, V. Gräf, E. Walz and R. Greiner, *Food Control*, 2017, **80**, 113–124.
101 S. Addo Ntim, S. Norris, K. Scott, T. A. Thomas and G. O. Noonan, *Food Control*, 2018, **87**, 31–39.
102 A. Mackevica, M. E. Olsson and S. F. Hansen, *J. Hazard. Mater.*, 2017, **322**, 270–275.
103 A. Mackevica, M. E. Olsson, P. D. Mines, L. R. Heggelund and S. F. Hansen, *NanoImpact*, 2018, **11**, 109–118.
104 L. Torrent, M. Iglesias, M. Hidalgo and E. Marguí, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2018, **33**, 383–394.
105 A. Mackevica, M. E. Olsson and S. F. Hansen, *J. Nanopart. Res.*, 2018, **20**, 6.
106 D. M. Mitrano, E. Lombi, Y. A. R. Dasilva and B. Nowack, *Environ. Sci. Technol.*, 2016, **50**, 5790–5799.
107 J. Farkas, H. Peter, P. Christian, J. A. Gallego Urrea, M. Hassellöv, J. Tuoriniemi, S. Gustafsson, E. Olsson, K. Hylland and K. V. Thomas, *Environ. Int.*, 2011, **37**, 1057–1062.
108 R. S. Lankone, J. Wang, J. F. Ranville and D. H. Fairbrother, *Environ. Sci.: Nano*, 2017, **4**, 967–982.
109 N. Neubauer, L. Scifo, J. Navratilova, A. Gondikas, A. Mackevica, D. Borschneck, P. Chaurand, V. Vidal, J. Rose, F. von der Kammer and W. Wohlleben, *Environ. Sci. Technol.*, 2017, **51**, 11669–11680.
110 B. Gomez-Gomez, M. T. Perez-Corona and Y. Madrid, *Anal. Chim. Acta*, 2020, **1100**, 12–21.
111 A. S. Adeleye, E. A. Oranu, M. Tao and A. A. Keller, *Water Res.*, 2016, **102**, 374–382.
112 A. Azimzada, J. M. Farner, M. Hadioui, C. Liu-Kang, I. Jreije, N. Tufenkji and K. J. Wilkinson, *Environ. Sci.: Nano*, 2020, **7**, 139–148.
113 M. T. Islam, A. Dominguez, R. S. Turley, H. Kim, K. A. Sultana, M. A. I. Shuvo, B. Alvarado-Tenorio, M. O. Montes, Y. Lin, J. Gardea-Torresdey and J. C. Noveron, *Sci. Total Environ.*, 2020, **704**, 135406.
114 D. P. Martin, N. L. Melby, S. M. Jordan, A. J. Bednar, A. J. Kennedy, M. E. Negrete, M. A. Chappell and A. R. Poda, *Chemosphere*, 2016, **162**, 222–227.
115 Y.-S. Zimmermann, A. Schäffer, P. F.-X. Corvini and M. Lenz, *Environ. Sci. Technol.*, 2013, **47**, 13151–13159.
116 R. S. Lankone, K. Challis, L. Pourzahedi, D. P. Durkin, Y. Bi, Y. Wang, M. A. Garland, F. Brown, K. Hristovski, R. L. Tanguay, P. Westerhoff, G. Lowry, L. M. Gilbertson, J. Ranville and D. H. Fairbrother, *Sci. Total Environ.*, 2019, **668**, 234–244.
117 M. C. Sportelli, R. A. Picca, F. Paladini, A. Mangone, L. C. Giannossa, C. Di Franco, A. L. Gallo, A. Valentini, A. Sannino, M. Pollini and N. Cioffi, *Nanomaterials*, 2017, **7**, 203.
118 N. Shin, K. Velmurugan, C. Su, A. K. Bauer and C. S. J. Tsai, *Environ. Sci.: Processes Impacts*, 2019, **21**, 1342–1352.
119 K. Folens, T. Van Acker, E. Bolea-Fernandez, G. Cornelis, F. Vanhaecke, G. Du Laing and S. Rauch, *Sci. Total Environ.*, 2018, **615**, 849–856.
120 Z. Li, M. Hadioui and K. J. Wilkinson, *Environ. Pollut.*, 2019, **247**, 206–215.
121 S. Addo Ntim, T. A. Thomas and G. O. Noonan, *Food Addit. Contam., Part A: Chem., Anal., Control, Exposure Risk Assess.*, 2016, **33**, 905–912.
122 M. Jokar, M. Correia and K. Loeschner, *Food Control*, 2018, **89**, 77–85.
123 X. He, H. Zhang, H. Shi, W. Liu and E. Sahle-Demessie, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2020, **31**, 2180–2190.
124 A. P. Walczak, R. Fokkink, R. Peters, P. Tromp, Z. E. Herrera Rivera, I. M. C. M. Rietjens, P. J. M. Hendriksen and H. Bouwmeester, *Nanotoxicology*, 2012, **7**, 1198–1210.
125 K. Ramos, L. Ramos and M. M. Gómez-Gómez, *Food Chem.*, 2017, **221**, 822–828.
126 D. M. Mitrano, Y. Arroyo Rojas Dasilva and B. Nowack, *Environ. Sci. Technol.*, 2015, **49**, 9665–9673.
127 M. Sikder, J. Wang, B. A. Poulin, M. M. Tfaily and M. Baalousha, *Environ. Sci.: Nano*, 2020, **7**, 3318–3332.
128 R. C. Merrifield, C. Stephan and J. Lead, *Environ. Sci. Technol.*, 2017, **51**, 3206–3213.
129 L. Telgmann, M. T. K. Nguyen, L. Shen, V. Yargeau, H. Hintelmann and C. D. Metcalfe, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 5169–5177.
130 J. Jiménez-Lamana and V. I. Slaveykova, *Sci. Total Environ.*, 2016, **573**, 946–953.
131 D. C. Rearick, L. Telgmann, H. Hintelmann, P. C. Frost and M. A. Xenopoulos, *PLoS One*, 2018, **13**, 1–18.
132 L. M. Furtado, M. E. Hoque, D. M. Mitrano, J. F. Ranville, B. Cheever, P. C. Frost, M. A. Xenopoulos, H. Hintelmann and C. D. Metcalfe, *Environ. Chem.*, 2014, **11**, 419.
133 J. D. Martin, P. C. Frost, H. Hintelmann, K. Newman, M. J. Paterson, L. Hayhurst, M. D. Rennie, M. A. Xenopoulos, V. Yargeau and C. D. Metcalfe, *Environ. Sci. Technol.*, 2018, **52**, 11114–11122.
134 A. Urstoeger, A. Wimmer, R. Kaegi, S. Reiter and M. Schuster, *Environ. Sci. Technol.*, 2020, **54**, 12063–12071.
135 F. Loosli, J. Wang, M. Sikder, K. Afshinnia and M. Baalousha, *Sci. Total Environ.*, 2020, **715**, 136927.
136 N. Londono, A. R. Donovan, H. Shi, M. Geisler and Y. Liang, *Nanotoxicology*, 2017, **11**, 1140–1156.
137 K. Proulx and K. J. Wilkinson, *Environ. Chem.*, 2014, **11**, 392–401.
138 D. M. Mitrano, J. F. Ranville, A. Bednar, K. Kazor, A. S. Hering and C. P. Higgins, *Environ. Sci.: Nano*, 2014, **1**, 248–259.
139 D. C. António, C. Cascio, Ž. Jakšić, D. Jurašin, D. M. Lyons, A. J. A. Nogueira, F. Rossi and L. Calzolai, *Mar. Environ. Res.*, 2015, **111**, 162–169.

140 A. Wimmer, A. Urstoeger, N. C. Funck, F. P. Adler, L. Lenz, M. Doeblinger and M. Schuster, *Water Res.*, 2020, **171**, 115399.

141 C. Toncelli, K. Mylona, I. Kalantzi, A. Tsiola, P. Pitta, M. Tsapakis and S. A. Pergantis, *Sci. Total Environ.*, 2017, **601–602**, 15–21.

142 C. Toncelli, K. Mylona, M. Tsapakis and S. A. Pergantis, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2016, **31**, 1430–1439.

143 P. Cervantes-Avilés, Y. Huang and A. A. Keller, *Water Res.*, 2019, **166**, 115072.

144 T. Lange, P. Schneider, S. Schymura and K. Franke, *Water*, 2020, **12**, 2509.

145 J. Vidmar, P. Oprčkal, R. Milačič, A. Mladenovič and J. Ščančar, *Sci. Total Environ.*, 2018, **634**, 1259–1268.

146 T. Théoret and K. J. Wilkinson, *Anal. Methods*, 2017, **9**, 3920–3928.

147 M. Azodi, Y. Sultan and S. Ghoshal, *Environ. Sci. Technol.*, 2016, **50**, 13318–13327.

148 A. Georgantzopoulou, P. Almeida Carvalho, C. Vogelsang, M. Tilahun, K. Ndungu, A. M. Booth, K. V. Thomas and A. Macken, *Environ. Sci. Technol.*, 2018, **52**, 9431–9441.

149 C. Long, Z. Yang, Y. Yang, H. Li and Q. Wang, *J. Cent. South Univ.*, 2016, **23**, 1611–1617.

150 Y. Jie Chang, Y. Hsin Shih, C. H. Su and H. C. Ho, *J. Hazard. Mater.*, 2017, **322**, 95–104.

151 J. Kidd, Y. Bi, D. Hanigan, P. Herckes and P. Westerho, *Nanomaterials*, 2019, **9**, 1–14.

152 J. Tuoriniemi, M. D. Jürgens, M. Hassellöv and G. Cornelis, *Environ. Sci.: Nano*, 2017, **4**, 1189–1197.

153 S. Alizadeh, S. Ghoshal and Y. Comeau, *Sci. Total Environ.*, 2019, **647**, 1199–1210.

154 S. Alizadeh, A. Abdul Rahim, B. Guo, J. Hawari, S. Ghoshal and Y. Comeau, *Environ. Sci. Technol.*, 2019, **53**, 9148–9159.

155 A. R. Donovan, C. D. Adams, Y. Ma, C. Stephan, T. Eichholz and H. Shi, *Chemosphere*, 2018, **195**, 531–541.

156 Y. Yang, X. Bi, P. Westerhoff, K. Hristovski and J. E. McLain, *Environ. Eng. Sci.*, 2014, **31**, 381–392.

157 L. Torrent, E. Marguí, I. Queralt, M. Hidalgo and M. Iglesias, *J. Environ. Sci.*, 2019, **83**, 205–216.

158 A. H. Jesmer, J. R. Velicogna, D. M. Schwertfeger, R. P. Scroggins and J. I. Princz, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2017, **36**, 2756–2765.

159 D. M. Schwertfeger, J. R. Velicogna, A. H. Jesmer, S. Saatcioglu, H. McShane, R. P. Scroggins and J. I. Princz, *Anal. Chem.*, 2017, **89**, 2505–2513.

160 D. Schwertfeger, J. Velicogna, A. Jesmer, H. McShane, R. Scroggins and J. Princz, *Environ. Chem.*, 2017, **14**, 123–133.

161 J. Navratilova, A. Praetorius, A. Gondikas, W. Fabienke, F. von der Kammer and T. Hofmann, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2015, **12**, 15756–15768.

162 H. El Hadri, S. M. Louie and V. A. Hackley, *Environ. Sci.: Nano*, 2018, **5**, 203–214.

163 L. Li, Q. Wang, Y. Yang, L. Luo, R. Ding, Z. G. Yang and H. P. Li, *Anal. Chem.*, 2019, **91**, 9442–9450.

164 L. Degenkolb, G. Metreveli, A. Philippe, A. Brandt, K. Leopold, L. Zehlike, H. J. Vogel, G. E. Schaumann, T. Baumann, M. Kaupenjohann, F. Lang, S. Kumahor and S. Klitzke, *Sci. Total Environ.*, 2018, **645**, 192–204.

165 S. Motellier, D. Locatelli and R. Bera, *Environ. Sci. Technol.*, 2019, **53**, 10714–10722.

166 D. M. Peloquin, E. J. Baumann and T. P. Luxton, *Chemosphere*, 2020, **249**, 126173.

167 K. C. Nwoko, A. Raab, L. Cheyne, D. Dawson, E. Krupp and J. Feldmann, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2019, **1124**, 356–365.

168 J. V. Gómez, A. Tarazona, F. Mateo, M. Jiménez and E. M. Mateo, *Food Control*, 2019, **101**, 58–68.

169 S. S. D. Kumar, N. N. Houreld, E. M. Kroukamp and H. Abrahamse, *J. Photochem. Photobiol., B*, 2018, **178**, 259–269.

170 B. Gomez-Gomez, M. Corte-Rodríguez, M. T. Perez-Corona, J. Bettmer, M. Montes-Bayón and Y. Madrid, *Anal. Chim. Acta*, 2020, **1128**, 116–128.

171 N. Londono, A. R. Donovan, H. Shi, M. Geisler and Y. Liang, *Chemosphere*, 2019, **230**, 567–577.

172 A. Azimzada, N. Tufenkji and K. J. Wilkinson, *Environ. Sci.: Nano*, 2017, **4**, 1339–1349.

173 I. Aharchaou, J. S. Py, S. Cambier, J. L. Loizeau, G. Cornelis, P. Rousselle, E. Battaglia and D. A. L. Vignati, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2018, **37**, 983–992.

174 H. Klingberg, L. B. Oddershede, K. Loeschner, E. H. Larsen, S. Loft and P. Møller, *Toxicol. Res.*, 2015, **4**, 655–666.

175 M. Logozzi, D. Mizzoni, B. Bocca, R. Di Raimo, F. Petrucci, S. Caimi, A. Alimonti, M. Falchi, F. Cappello, C. Campanella, C. C. Bavisotto, S. David, F. Bucchieri, D. F. Angelini, L. Battistini and S. Fais, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2019, **137**, 23–36.

176 A. Abdelkhaliq, M. van der Zande, A. K. Undas, R. J. B. Peters and H. Bouwmeester, *Nanotoxicology*, 2020, **14**, 111–126.

177 A. Abdelkhaliq, M. van der Zande, R. J. B. Peters and H. Bouwmeester, *Part. Fibre Toxicol.*, 2020, **17**, 11.

178 I.-L. Hsiao, F. S. Bierkandt, P. Reichardt, A. Luch, Y.-J. Huang, N. Jakubowski, J. Tentschert and A. Haase, *J. Nanobiotechnol.*, 2016, **14**, 50.

179 T. Lammel, A. Mackevica, B. R. Johansson and J. Sturve, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2019, **26**, 15354–15372.

180 Y. Dan, W. Zhang, R. Xue, X. Ma, C. Stephan and H. Shi, *Environ. Sci. Technol.*, 2015, **49**, 3007–3014.

181 Y. Dan, X. Ma, W. Zhang, K. Liu, C. Stephan and H. Shi, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, 5157–5167.

182 D. Bao, Z. G. Oh and Z. Chen, *Front. Plant Sci.*, 2016, **7**, 1–8.

183 J. Jiménez-Lamana, J. Wojcieszek, M. Jakubiak, M. Asztemborska and J. Szpunar, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2016, **31**, 2321–2329.

184 J. Nath, I. Dror, P. Landa, T. Vanek, I. Kaplan-Ashiri and B. Berkowitz, *Environ. Pollut.*, 2018, **242**, 1827–1837.

185 P. Wang, E. Lombi, S. Sun, K. G. Scheckel, A. Malysheva, B. A. McKenna, N. W. Menzies, F.-J. Zhao and P. M. Kopittke, *Environ. Sci.: Nano*, 2017, **4**, 448–460.

186 K. Kińska, J. Jiménez-Lamana, J. Kowalska, B. Krasnodębska-Ostręga and J. Szpunar, *Sci. Total Environ.*, 2018, **615**, 1078–1085.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

187 L. Torrent, M. Iglesias, E. Marguí, M. Hidalgo, D. Verdaguer, L. Llorens, A. Kodre, A. Kavčič and K. Vogel-Mikuš, *J. Hazard. Mater.*, 2020, **384**, 121201.

188 J. Wojcieszek, J. Jiménez-Lamana, K. Bierla, M. Asztemborska, L. Ruzik, M. Jarosz and J. Szpunar, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2019, **34**, 683–693.

189 S. Laughton, A. Laycock, F. von der Kammer, T. Hofmann, E. A. Casman, S. M. Rodrigues and G. V. Lowry, *J. Nanopart. Res.*, 2019, **21**, 174.

190 A. A. Keller, Y. Huang and J. Nelson, *J. Nanopart. Res.*, 2018, **20**, 101.

191 F. Dang, Q. Wang, W. Cai, D. Zhou and B. Xing, *Nanotoxicology*, 2020, **14**, 654–666.

192 W. Y. Zhang, Q. Wang, M. Li, F. Dang and D. M. Zhou, *Nanotoxicology*, 2019, **13**, 1073–1086.

193 Y. Deng, E. J. Petersen, K. E. Challis, S. A. Rabb, R. D. Holbrook, J. F. Ranville, B. C. Nelson and B. Xing, *Environ. Sci. Technol.*, 2017, **51**, 10615–10623.

194 C. C. Li, F. Dang, M. Li, M. Zhu, H. Zhong, H. Hintelmann and D. M. Zhou, *Nanotoxicology*, 2017, **11**, 699–709.

195 M. Hayder, J. Wojcieszek, M. Asztemborska, Y. Zhou and L. Ruzik, *J. Sci. Food Agric.*, 2020, **100**, 4950–4958.

196 J. Wojcieszek, J. Jiménez-Lamana, L. Ruzik, M. Asztemborska, M. Jarosz and J. Szpunar, *Front. Environ. Sci.*, 2020, **8**, 1–12.

197 J. Wojcieszek, J. Jiménez-Lamana, K. Bierła, L. Ruzik, M. Asztemborska, M. Jarosz and J. Szpunar, *Sci. Total Environ.*, 2019, **683**, 284–292.

198 E. P. Gray, J. G. Coleman, A. J. Bednar, A. J. Kennedy, J. F. Ranville and C. P. Higgins, *Environ. Sci. Technol.*, 2013, **47**, 14315–14323.

199 J. G. Coleman, A. J. Kennedy, A. J. Bednar, J. F. Ranville, J. G. Laird, A. R. Harmon, C. A. Hayes, E. P. Gray, C. P. Higgins, G. Lotufo and J. A. Steevens, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2013, **32**, 2069–2077.

200 S. Makama, R. Peters, A. Undas and N. W. van den Brink, *Environ. Chem.*, 2015, **12**, 643.

201 M. E. Johnson, S. K. Hanna, A. R. Montoro Bustos, C. M. Sims, L. C. C. Elliott, A. Lingayat, A. C. Johnston, B. Nikoobakht, J. T. Elliott, R. D. Holbrook, K. C. K. Scott, K. E. Murphy, E. J. Petersen, L. L. Yu and B. C. Nelson, *ACS Nano*, 2017, **11**, 526–540.

202 L. D. Scanlan, R. B. Reed, A. V. Loguinov, P. Antczak, A. Tagmount, S. Aloni, D. T. Nowinski, P. Luong, C. Tran, N. Karunaratne, D. Pham, X. X. Lin, F. Falciani, C. P. Higgins, J. F. Ranville, C. D. Vulpe and B. Gilbert, *ACS Nano*, 2013, **7**, 10681–10694.

203 F. Gallocchio, G. Biancotto, A. Moressa, F. Pascoli, T. Pretto, A. Toffan, G. Arcangeli, F. Montesi, R. Peters and A. Ricci, *Food Chem.*, 2020, **323**, 126841.

204 H. K. Sung, E. Jo, E. Kim, S. Yoo, J. Lee, P. Kim, Y. Kim and I.-C. Eom, *Chemosphere*, 2018, **209**, 815–822.

205 F. Abdolahpur Monikh, L. Chupani, E. Zusková, R. Peters, M. Vancová, M. G. Vijver, P. Porcal and W. J. G. M. Peijnenburg, *Environ. Sci. Technol.*, 2019, **53**, 946–953.

206 K. Loeschner, M. S. J. Brabrand, J. J. Sloth and E. H. Larsen, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, **406**, 3845–3851.

207 R. Tassinari, F. Cubadda, G. Moracci, F. Aureli, M. D'Amato, M. Valeri, B. De Berardis, A. Raggi, A. Mantovani, D. Passeri, M. Rossi and F. Maranghi, *Nanotoxicology*, 2014, **8**, 654–662.

208 R. Álvarez-Fernández García, N. Fernández-Iglesias, C. López-Chaves, C. Sánchez-González, J. Llopis, M. Montes-Bayón and J. Bettmer, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2019, **55**, 1–5.

209 F. Aureli, M. Ciprotti, M. D'Amato, E. do Nascimento da Silva, S. Nisi, D. Passeri, A. Sorbo, A. Raggi, M. Rossi and F. Cubadda, *Nanomaterials*, 2020, **10**, 888.

210 J. Modrzynska, T. Berthing, G. Ravn-Haren, K. Kling, A. Mortensen, R. R. Rasmussen, E. H. Larsen, A. T. Saber, U. Vogel and K. Loeschner, *PLoS One*, 2018, **13**, 1–22.

211 T. Horváth, A. Papp, N. Igaz, D. Kovács, G. Kozma, V. Trenka, L. Tiszlavicz, Z. Rázga, Z. Kónya, M. Kiricsi and T. Vezér, *Int. J. Nanomed.*, 2018, **13**, 7061–7077.

212 L. Campagnolo, M. Massimiani, L. Vecchione, D. Piccirilli, N. Toschi, A. Magrini, E. Bonanno, M. Scimeca, L. Castagnozzi, G. Buonanno, L. Stabile, F. Cubadda, F. Aureli, P. H. B. Fokkens, W. G. Kreyling, F. R. Cassee and A. Pietroiusti, *Nanotoxicology*, 2017, **11**, 687–698.

213 M. van der Zande, R. J. Vandebriel, E. Van Doren, E. Kramer, Z. Herrera Rivera, C. S. Serrano-Rojero, E. R. Gremmer, J. Mast, R. J. B. Peters, P. C. H. Hollman, P. J. M. Hendriksen, H. J. P. Marvin, A. a C. M. Peijnenburg and H. Bouwmeester, *ACS Nano*, 2012, **6**, 7427–7442.

214 F. Gallocchio, G. Biancotto, V. Cibin, C. Losasso, S. Belluco, R. Peters, G. van Bemmel, C. Cascio, S. Weigel, P. Tromp, F. Gobbo, S. Catania and A. Ricci, *J. Agric. Food Chem.*, 2017, **65**, 3767–3774.

215 J. Vidmar, K. Loeschner, M. Correia, E. H. Larsen, P. Manser, A. Wichser, K. Boodhia, Z. S. Al-Ahmady, J. Ruiz, D. Astruc and T. Buerki-Thurnherr, *Nanoscale*, 2018, **10**, 11980–11991.

216 R. J. B. Peters, G. van Bemmel, Z. Herrera-Rivera, H. P. F. G. Helsper, H. J. P. Marvin, S. Weigel, P. C. Tromp, A. G. Oomen, A. G. Rietveld and H. Bouwmeester, *J. Agric. Food Chem.*, 2014, **62**, 6285–6293.

217 S. Candás-Zapico, D. J. Kutscher, M. Montes-Bayón and J. Bettmer, *Talanta*, 2018, **180**, 309–315.

218 E. Verleysen, E. Van Doren, N. Waegeneers, P. J. De Temmerman, M. Abi Daoud Francisco and J. Mast, *J. Agric. Food Chem.*, 2015, **63**, 3570–3578.

219 O. Geiss, J. Ponti, C. Senaldi, I. Bianchi, D. Mehn, J. Barrero, D. Gilliland, R. Matissek and E. Anklam, *Food Addit. Contam., Part A: Chem., Anal., Control, Exposure Risk Assess.*, 2020, **37**, 239–253.

220 G. Bucher and F. Auger, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2019, **34**, 1380–1386.

221 B. Kollander, F. Widemo, E. Ågren, E. H. Larsen and K. Loeschner, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2017, **409**, 1877–1885.

222 K. Loeschner, M. Correia, C. López Chaves, I. Rokkjær and J. J. Sloth, *Food Addit. Contam., Part A: Chem., Anal., Control, Exposure Risk Assess.*, 2018, **35**, 86–93.

223 I. de la Calle, M. Menta, M. Klein and F. Séby, *Food Chem.*, 2018, **266**, 133–145.

224 M. V. Taboada-López, P. Herbello-Hermelo, R. Domínguez-González, P. Bermejo-Barrera and A. Moreda-Piñeiro, *Talanta*, 2019, **195**, 23–32.

225 C. Moens, N. Waegeneers, A. Fritzsche, P. Nobels and E. Smolders, *J. Chromatogr. A*, 2019, **1599**, 203–214.

226 M. A. Gomez-Gonzalez, E. Bolea, P. A. O'Day, J. Garcia-Guinea, F. Garrido and F. Laborda, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 5125–5135.

227 C. D. Metcalfe, T. Sultana, J. Martin, K. Newman, P. Helm, S. Kleywegt, L. Shen and V. Yargeau, *Environ. Monit. Assess.*, 2018, **190**, 555.

228 B. Xiao, Y. Zhang, X. Wang, M. Chen, B. Sun, T. Zhang and L. Zhu, *Environ. Sci.: Nano*, 2019, **6**, 3431–3441.

229 S. Baur, T. Reemtsma, H.-J. Stärk and S. Wagner, *Chemosphere*, 2020, **246**, 125765.

230 S. P. Bitragunta, S. G. Palani, A. Gopala, S. K. Sarkar and V. R. Kandukuri, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2017, **98**, 595–600.

231 F. Tou, Y. Yang, J. Feng, Z. Niu, H. Pan, Y. Qin, X. Guo, X. Meng, M. Liu and M. F. Hochella, *Environ. Sci. Technol.*, 2017, **51**, 4831–4840.

232 F. Loosli, J. Wang, S. Rothenberg, M. Bizimis, C. Winkler, O. Borovinskaya, L. Flamigni and M. Baalousha, *Environ. Sci.: Nano*, 2019, **6**, 763–777.

233 D. T. Maiga, B. B. Mamba and T. A. M. Msagati, *Water Supply*, 2020, **20**, 516–528.

234 A. P. Gondikas, F. Von Der Kammer, R. B. Reed, S. Wagner, J. F. Ranville and T. Hofmann, *Environ. Sci. Technol.*, 2014, **48**, 5415–5422.

235 A. Gondikas, F. von der Kammer, R. Kaegi, O. Borovinskaya, E. Neubauer, J. Navratilova, A. Praetorius, G. Cornelis and T. Hofmann, *Environ. Sci.: Nano*, 2018, **5**, 313–326.

236 R. B. Reed, D. P. Martin, A. J. Bednar, M. D. Montaño, P. Westerhoff and J. F. Ranville, *Environ. Sci.: Nano*, 2017, **4**, 69–77.

237 A. K. Venkatesan, R. B. Reed, S. Lee, X. Bi, D. Hanigan, Y. Yang, J. F. Ranville, P. Herckes and P. Westerhoff, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2018, **100**, 120–126.

238 L. N. Rand, Y. Bi, A. Poustie, A. J. Bednar, D. J. Hanigan, P. Westerhoff and J. F. Ranville, *Sci. Total Environ.*, 2020, **743**, 140845.

239 D. T. Maiga, H. Nyoni, B. B. Mamba and T. A. M. Msagati, *SN Appl. Sci.*, 2020, **2**, 326.

240 J.-L. Wang, E. Alasonati, M. Tharaud, A. Gelabert, P. Fisicaro and M. F. Benedetti, *Water Res.*, 2020, **176**, 115722.

241 A. Wimmer, A. Kalinnik and M. Schuster, *Water Res.*, 2018, **141**, 227–234.

242 A. R. Donovan, C. D. Adams, Y. Ma, C. Stephan, T. Eichholz and H. Shi, *Chemosphere*, 2016, **144**, 148–153.

243 A. R. Donovan, C. D. Adams, Y. Ma, C. Stephan, T. Eichholz and H. Shi, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 5137–5145.

244 K. Phalyvong, Y. Sivry, H. Pauwels, A. Gélabert, M. Tharaud, G. Wille, X. Bourrat and M. F. Benedetti, *Front. Environ. Sci.*, 2020, **8**, 1–14.

245 I. Jreije, A. Azimzada, M. Hadioui and K. J. Wilkinson, *Molecules*, 2020, **25**, 5516.

246 L. Xu, Z. Wang, J. Zhao, M. Lin and B. Xing, *Environ. Pollut.*, 2020, **260**, 114043.

247 J. Sanchís, J. Jiménez-Lamana, E. Abad, J. Szpunar and M. Farré, *Environ. Sci. Technol.*, 2020, **54**, 3969–3978.

248 R. Vogt, D. Mozhayeva, B. Steinhoff, A. Schardt, B. T. F. Spelz, A. Philippe, S. Kurtz, G. E. Schaumann, C. Engelhard, H. Schönherr, D. K. Lamatsch and J. Wanzenböck, *Sci. Total Environ.*, 2019, **696**, 134034.

249 D. M. Mitrano, E. K. Lesher, A. Bednar, J. Monserud, C. P. Higgins and J. F. Ranville, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2012, **31**, 115–121.

250 P. Cervantes-Avilés, Y. Huang and A. A. Keller, *Water Res.*, 2019, **156**, 188–198.

251 J. Tuoriniemi, G. Cornelis and M. Hassellöv, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 3965–3972.

252 M. Hadioui, V. Merdzan and K. J. Wilkinson, *Environ. Sci. Technol.*, 2015, **49**, 6141–6148.

253 S. Bevers, M. D. Montaño, L. Rybicki, T. Hofmann, F. von der Kammer and J. F. Ranville, *Front. Environ. Sci.*, 2020, **8**, 84.

254 L. Li, M. Stoiber, A. Wimmer, Z. Xu, C. Lindenblatt, B. Helmreich and M. Schuster, *Environ. Sci. Technol.*, 2016, **50**, 6327–6333.

255 A. K. Venkatesan, B. T. Rodríguez, A. R. Marcotte, X. Bi, J. Schoepf, J. F. Ranville, P. Herckes and P. Westerhoff, *Environ. Sci.: Water Res. Technol.*, 2018, **4**, 1923–1932.

256 A. Wimmer, J. Beyerl and M. Schuster, *Environ. Sci. Technol.*, 2019, **53**, 13293–13301.

257 M. Gajec, E. Kukulska-Zając and A. Król, *Appl. Ecol. Environ. Res.*, 2020, **18**, 5775–5788.

258 I. De la Calle, P. Pérez-Rodríguez, D. Soto-Gómez and J. E. López-Periago, *Microchem. J.*, 2017, **133**, 293–301.

259 L. N. Rand and J. F. Ranville, *Environ. Sci. Technol.*, 2019, **53**, 11214–11222.

260 R. Kaegi, A. Englert, A. Gondikas, B. Sinnet, F. von der Kammer and M. Burkhardt, *NanoImpact*, 2017, **8**, 73–79.

261 J. R. Huang, P. Li, J. H. Wen, X. Hu, Y. J. Chen, D. H. Yin and H. Z. Lian, *Spectrosc. Lett.*, 2018, **51**, 252–256.

262 D. Ruhland, K. Nwoko, M. Perez, J. Feldmann and E. M. Krupp, *Anal. Chem.*, 2019, **91**, 1164–1170.

263 J. Jiménez-Lamana, I. Abad-Álvaro, K. Bierla, F. Laborda, J. Szpunar and R. Lobinski, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2018, **33**, 452–460.

264 M. V. Taboada-López, N. Alonso-Seijo, P. Herbello-Hermelo, P. Bermejo-Barrera and A. Moreda-Piñeiro, *Microchem. J.*, 2019, **148**, 652–660.

265 M. V. Taboada-López, S. Iglesias-López, P. Herbello-Hermelo, P. Bermejo-Barrera and A. Moreda-Piñeiro, *Anal. Chim. Acta*, 2018, **1018**, 16–25.

266 Q. Zhou, L. Liu, N. Liu, B. He, L. Hu and L. Wang, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2020, **198**, 110670.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

267 M. Roman, C. Rigo, H. Castillo-Michel, I. Munivrana, V. Vindigni, I. Mičetić, F. Benetti, L. Manodori and W. R. L. Cairns, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 5109–5124.

268 K. Badalova, P. Herbello-Hermelo, P. Bermejo-Barrera and A. Moreda-Piñeiro, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2019, **54**, 55–61.

269 K. Loeschner, C. F. Harrington, J.-L. Kearney, D. J. Langton and E. H. Larsen, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2015, 4541–4554.

270 J. Schoon, S. Geißler, J. Traeger, A. Luch, J. Tentschert, G. Perino, F. Schulze, G. N. Duda, C. Perka and A. Rakow, *Nanomedicine*, 2017, **13**, 2415–2423.

271 R. J. B. Peters, A. G. Oomen, G. van Bemmel, L. van Vliet, A. K. Undas, S. Munniks, R. L. A. W. Bleys, P. C. Tromp, W. Brand and M. van der Lee, *Nanotoxicology*, 2020, **14**, 420–432.

272 M. B. Heringa, R. J. B. Peters, R. L. A. W. Bleys, M. K. van der Lee, P. C. Tromp, P. C. E. van Kesteren, J. C. H. van Eijkeren, A. K. Undas, A. G. Oomen and H. Bouwmeester, *Part. Fibre Toxicol.*, 2018, **15**, 15.

273 E. Leese, J. F. Staff, V. A. Carolan and J. Morton, *Ann. Work Exposures Health*, 2017, **61**, 902–906.

274 R. d. Heringer and J. F. Ranville, *Forensic Sci. Int.*, 2018, **288**, e20–e25.

275 K. Proulx, M. Hadioui and K. J. Wilkinson, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 5147–5155.

276 A. Praetorius, A. Gundlach-Graham, E. Goldberg, W. Fabienke, J. Navratilova, A. Gondikas, R. Kaegi, D. Günther, T. Hofmann and F. von der Kammer, *Environ. Sci.: Nano*, 2017, **4**, 307–314.

277 M. D. Montaño, H. R. Badiei, S. Bazargan and J. F. Ranville, *Environ. Sci.: Nano*, 2014, **1**, 338–346.

278 E. Bolea-Fernandez, D. Leite, A. Rua-Ibarz, T. Liu, G. Woods, M. Aramendia, M. Resano and F. Vanhaecke, *Anal. Chim. Acta*, 2019, **1077**, 95–106.

279 M. D. Montaño, B. J. Majestic, Å. K. Jämting, P. Westerhoff and J. F. Ranville, *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 4733–4741.

280 J. Vidmar, T. Buerki-Thurnherr and K. Loeschner, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2018, **33**, 752–761.

281 A. Urstoeger, A. Wimmer, R. Kaegi, S. Reiter and M. Schuster, *Environ. Sci. Technol.*, 2020, **54**, 12063–12071.

282 J. Chao, J. Liu, S. Yu, Y. Feng, Z. Tan, R. Liu and Y. Yin, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 6875–6882.

283 F. Laborda, E. Bolea, G. Cepriá, M. T. Gómez, M. S. Jiménez, J. Pérez-Arantegui and J. R. Castillo, *Anal. Chim. Acta*, 2016, **904**, 10–32.

284 S. A. Pergantis, T. L. Jones-Lepp and E. M. Heithmar, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 6454–6462.

285 K. A. Huynh, E. Siska, E. Heithmar, S. Tadjiki and S. A. Pergantis, *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 4909–4916.

286 D. Mozhayeva, I. Strenge and C. Engelhard, *Anal. Chem.*, 2017, **89**, 7152–7159.

287 J. Tan, J. Liu, M. Li, H. El Hadri, V. A. Hackley and M. R. Zachariah, *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 8548–8555.

288 D. Rakcheev, A. Philippe and G. E. Schaumann, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 10643–10647.

289 Y. U. Hachenberger, D. Rosenkranz, F. L. Kriegel, B. Krause, R. Matschaß, P. Reichardt, J. Tentschert, P. Laux, N. Jakubowski, U. Panne and A. Luch, *Materials*, 2020, **13**, 1–14.

290 W.-C. Lee, B.-T. Lee, S. Lee, Y. S. Hwang, E. Jo, I.-C. Eom, S.-W. Lee and S.-O. Kim, *Microchem. J.*, 2016, **129**, 219–230.

291 K. Loeschner, J. Navratilova, C. Købler, K. Mølhave, S. Wagner, F. von der Kammer and E. H. Larsen, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013, **405**, 8185–8195.

292 R. Liu, P. Wu, L. Yang, X. Hou and Y. Lv, *Mass Spectrom. Rev.*, 2014, **33**, 373–393.

293 M. Cais, S. Dani, Y. Eden, O. Gandolfi, M. Horn, E. E. Isaacs, Y. Josephy, Y. Saar, E. Slovin and L. Snarsky, *Nature*, 1977, **270**, 534–535.

294 C. Zhang, F. Wu, Y. Zhang, X. Wang and X. Zhang, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2001, **16**, 1393–1396.

295 O. I. Ornatsky, R. Kinach, D. R. Bandura, X. Lou, S. D. Tanner, V. I. Baranov, M. Nitz and M. A. Winnik, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2008, **23**, 463–469.

296 S. Hu, R. Liu, S. Zhang, Z. Huang, Z. Xing and X. Zhang, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2009, **20**, 1096–1103.

297 R. Liu, Z. Xing, Y. Lv, S. Zhang and X. Zhang, *Talanta*, 2010, **83**, 48–54.

298 Z. Huang, C. Wang, R. Liu, Y. Su and Y. Lv, *Anal. Chem.*, 2020, **92**, 2876–2881.

299 Y. Cao, G. Mo, J. Feng, X. He, L. Tang, C. Yu and B. Deng, *Anal. Chim. Acta*, 2018, **1028**, 22–31.

300 Y. Cao, J. Feng, L. Tang, G. Mo, W. Mo and B. Deng, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2020, **166**, 105797.

301 G. Han, Z. Xing, Y. Dong, S. Zhang and X. Zhang, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2011, **50**, 3462–3465.

302 B. Li, H. Tang, R. Yu and J. Jiang, *Anal. Chem.*, 2020, **92**, 2379–2382.

303 S. Zhang, G. Han, Z. Xing, S. Zhang and X. Zhang, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 3541–3547.

304 X. Xu, J. Chen, B. Li, L. Tang and J. Jiang, *Analyst*, 2019, **144**, 1725–1730.

Analytical and Bioanalytical Chemistry
https://doi.org/10.1007/s00216-022-04215-z

RESEARCH PAPER

How to trust size distributions obtained by single particle inductively coupled plasma mass spectrometry analysis

Ana C. Gimenez-Ingalaturre[1] · Khaoula Ben-Jeddou[1] · Josefina Perez-Arantegui[1] · María S. Jimenez[1] · Eduardo Bolea[1] · Francisco Laborda[1]

Received: 20 April 2022 / Revised: 9 June 2022 / Accepted: 4 July 2022
© The Author(s) 2022

Abstract
Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS) is a technique widely used to obtain direct information about the number concentration and the size distribution of nanoparticles in liquid suspensions. However, its methods still lack clear quality control strategies to confirm the validity of the information derived from them. Only the detection of the complete size distribution of the nanoparticles in a sample over the size critical value ensures obtaining unbiased quantitative information, otherwise information should be restricted to report the presence of nanoparticles over a certain size and number concentration since their actual total number concentration is underestimated and the size overestimated. Under the latter conditions, data processing produces histograms showing the tails of the incomplete size distributions, although apparently, complete distributions can also be obtained when particle events are recorded as peaks, as reported here for the first time. The occurrence of these misleading situations must be critically evaluated for each SP-ICP-MS analysis. An approach, based on estimation of size critical values and successive dilutions, is proposed for the assessment of the validity of the quantitative information obtained, together with specific criteria for reconsidering the information that can be derived from those measurements. The approach was verified with different case studies and applied to the analysis of complex nanomaterials, confirming the validity of the reported information by comparison with other techniques. A calculation tool is also included to facilitate the estimation of size critical values under experimental conditions.

Keywords Single particle · SP-ICP-MS · Nanoparticles · Validation · Quality control

Introduction

Single particle detection has become one of the cornerstones of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) over the last years, offering unique features for the analysis of (nano)particle suspensions [1]. Whereas conventional ICP-MS just provides information about elemental composition and element mass concentration, an ICP-MS instrument working in single particle mode allows to obtain: (i) qualitative information about the presence of (nano)particulate and dissolved forms of specific elements; (ii) characterization information about the mass of element/s per (nano)particle, which can be converted into particle size as long as information about the composition, shape, and density of the (nano)particles is known or assumed; and (iii) quantitative information as number concentration of (nanoparticles, as well as mass concentrations of the dissolved and (nano)particulate forms [2]. The additional work of manufacturers, by incorporating technical improvements to the ICP-MS instruments, as well as specific software for the treatment of data, has contributed to the spreading of single particle ICP-MS (SP-ICP-MS) [3–5].

In any case, the development of SP-ICP-MS during the last years has made this methodology available to a broad range of users and applications. SP-ICP-MS applications can be divided into two main groups: (i) laboratory studies where the fate and transformations of nanoparticles spiked

Published in the topical collection *Analytical Nanoscience and Nanotechnology* with guest editors Ángel Ríos and Wolfgang J. Parak.

In honor of Prof. Miguel Valcárcel.

✉ Francisco Laborda
flaborda@unizar.es

[1] Group of Analytical Spectroscopy and Sensors (GEAS), Institute of Environmental Sciences (IUCA), University of Zaragoza, Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza, Spain

Published online: 30 July 2022

to in vitro and in vivo assays are followed in test media or organisms along the assays (e.g., environmental, ecotoxicological, and toxicological studies); and (ii) analysis of industrial and consumer products containing nanoparticles (e.g., cosmetics, textiles, polymers, and foods) and monitoring the occurrence of (nano)particles in the environment and organisms, including humans. Whereas in the first group of applications the chemical composition, concentration, and size of the (nano)particles are well known, this is not the case when analyzing any of the samples from the second group. This means that users need basic and robust criteria and tools to confirm the information provided by SP-ICP-MS methods in such analysis. Because of the inherent difficulties when analyzing such unknown samples, SP-ICP-MS users must be aware of the current limitations of this technique and take one step backward, focusing primarily on the level of information obtained and the extent to which a SP-ICP-MS method applied to a specific sample provides the information what is intended to be reported.

Considering one specific element, the first question should be: Are there particles containing such element in the sample? If the answer is affirmative, the next questions could be: What is their mass content per particle (or their size if the shape, composition, and density of the particles is known or assumed)? and what is the concentration of particles? The first question can be answered by using SP-ICP-MS as screening method and applying a number of metrological criteria [6]. Answering the next questions will depend on the actual population of particles in the sample and the capability of the instrument to record their full-size distribution in such sample.

If the particles in the sample are larger than the size critical value, accurate information about the complete size distribution and the number concentration of the particles may be obtained, otherwise just partial information will be attainable, being restricted to particles over the size critical value and hence underestimating their actual total number concentration. This information could also be considered acceptable if the user is aware of its limitations. Whereas in scenario (i) SP-ICP-MS results can be compared with data from the spiked nanoparticles [7–10], this is not the case in scenario (ii), where the use of alternative and/or supplementary methods are needed for confirmation of the SP-ICP-MS results [11–13].

Apart from their concentration, the detection of particles in SP-ICP-MS is conditioned by the element measured and its content in the particle, as well as the performance of the instrument (detection efficiency) [14, 15]. On the other hand, particle events in SP-ICP-MS are detected as pulses or peaks over a continuous baseline, whose origin is the instrumental background or the presence of dissolved forms of the element measured. In any case, the noise associated to the baseline constrains the capability of detection of particles, but it can also lead to the occurrence of false positives when threshold and peak detection criteria are not applied conveniently. Whereas particle events detected as pulses (one-reading events) by using dwell times in the range of milliseconds are easily handled by using simple algorithms implemented in spreadsheets, data recorded at faster frequencies using microsecond dwell times involve processing of the peaks (more than one-reading events) by more complex algorithms and software, which should also be validated, in line with those used in chromatography [16].

Although most of the application of SP-ICP-MS described in the bibliography use the commercial software provided by the instrument companies for the detection of particle events, different alternatives have been proposed working with dwell times both in milli- [17] and microseconds [17–21]. Most of these approaches try to improve the identification of nanoparticles with sizes close to the limit of detection or in those situations with high concentrations of dissolved forms of the element measured. Basically, both Gaussian [18, 19, 21] and Poisson [20, 21, 4

The aim of this work is to assess critically the information achieved by SP-ICP-MS and how it should be reported to maintain its validity. Although main attention is paid to the effect of the baseline on the capability of detection of particles and the misinterpretation of the signals obtained, the study is not limited to those situations with high dissolved element concentrations, but give an overall quality control strategy based on successive dilutions in combination with the estimation of size critical values. This strategy proposed has been checked for assessing the validity of the reported SP-ICP-MS information in complex nanomaterials, by comparison with other techniques.

Experimental

Instrumentation

A Perkin-Elmer NexION 2000 mass spectrometer (Toronto, Canada) was used for ICP-MS measurements in single particle mode. The sample introduction system consisted of a glass concentric nebulizer and a baffled cyclonic spray chamber (Meinhard). Default instrumental and data acquisition parameters are listed in Table 1.

Separations by hydrodynamic chromatography (HDC) were performed on a Waters 2796 chromatograph (Bioseparation module, Waters Corporation, Milford, USA) coupled to an ICP-MS ELAN DRC-e (Perkin-Elmer, Toronto, Canada). The chromatograph was equipped with a non-porous packed column PL-PSDA type 1 (Agilent Technologies, Germany) for hydrodynamic separations, with a nominal separation range from 5 to 300 nm. The column dimensions were 80 cm in length and 7.5 mm of internal diameter.

Table 1 Default instrumental and data acquisition parameters for SP-ICP-MS

Instrumental parameters	
RF power	1600 W
Argon gas flow rate	
Plasma	15 L min^{-1}
Auxiliary	1.2 L min^{-1}
Nebulizer	1.0 L min^{-1}
Sample flow rate	0.34 mL min^{-1}
Data acquisition parameters	
Dwell time	100 µs, 5 ms
Total acquisition time	60, 300 s
Isotopes monitored	^{107}Ag, ^{197}Au

A field-emission scanning electron microscope (Merlin™ FESEM, Carl Zeiss Nano Technology Systems, Jena, Germany) with a Gemini column and an energy-dispersive X-ray microanalyzer (X-Max, Oxford Instruments, Abingdon, UK) was used to imaging the samples. Observations were carried out at 5 kV. A FEI Tecnai T20 Transmission Electron Microscope (FEI Technologies Inc., USA), working at 200 kV, was also used.

Standards

Diluted suspensions of gold and silver nanoparticles were prepared from commercially available suspensions. An ultra-uniform gold nanoparticle (PEG-carboxil 0.8 kDa surface) suspension of 47.8 ± 1.8 nm diameter was obtained from NanoComposix (San Diego, CA, USA). Suspensions of monodisperse citrate-stabilized silver nanoparticles of nominal diameter 10.3 ± 2.1, 20.8 ± 3.0, 39 ± 5, and 60 ± 7 nm were purchased from NanoComposix (San Diego, CA, USA). Sodium dodecylsulphate (SDS) (Bio-Rad, California, USA), sodium hydroxide (Scharlau, Barcelona, Spain), D-penicillamine (Sigma Aldrich, Germany), and nitric acid (Baker Instranalyzed for Trace Metals Analysis, J.T. Baker, Holland) were also used.

Aqueous gold and silver solutions were prepared from standard stock solutions of 1000 mg L^{-1} (Sigma Aldrich, Switzerland) by dilution in ultrapure water.

Nanomaterials

Two antimicrobial products, denoted as M1 and M2, consisting of aqueous suspensions containing silver nanoparticles stabilized with a natural organic ligand, were provided by Laboratorios Enosan S.L., Spain.

Procedures

Standard suspensions Dilutions of the stock suspension of silver and gold nanoparticles were prepared in ultrapure water (Milli-Q Advantage, Molsheim, France) by accurately weighing (±0.1 mg) aliquots after 1 min sonication. After dilution and before each analysis, the suspensions were bath sonicated for 1 min. Aliquots of silver (I) solution were added in concentrations from 0.02 up to 2.50 µg L^{-1} to silver nanoparticles suspensions, which number concentration was kept constant in each experiment. Samples were bath sonicated for 1 min before each analysis.

SP-ICP-MS measurements Suspensions were measured in single particle mode using the Syngistix Nano-Application module version 2.5 (PerkinElmer, Inc.). The dwell times used were 5 ms and 100 µs with total acquisition times of 60 and 300 s, recording 12 000 and 60 000 (at 5 ms) or 600 000 and 3 million (at 100 µs) readings per time scan, respectively (Table 1). Nebulization efficiency was determined using the ultra-uniform gold nanoparticle standard described above. Similar results were obtained for the frequency and the size methods. Sample flow rate was measured gravimetrically. Recorded signals were initially processed by using the software provided by the manufacturer (Syngistix Nano-Application module version 2.5) by applying a 5-sigma threshold calculated as five times the square root of the mean baseline intensity of the time scan. Alternatively, recorded scan files were exported and processed with the SPCal software [21] by using the Poisson filter option.

Analysis by HDC-ICP-MS Volumes of 50 µL of the antimicrobial nanomaterials, diluted to ca. 300 µg L^{-1} with 1 mM penicillamine, were directly injected in the HDC column. The mobile phase consisted of 0.34 mM sodium dodecyl sulphate and 1 mM penicillamine [23]. The mobile phase was previously filtered through a 0.22 µm filter and degassed through an online vacuum degasser. Table S1 of Supplementary Information summarizes the experimental conditions.

For chromatograms integration and data processing, Origin 8 was used (Origin Lab, Northampton, MA, USA).

Size characterization by FESEM and TEM A volume of 20 µL of sample was deposited on a copper-grid holder, dried at room temperature, and carbon-coated using a Leica EM SCD500 high vacuum sputter coater (Leica Microsystem, Vienna, Austria) to improve conductivity. The same preparations were used for FESEM and TEM observations. ImageJ (Version 1.52) software was used for image processing and nanoparticle diameter measurement.

Calculation of size critical values

Size critical values (X_C^{size}) were estimated according to the 5-sigma threshold criterion used for discrimination of baseline from nanoparticle events, using different expressions depending on the dwell time applied and the type of particle event recorded [14]. For particle events recorded as pulses by using millisecond dwell times, the following expression was used:

$$X_C^{size} = \left(\frac{30\sigma_B}{\pi \rho F_P K_{ICPMS} K_M} \right)^{1/3} \quad (1)$$

where σ_B is the standard deviation of the baseline, ρ is the density, F_P is the mass fraction of the element in the particle, K_{ICPMS} is the detection efficiency, which represents the ratio of the number of ions detected versus the number of analyte atoms of the measured isotope introduced into the ICP; and K_M $(= AN_{Av}/M_M)$ is a factor related to the element measured, where A is the atomic abundance of the isotope considered, N_{Av} is the Avogadro number, and M_M is the atomic mass of the element. For particle events recorded as peaks by using microsecond dwell times, the expression was:

$$X_C^{size} = \left(\frac{30\sigma_B}{\frac{2}{w}\pi \rho F_P K_{ICPMS} K_M t_{dwell}} \right)^{1/3} \quad (2)$$

where w is the time-width of the peak (ca. 500 µs under the conditions used) and t_{dwell} is the dwell time. In both cases, σ_B was calculated as the square root of the mean baseline intensity (Y_B), measured in counts (per dwell time), rounded up to the next integer to be in accordance with the threshold criterion applied for discrimination of particle and baseline readings [14]. K_{ICPMS} was calculated from the analytical sensitivity of the dissolved element, the analyte nebulization efficiency, and sample flow rate, following a procedure described elsewhere [24] by using a dedicated spreadsheet. This spreadsheet (SP-ICP-MS_LODs_2.2) is available as Supplementary Information, and it is a revised version of SP-ICP-MS_LODs_1.3 [14], in which size critical values and limits of detection were calculated from the upper integer of the square root of the mean baseline intensity instead of just from its square root. Both size critical values and limits of detection were calculated from the same expression, which involves a 50% probability of false negatives in the calculation of the limits of detection, an assumption justified elsewhere [14, 25]. In the context of this work, it should be noted that the value calculated from Eq. 2 must be quoted as an a posteriori critical value or limit of decision and not as an a priori limit of detection, since the expression is going to be used to make the decision whether nanoparticles above a certain size have been detected in a sample.

Results and discussion

Effect of size critical values on the recording of nanoparticle size distributions

Nanoparticles occur as more or less broad size distributions. This means that information about the content of nanoparticles in a sample is conditioned not only by the capability of the SP-ICP-MS method to detect low concentrations of nanoparticles but also by its capability of detecting the complete distribution, including the smallest nanoparticles of it. On the other hand, size critical values and limits of detection in SP-ICP-MS depend not only on the performance of the instrument used and the element monitored but also on the baseline through its associated noise [14].

The effect of the baseline on the distribution recorded can be seen in Fig. 1. This figure shows the size distributions of 40 nm silver nanoparticles obtained at different mean baseline intensities by increasing the concentration of ionic silver from 0.02 to 2.50 µg L^{-1}, affecting the size critical value. Nanoparticle events were detected over the continuous baseline by using the software of the manufacturer applying a threshold criterion of 5-sigma, where the threshold was calculated from the mean baseline intensity measured in counts (Y_B) as $Y_B + 5\sqrt{Y_B}$ (rounded up to the upper integer), because of the Poisson behavior of the baseline [6]. Size critical values were calculated according to the same threshold criterion, applying Eqs. 1 and 2 for particle events recorded as pulses or peaks, respectively.

When a dwell time of 5 ms was used (Fig. 1a), the distribution was progressively lost when the baseline intensity increased. In this case, the size critical value increased from 23 nm, for a baseline corresponding to ultrapure water, up to 41 nm due to the presence of dissolved silver. When compared to the original size distribution of the nanoparticles (in black), the distribution was partially recorded because signals from nanoparticles below 41 nm could not be discriminated from the baseline noise. In spite of this, the appearance of the recorded distribution confirmed at first sight that part of the nanoparticle distribution had been missed and quantitative information about the nanoparticles in the suspension was not feasible. When the same nanoparticles were measured at 100 µs dwell time (Fig. 1b), the results were histograms showing apparently complete size distributions, although their magnitude decreased and their maximum moved to larger sizes when the concentration of dissolved silver and hence the intensity of the baseline increased. In the absence of the original size distribution of the suspension in ultrapure water, and no further confirmation of the results obtained, the concentration of nanoparticles in some of these

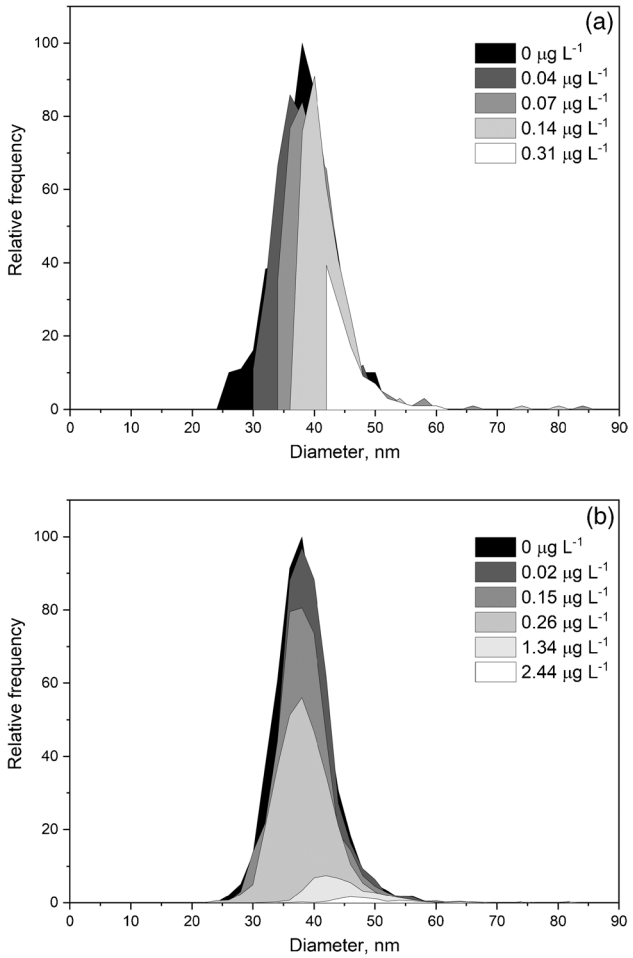


Fig. 1 Size distributions of 40 nm silver nanoparticles spiked with increasing concentrations of ionic silver for dwell times of 5 ms (**a**) and 100 μs (**b**). The legends list the ionic silver concentration in the nanoparticle suspensions

suspensions would be underestimated and their mean size overestimated. When comparing Figs. 1a and b, the main difference is that the distributions obtained in Fig. 1a are self-explanatory, showing that the distributions have been partially recorded, whereas those from Fig. 1b are not.

This different appearance of the size distributions when they are measured at milli- and microsecond dwell times lies in the nature of the particle events, pulses, or peaks, and how they have been processed. By using the manufacturer software, the application of any threshold criterion to pulse events directly removes those below the threshold, whereas when working with peak events, they are "partially lost" in the baseline noise, and their net total intensity reduced. The result is that large peaks are going to become smaller and small peaks are going to be missed, moving the size distribution to larger sizes, detecting less particles, but maintaining an apparent complete size distribution. Similar results were obtained when the raw data were processed by using the open-source software SPCal [21], as shown in Fig. S1.

Table 2 summarizes the effect of increasing the baseline intensity on the determination of the mean size of the nanoparticles and their number concentration by using the manufacturer software. The results obtained by using the software SPCal are presented in Table S2. With both data treatments, the increase in the size critical value involved an apparent increase in the mean size and a reduction in the number concentration, which was directly related to the progressive loss of the smaller nanoparticles. This means that, when analyzing unknown samples by SP-ICP-MS, the results obtained must be assessed in some way to confirm their validity. Otherwise, the information obtained should be reported just as qualitative or semiquantitative, and only the presence of particles over a certain size or/and number of particles over a certain number concentration [6] could be confirmed. Whenever the size distributions are not fully recorded, this should always be the rule.

Although the cases presented involve high intensity baselines due to the presence of dissolved species, the situations would also apply to isotopes with high background levels due to occurrence of polyatomics or even to low intensity baselines if the size of the nanoparticles measured is close to the size detection limit.

Approach for the assessment of the information provided by SP-ICP-MS analysis

In order to avoid the misinterpretation problems discussed above when unknown samples are analyzed by SP-ICP-MS, the results obtained should be assessed in some way, especially when using microsecond dwell times. Schwertfeger et al. [26] proposed a strategy involving the analysis of samples at different dilutions with the aim of reducing the concentration of dissolved element, despite the total number of particles counted were lower, which was compensated by increasing the acquisition time. Under such conditions, the information obtained would be considered valid if the number concentrations determined at two different dilutions were similar. Aznar et al. [27] also proposed an approach for quality control of the results based on the progressive dilution of the samples while maintaining the size distribution and the particle counts proportional to the dilution applied.

Whereas the approach of Aznar et al. was empirical, checking different dilutions to find the optimal measurement range for each sample, Schwertfeger et al. proposed the dilution of the samples to reduce the dissolved element concentration below the detection limit achieved by standard ICP-MS analysis, in combination with the increase of the acquisition time if needed. However, this criterion should be considered misleading since limits of detection of dissolved elements measured by ICP-MS in single particle mode are much lower than in

Table 2 Mean size and number concentration of nanoparticles, size critical values (X_C^{size}), and nanoparticle recovery for 40 nm silver nanoparticles spiked with increasing concentrations of ionic silver for dwell times of 5 ms and 100 µs. Total acquisition time: 60 s. Mean ± standard deviation ($n = 3$)

Suspension	Mean baseline intensity counts	X_C^{size} nm	Mean size nm	Number concentration L^{-1}	Recovery %
Dwell time: 5 ms					
40 nm AgNPs	2	22.9	39.1 ± 0.2	$1.64\times10^7 \pm 0.07\times10^7$	100 ± 4
40 nm AgNPs + 0.04 µg L^{-1} Ag(I)	8	28.8	41.1 ± 0.5	$9.8\times10^6 \pm 0.5\times10^6$	63 ± 3
40 nm AgNPs + 0.07 µg L^{-1} Ag(I)	13	31.9	44.3 ± 0.6	$4.2\times10^6 \pm 0.2\times10^6$	27 ± 1
40 nm AgNPs + 0.14 µg L^{-1} Ag(I)	27	35.5	49.3 ± 0.9	$1.7\times10^6 \pm 0.1\times10^6$	10.3 ± 0.4
40 nm AgNPs + 0.31 µg L^{-1} Ag(I)	64	40.9	58.8 ± 0.8	$2.4\times10^5 \pm 1.2\times10^5$	1.4 ± 0.7
Dwell time: 100 µs					
40 nm AgNPs	0.05	19.4	38.4 ± 0.2	$1.50\times10^8 \pm 0.03\times10^8$	100 ± 2
40 nm AgNPs + 0.02 µg L^{-1} Ag(I)	0.1	19.4	38.1 ± 0.2	$1.37\times10^8 \pm 0.02\times10^8$	96 ± 2
40 nm AgNPs + 0.15 µg L^{-1} Ag(I)	0.5	24.4	37.5 ± 0.3	$1.27\times10^8 \pm 0.04\times10^8$	87 ± 3
40 nm AgNPs + 0.26 µg L^{-1} Ag(I)	1	28.0	38.5 ± 0.1	$8.6\times10^7 \pm 0.2\times10^7$	59 ± 2
40 nm AgNPs + 1.34 µg L^{-1} Ag(I)	5	35.2	44.1 ± 0.6	$1.2\times10^7 \pm 0.1\times10^7$	8.4 ± 0.7
40 nm AgNPs + 2.44 µg L^{-1} Ag(I)	11	39.6	51.4 ± 2.4	$2.9\times10^6 \pm 0.1\times10^6$	1.9 ± 0.1

standard mode, because of the longer acquisition times used in SP-ICP-MS, and the fact that the increase of the acquisition time contributes to reduce this limit of detection further [14]. Our proposal is that, as a rule of thumb, samples should be diluted as much as possible to reduce the baseline intensity to blank levels, in order to get the best available size critical value, or, at least, to values corresponding to size critical values below the lower end of the nanoparticle distribution. Even under conditions of baseline blank levels, if the measured size distribution reaches a value that is next to the size critical value, part of the actual size distribution is being missed and the quantitative information will be biased.

Figure 2 shows a flow chart that summarizes the assessment approach proposed. First, the measurement of an instrumental blank (e.g., ultrapure water) allows to obtain the mean baseline intensity of the blank (Y_{Bblank}) to estimate the best size critical value from Eq. 1 ($\sigma_B = \sqrt{Y_{Bblank}}$). For simplicity, it is considered that no particles are detected from the blank, so the counting of particle events in a sample can be assimilated to an ideal Poisson counting process with zero blank. Under such ideal conditions, the detection of one particle event in a sample time scan would confirm the presence of particles in the sample [28]. Next, by measuring the nanoparticle suspension, information about the mean baseline intensity of the suspension (Y_{Bsusp}) and the number of particle events ($Y_{Nsusp(1)}$) is obtained. The attainable size critical value in the suspension can be estimated from Eq. 1 or 2 and the measured Y_{Bsusp}. Whenever the lower end of the measured size distribution, defined as the minimum size of the particle size distribution (PSD_{min}) with a number of particles higher than 0 (critical value for a zero blank), is larger than the size critical value (X_C^{size}), the suspension can be diluted (e.g., 1:2) to make a second confirmatory measurement $Y_{Nsusp(2)}$. On the contrary, if the PSD_{min} is next to the size critical value (the immediately consecutive data), the suspension must be diluted to reduce the baseline to the blank level, unless the baseline level in the blank and the suspension were not statistically different, in which case size critical values cannot be improved by dilution and hence no additional action can be taken. If particles are detected from a blank, a critical value for detection of particles higher than zero should be considered and more complex expressions should be used for its calculation [6, 28].

When measuring diluted suspensions, the acquisition time should be increased conveniently to count at least 100 particle events (minimum number concentration limit of quantitation under ideal counting conditions [28]). The agreement between the number concentrations determined from both dilutions will confirm the information obtained, both as number concentration and size distribution, otherwise part of the original size distribution of nanoparticles is not detected and the information will have to be considered as semiquantitative or just qualitative. In the case of particles with broad distributions, dilution might lead to a loss of information about the distribution itself, since fewer of the largest and the smallest particles would be detected despite increasing the acquisition time.

Proofs-of-concept of the approach

Two generic cases were studied as proofs-of-concept of the approach presented above. The first one considers the

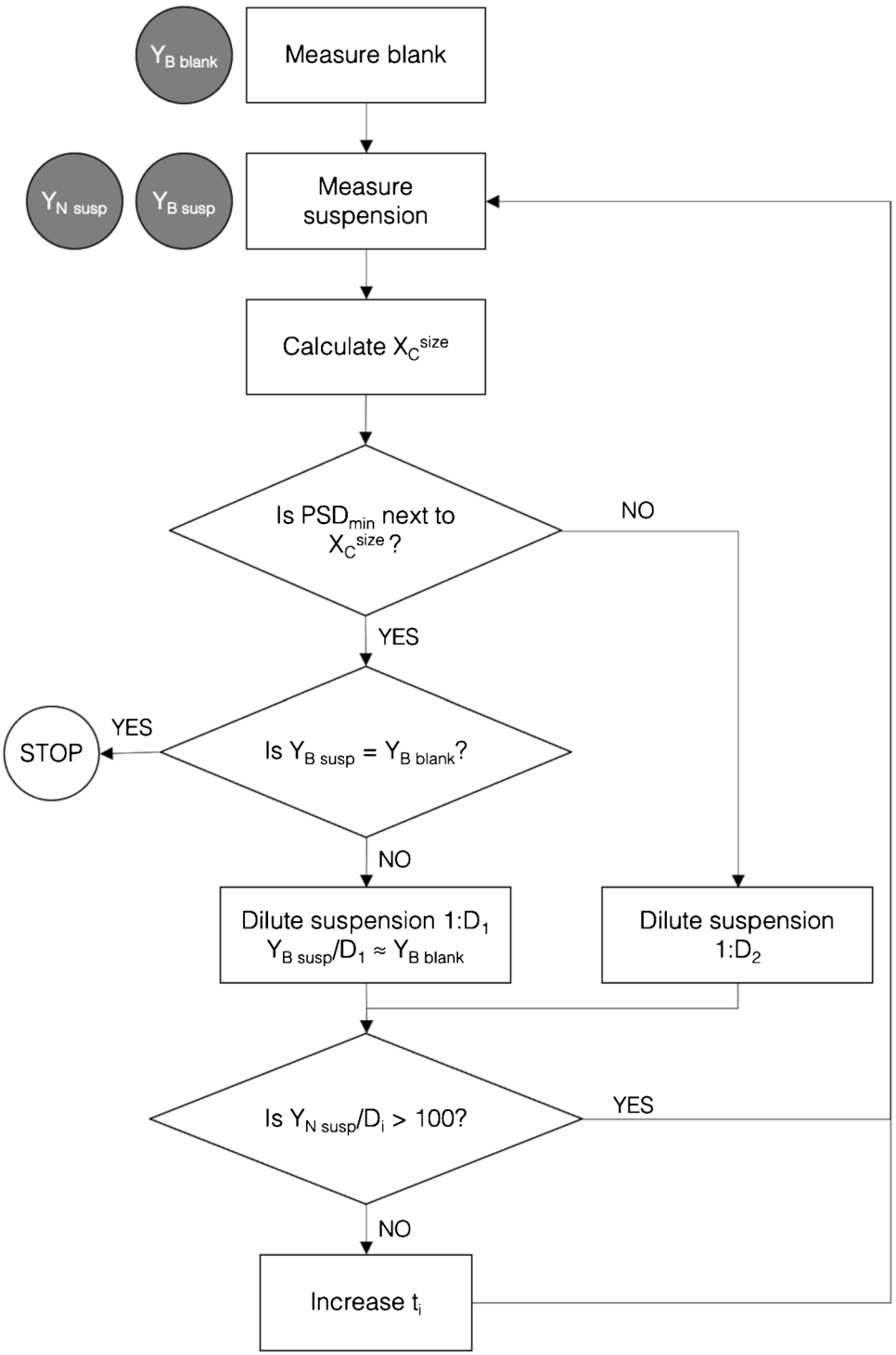


Fig. 2 Flow chart for the trueness assessment of the information provided by SP-ICP-MS. Y_{Bblank}: mean baseline intensity of the blank. Y_{Bsusp}: mean baseline intensity of the suspension. Y_{Nsusp}: number of particle events of the suspension. X_C^{size}: size critical values. t_i: total acquisition time. D_1 and D_2: dilution factors. PSD_{min}: minimum size of the particle size distribution

presence of dissolved species, whose effect can be eliminated by dilution, whereas the second one corresponds to a situation where the baseline level in the sample is similar to that in a blank.

With respect to the first case, Table 3 summarizes the steps followed for the assessment of the information obtained from a suspension containing 40 nm silver nanoparticles and 2.6 µg L^{-1} of ionic silver. Critical values reported in Table 3 cannot be compared to those in Table 2 because they were obtained under different sensitivity conditions. Due to the presence of dissolved silver, the actual size critical value in this suspension was 34 nm, which was higher than the lower end of the original size distribution shown in Fig. 1 (ca. 25 nm), and hence the nanoparticles detected accounted

Table 3 Mean size and number concentration of nanoparticles, size critical values (X_C^{size}), and nanoparticle recovery for 40 nm silver nanoparticle suspension spiked with 2.6 µg L^{-1} of ionic silver and analyzed at different dilutions and total acquisition times. Dwell time: 100 µs. Mean ± standard deviation ($n = 3$)

Suspension	Acquisition time s	Mean baseline intensity counts	X_C^{size} nm	Mean size nm	Number of events	Number concentration L^{-1}	Recovery %
40 nm AgNPs	60	0.1	14.4	38.0 ± 0.2	3085 ± 26	$1.45 \times 10^8 \pm 0.01 \times 10^8$	100 ± 2
40 nm AgNPs + 2.6 µg L^{-1} Ag(I)	60	27	34.2	46.1 ± 0.3	968 ± 40	$4.56 \times 10^7 \pm 0.02 \times 10^8$	15 ± 1
1:50 dilution	300	0.4	18.1	38.0 ± 0.3	511 ± 16	$1.92 \times 10^8 \pm 0.06 \times 10^8$	80 ± 3
1:125 dilution	300	0.2	16.4	37.6 ± 0.2	244 ± 10	$2.7 \times 10^8 \pm 0.1 \times 10^8$	98 ± 4
1:250 dilution	300	0.1	14.4	36.7 ± 1.0	136 ± 10	$3.1 \times 10^8 \pm 0.2 \times 10^8$	103 ± 4

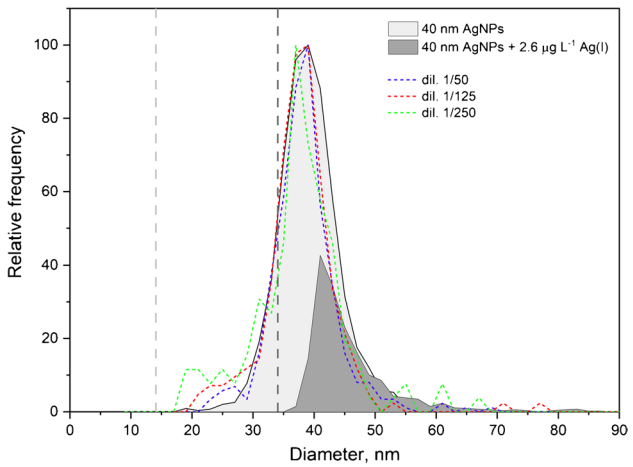


Fig. 3 Size distributions of 40 nm silver nanoparticle suspensions, unspiked (light gray) and spiked with 2.6 µg L^{-1} of ionic silver (dark grey), and dilutions of this latter sample. Grey dashed lines: size critical values. Dwell time: 100 µs

for just 15% of the actual distribution. Therefore, a 1:50 dilution was applied to reduce the baseline intensity and the size critical value, although the acquisition time had to be increased from 60 to 300 s to increase the number of events recorded over 100. Under such conditions, the size critical value was reduced to 18 nm, increasing the nanoparticle recovery to 80%. A 1:125 dilution allowed to reduce the baseline intensity close to blank levels (0.2 vs. 0.1 mean counts of baseline), corresponding to a size critical value of 16 nm, which was clearly smaller than the lower end of the distribution (ca. 25 nm), so the complete size distribution could be obtained with quantitative recovery of the nanoparticles. To confirm these results, the last dilution was further diluted 1:2 (up to 1:250 from the original suspension), showing good agreement between both. With respect to the size distributions obtained, Fig. 3 shows that the information from the original suspension was clearly biased, reporting an apparently complete distribution of silver nanoparticles from 35 nm, which only corresponded to the tail of the actual distribution. The successive dilutions showed a fair agreement between them, although the low number of events recorded for the highest dilutions involves a lower precision due to counting statistics.

In the case discussed above, the main contribution to the baseline was due to the dissolved element and dilution allowed to improve size critical values as a consequence, detecting the whole nanoparticle distribution over such critical value. However, when the baseline intensity is negligible (or constant due to plasma polyatomic interferences), size critical values cannot be further improved by dilution. Table 4 shows the effect of dilution on suspensions of 50 nm gold nanoparticles measured at 5 ms and 100 µs dwell times under conditions that provided size critical values lower than the PSD_{min} (11 nm in both cases) or much higher (42 and 34 nm, respectively). This was accomplished by modifying the deflector voltage of the focusing quadrupole of the ICP-MS to reduce the transmission of ions to the mass spectrometer and hence the overall sensitivity. Under such conditions, the recovery of all the dilutions was quantitative, in spite of the nanoparticle distribution recorded under low sensitivity conditions accounted for 78–80% and 63% of the original one at 5 ms and 100 µs, respectively. Whereas the low recoveries achieved at 5 ms were evident from the profile of the distributions recorded (Fig. 4a), this was not the case when working at 100 µs (Fig. 4b) as expected from the behavior presented in the previous section. The direct consequence of these results is that confirmatory measurements based on the dilution of a suspension are no longer valid when the baseline level in the suspension measured is close to that in a blank and the lower limit of the size distribution is similar to the size critical value. Under such conditions, the flow chart in Fig. 2 leads to a STOP and implies that results obtained cannot be confirmed and most probably the suspension contains nanoparticles below the size critical value that have not been recorded. Under such conditions, results must be considered only qualitative or semiquantitative.

Table 4 Mean size and number concentration of nanoparticles, size critical values (X_C^{size}), and nanoparticle recovery for 50 nm gold nanoparticles at different sensitivities and dwell times of 5 ms and 100 µs. Total acquisition time: 60 s. Mean ± standard deviation ($n = 3$)

Suspension	Mean baseline intensity counts	X_C^{size} nm	Mean size nm	Number of events	Number concentration L^{-1}	Overall recovery %	Dilution recovery %
Dwell time: 5 ms							
50 nm AuNPs	0.1	10.6	48.5 ± 0.4	380 ± 17	$1.90\times10^7 \pm 0.08\times10^7$		
1:2 dilution	0.1	10.6	47.1 ± 0.7	187 ± 9	$1.89\times10^7 \pm 0.09\times10^7$		100 ± 5
50 nm AuNPs (low sensitivity)[a]	0.0	41.6	50.4 ± 0.5	296 ± 20	$1.48\times10^7 \pm 0.10\times10^7$	78 ± 5	
1:2 dilution	0.0	41.6	49.2 ± 0.6	149 ± 7	$1.51\times10^7 \pm 0.07\times10^7$	80 ± 4	102 ± 5
Dwell time: 100 µs							
50 nm AuNPs	0.0	10.9	48.3 ± 0.3	1770 ± 24	$8.68\times10^7 \pm 0.12\times10^7$		
1:2 dilution	0.0	10.9	47.9 ± 0.1	861 ± 37	$8.57\times10^7 \pm 0.37\times10^7$		99 ± 4
50 nm AuNPs (low sensitivity)[b]	0.0	33.9	48.9 ± 0.1	1119 ± 40	$5.49\times10^7 \pm 0.20\times10^7$	63 ± 2	
1:2 dilution	0.0	33.9	48.6 ± 0.4	541 ± 35	$5.39\times10^7 \pm 0.35\times10^7$	63 ± 4	98 ± 6

[a]Sensitivity reduced to 2%

[b]Sensitivity reduced to 3%

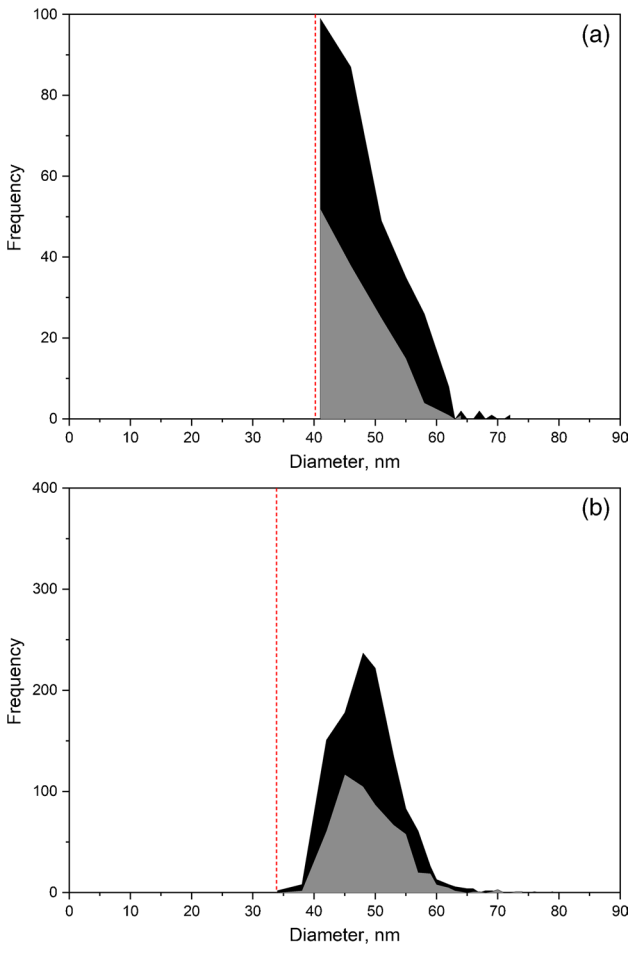


Fig. 4 Size distributions of a 50 nm gold nanoparticle suspension (black area) and a 1:2 dilution (grey area) under low sensitivity conditions at (**a**) 5 ms and (**b**) 100 µs dwell times. Red dashed line: size critical value

Application to the analysis of antimicrobial nanomaterials

Two antimicrobial nanomaterials (M1 and M2), presented as aqueous suspensions containing silver nanoparticles, were subjected to analysis by SP-ICP-MS. The original suspensions had a silver content of 143 ± 4 and 736 ± 25 mg L^{-1}, respectively, determined by atomic absorption spectrometry (AAS). Additional preliminary analyses showed that the suspensions contained silver nanoparticles, although also had a significant content of dissolved silver. Both suspensions were dilute down to around $1{:}10^7$ to reduce the contribution of the dissolved silver to blank levels, following the procedure described in Fig. 2. In the case of the analysis of M1, the total acquisition time had to be increased up to 5 min to record a significant number of particle events. Figure 5 shows the size distributions obtained for both nanomaterials for two succesive dilutions. The recorded distributions were in the range of ca. 20–60 nm, with mean diameters of 20–25 nm (Table 5). The size critical values calculated from the measured baselines were in the range of 8–15 nm, corresponding to the lower ends of the recorded distributions and hence indicating that part of the original size distributions would had been omitted. In addition, the differences observed in the number concentrations obtained for the two successive dilutions of the suspensions shown in Table 5 also suggest the partial recording of the original distributions.

Both nanomaterials were also analyzed by HDC-ICP-MS and electron microscopy (FESEM and TEM) for their detailed characterization. HDC allowed the simultaneous separation and the direct quantification of nanoparticulate

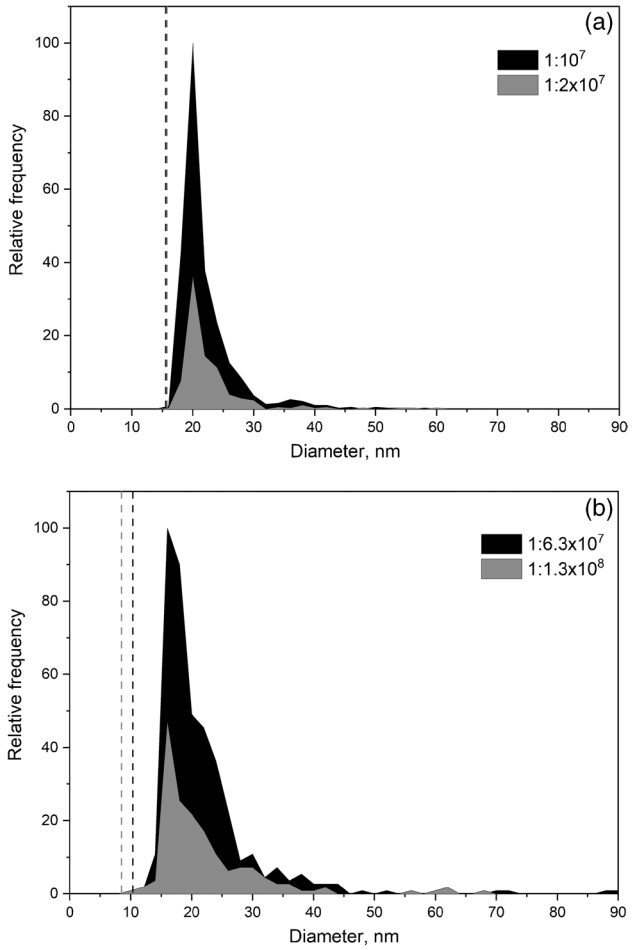


Fig. 5 Size distributions of antimicrobial nanomaterials (**a**) M1 at $1{:}10^7$ (black) and $1{:}2\times10^7$ (grey) dilutions; (**b**) M2 at $1{:}6.3\times10^7$ (black) and $1{:}1.3\times10^8$ (grey) dilution. Dwell time: 100 µs. Dashed lines: size critical values at the corresponding dilution

and dissolved forms of silver [23]. Figure S2 shows the chromatograms corresponding to both nanomaterials, showing a first peak corresponding to nanoparticles of 10–11 nm and a second one to the dissolved silver. The mass concentration of silver nanoparticles and dissolved silver determined by HDC-ICP-MS is summarized in Table 5, accounting for 29 and 71%, respectively, in both samples. On the other hand, the total silver quantified by HDC-ICP-MS was in agreement with the total contents measured by AAS (recoveries of 97 and 101% in M1 and M2, respectively). Electron microscopy was used to visualize the nanoparticles in the samples to obtain information concerning their size and shape. Figures S3 and S4 show the FESEM and TEM images obtained from the samples, as well as the size distributions obtained by measuring around 400 particles per sample. The mean sizes and the standard deviations of the size distributions are summarized in Table 5. The apparent bias beetwen TEM and FESEM results can be justified by the fact that the smallest

Table 5 Mean size and number/mass concentration information of antimicrobial nanomaterials analyzed by SP-ICP-MS, HDC-ICP-MS, AAS, FESEM, and TEM. Mean ± standard deviation ($n=3$ replicates for SP-ICP-MS, HDC-ICP-MS, and AAS; $n=$ca. 400 particles for FESEM and TEM)

Nanomaterial		SP-ICP-MS					HDC-ICP-MS			AAS	FESEM	TEM
							Ag NPs	Ag(I)		Total Ag		
	Dilution	Acquisition time s	Mean baseline intensity counts	X_C^{size} nm	Mean size nm	Number of events	Number concentration L^{-1}	Mean size nm	Mass concentration mg L^{-1}	Mass concentration mg L^{-1}	Mean size nm	Mean size nm
M1	$1{:}10^7$	300	0.13	15.3	19.6 ± 0.9	917 ± 40	$8.2\times10^{13}\pm0.4\times10^{13}$	10 ± 2	43 ± 5	104 ± 5	17 ± 9	9 ± 3
	$1{:}2\times10^7$	300	0.09	15.3	20.1 ± 1.1	316 ± 25	$5.6\times10^{13}\pm0.4\times10^{13}$					
M2	$1{:}6.3\times10^7$	60	0.07	10.3	24.1 ± 0.6	465 ± 27	$1.3\times10^{15}\pm0.1\times10^{15}$	12 ± 2	213 ± 14	515 ± 46	29 ± 10	15 ± 8
	$1{:}1.3\times10^8$	60	0.04	8.2	24.5 ± 1.0	175 ± 19	$9.5\times10^{14}\pm1.0\times10^{14}$					

particles were not visible in FESEM, because their sizes were below the resolution limit and led to measure only the bigger particles, biasing the average size to higher diameters; furthermore, TEM image selection for observations tends to benefit the areas with small particles.

The results summarized in Table 5 show that both nanomaterial suspensions contained silver nanoparticles of ca. 10–15 nm together with dissolved silver in higher proportions, making difficult the detection and characterization of the nanoparticles by SP-ICP-MS. In fact, the size critical values achieved after dilution were similar to the mean sizes of the nanoparticles, which justifies the overestimation of the sizes measured by SP-ICP-MS. On the other hand, the affirmation that in view of the distributions shown in Fig. 5, smaller nanoparticles have not been detected is totally justified, confirming the validity of the approach proposed.

Conclusions

Unlike conventional analytes, whose detection only requires to be at concentrations above their (concentration) limit of detection, nanoparticles must be larger than the size critical value. As a consequence, and because nanoparticles occur as polydisperse size distributions, if the whole population of particles is not detected, the quantitative information derived from these measurements will overestimate the mean size of the nanoparticles and underestimate their number concentration. In such circumstances, the validity of the "quantitative" information provided is questionable and only qualitative/semiquantitative information should be reported in the form of "the sample contains (nano)particles bearing certain element" or "the sample contains (nano)particles over a certain size and number concentration bearing certain element." The proposed approach, based on successive dilutions and estimation of the size critical values in a systematic way, adds a quality control procedure to confirm the quantitative information if the size distribution recorded is over the size critical value estimated in the sample under study, otherwise the information should be considered only qualitative or semiquantitative.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1007/s00216-022-04215-z.

Acknowledgements K. B.-J. thanks funding from the EU Horizon 2020 programme under the Marie Sklowdowska-Curie grant agreement no. 801586. A.C.G. thanks the Government of Aragon (DGA) for a predoctoral contract. The authors would like to acknowledge the use of Servicio General de Apoyo a la Investigación-SAI, Universidad de Zaragoza, and thank Laboratorios Enosan S.L. for providing the antimicrobial nanomaterials.

Funding Open Access funding provided thanks to the CRUE-CSIC agreement with Springer Nature. This work was supported by the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities and the European Regional Development Fund, project RTI2018-096111-B-I00 (MICINN/FEDER), the Government of Aragon (E29_20R), and Iberus Talent Programme.

Declarations

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

References

1. Mozhayeva D, Engelhard C. A critical review of single particle inductively coupled plasma mass spectrometry—a step towards an ideal method for nanomaterial characterization. J Anal At Spectrom. 2020;35:1740–83. https://doi.org/10.1039/C9JA00206E.
2. Laborda F, Bolea E, Jiménez-Lamana J. Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry for the analysis of inorganic engineered nanoparticles in environmental samples. Trends Environ Anal Chem. 2016;9:15–23. https://doi.org/10.1016/j.teac.2016.02.001.
3. Hineman A, Stephan C. Effect of dwell time on single particle inductively coupled plasma mass spectrometry data acquisition quality. J Anal At Spectrom. 2014;29:1252–7. https://doi.org/10.1039/C4JA00097H.
4. Shaw P, Donard A. Nano-particle analysis using dwell times between 10 µs and 70 µs with an upper counting limit of greater than 3×10^7 cps and a gold nanoparticle detection limit of less than 10 nm diameter. J Anal At Spectrom. 2016;31:1234–42. https://doi.org/10.1039/C4JA00097H.
5. Borovinskaya O, Hattendorf B, Tanner M, Gschwind S, Günther D. A prototype of a new inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometer providing temporally resolved, multi-element detection of short signals generated by single particles and droplets. J Anal At Spectrom. 2013;28:226–33. https://doi.org/10.1039/C2JA30227F.
6. Laborda F, Gimenez-Ingalaturre AC, Bolea E, Castillo JR. Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry as screening tool for detection of particles. Spectrochim Acta Part B At Spectrosc. 2019;159:105654. https://doi.org/10.1016/j.sab.2019.105654.
7. Loosli F, Wang J, Sikder M, Afshinnia K, Baalousha M. Analysis of engineered nanomaterials (Ag, CeO_2 and Fe_2O_3) in spiked surface waters at environmentally relevant particle concentrations. Sci Total Environ. 2020;715:136927. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136927.
8. Abdolahpur Monikh F, Chupani L, Zusková E, Peters R, Vancová M, Vijver MG, et al. Method for extraction and quantification of metal-based nanoparticles in biological media: number-based

biodistribution and bioconcentration. Environ Sci Technol. 2019;53:946–53. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b03715.
9. Salou S, Cirtiu C, Larivière D, Fleury N. Assessment of strategies for the formation of stable suspensions of titanium dioxide nanoparticles in aqueous media suitable for the analysis of biological fluids. Anal Bioanal Chem. 2020;412:1469–81. https://doi.org/10.1007/s00216-020-02412-2
10. Torrent L, Iglesias M, Hidalgo M, Marguí E. Determination of silver nanoparticles in complex aqueous matrices by total reflection X-ray fluorescence spectrometry combined with cloud point extraction. J Anal At Spectrom. 2018;33:383–94. https://doi.org/10.1039/C7JA00335H.
11. Verleysen E, Waegeneers N, Brassinne F, De Vos S, Jimenez IO, Mathioudaki S, et al. Physicochemical characterization of the pristine E171 food additive by standardized and validated methods. Nanomaterials. 2020;10:592. https://doi.org/10.3390/nano10030592
12. 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;266:133–45. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.107.
13. Wang JL, Alasonati E, Tharaud M, Gelabert A, Fisicaro P, Benedetti MF. Flow and fate of silver nanoparticles in small French catchments under different land-uses: the first one-year study. Water Res. 2020;176. 115722. https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115722.
14. Laborda F, Gimenez-Ingalaturre AC, Bolea E, Castillo JR. About detectability and limits of detection in single particle inductively coupled plasma mass spectrometry. Spectrochim Acta Part B At Spectrosc. 2020;169:105883. https://doi.org/10.1016/j.sab.2020.105883.
15. Geiss O, Bianchi I, Senaldi C, Bucher G, Verleysen E, Waegeneers N, et al. Particle size analysis of pristine food-grade titanium dioxide and E 171 in confectionery products: interlaboratory testing of a single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry screening method and confirmation with transmission electron microscopy. Food Control. 2021;120:107550. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107550.
16. Felinger A, Guiochon G. Validation of a chromatography data analysis software. J Chromatogr A [Internet]. 2001;913:221–31. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00979-1.
17. Cornelis G, Hassellöv M. A signal deconvolution method to discriminate smaller nanoparticles in single particle ICP-MS. J Anal At Spectrom. 2014;29:134–44. https://doi.org/10.1039/C3JA50160D.
18. Strenge I, Engelhard C. Capabilities of fast data acquisition with microsecond time resolution in inductively coupled plasma mass spectrometry and identification of signal artifacts from millisecond dwell times during detection of single gold nanoparticles. J Anal At Spectrom. 2016;31:135–44. https://doi.org/10.1039/C5JA00177C.
19. Tuoriniemi J, Cornelis G, Hassellöv M. A new peak recognition algorithm for detection of ultra-small nano-particles by single particle ICP-MS using rapid time resolved data acquisition on a sector-field mass spectrometer. J Anal At Spectrom. 2015;30:1723–9 https://doi.org/10.1039/C5JA00113G.
20. Mozhayeva D, Engelhard C. A quantitative nanoparticle extraction method for microsecond time resolved single-particle ICP-MS data in the presence of a high background. J Anal At Spectrom. 2019;34:1571–80 https://doi.org/10.1039/C9JA00042A.
21. Lockwood TE, de GonzalezVega R, Clases D. An interactive Python-based data processing platform for single particle and single cell ICP-MS. J Anal At Spectrom. 2021;36:2536–44 https://doi.org/10.1039/D1JA00297J.
22. Hadioui M, Peyrot C, Wilkinson KJ. Improvements to single particle ICPMS by the online coupling of ion exchange resins. Anal Chem. 2014;86:4668–74 https://doi.org/10.1021/ac5004932.
23. Jiménez MS, Bakir M, Isábal D, Gómez MT, Pérez-Arantegui J, Castillo JR, et al. Evaluation of hydrodynamic chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry for speciation of dissolved and nanoparticulate gold and silver. Anal Bioanal Chem. 2021;413:1689–99. https://doi.org/10.1007/s00216-020-03132-3.
24. Laborda F, Trujillo C, Lobinski R. Analysis of microplastics in consumer products by single particle-inductively coupled plasma mass spectrometry using the carbon-13 isotope. Talanta. 2021;221:121486. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121486.
25. Laborda F, Jiménez-Lamana J, Bolea E, Castillo JR. Critical considerations for the determination of nanoparticle number concentrations, size and number size distributions by single particle ICP-MS. J Anal At Spectrom. 2013;28:1220–32 https://doi.org/10.1039/C3JA50100K.
26. Schwertfeger DM, Velicogna JR, Jesmer AH, Scroggins RP, Princz JI. Single particle-inductively coupled plasma mass spectroscopy analysis of metallic nanoparticles in environmental samples with large dissolved analyte fractions. Anal Chem. 2016;88:9908–14. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02716.
27. Aznar R, Barahona F, Geiss O, Ponti J, José Luis T, Barrero-Moreno J. Quantification and size characterisation of silver nanoparticles in environmental aqueous samples and consumer products by single particle-ICPMS. Talanta. 2017;175:200–8. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.048.
28. Currie LA. Limits for qualitative detection and quantitative determination. Application to radiochemistry. Anal Chem. 1968;40:586–93 https://doi.org/10.1021/ac60259a007.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Journal of Microbiological Methods 203 (2022) 106618

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmeth

Contribution to optimization and standardization of antibacterial assays with silver nanoparticles: the culture medium and their aggregation

Ana C. Gimenez-Ingalaturre [a], Encarnación Rubio [b,c,*], Patricia Chueca [b,c], Francisco Laborda [a], Pilar Goñi [b,c]

[a] Group of Analytical Spectroscopy and Sensors (GEAS), Institute of Environmental Sciences (IUCA), University of Zaragoza, C/ Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza, Spain
[b] Department of Microbiology, Pediatrics, Radiology and Public Health, Faculty of Medicine, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain
[c] Group of Water and Environmental Health, Institute of Environmental Sciences (IUCA), C/ Domingo Miral s/n, 50009 Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Silver nanoparticles
Antibacterial effect
Culture media
Aggregation
Surfactant

ABSTRACT

The antimicrobial activity of silver nanoparticles is determined by their size and specific properties, as well as by the chemical composition of the exposure medium in which the nanoparticles are suspended. When the antibacterial tests are carried out in a culture medium, aggregation of the nanoparticles is produced, decreasing their effectiveness. This study proposes the addition of surfactants to the culture medium to prevent the aggregation of silver nanoparticles and optimizes the concentrations of these surfactants. The aggregation of silver nanoparticles was studied by dynamic light scattering (DLS) after dispersion in three liquid culture media (Mueller-Hinton (MH), Luria-Bertani (LB) and Brain Heart Infusion) in which four different surfactants (SDS, Triton X100, Tween 80 and CTAB) were added at concentrations of 0, 0.1, 0.5, 1, 1.5 and 2%. Results showed that, the optimal culture media to prevent aggregation of silver nanoparticles were MH and LB with higher concentrations of Tween 80 and Triton X100 surfactants; being MH + 2% of Tween 80 and MH + 1% Triton X100 the best combinations obtained because the results obtained were closest to the sizes of nanoparticles in ultrapure water. In addition, it has been verified that the optimal medium + surfactant combinations chosen did not affect the viability of *Escherichia coli* bacteria. Nanoparticle aggregation was not observed by single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS) when nanoparticles were incubated for long incubations periods (24 h) in the optimal medium chosen.

1. Introduction

Due to the worldwide increase of multidrug resistance in microorganisms, silver nanoparticles are increasingly used for their antibacterial properties in many applications, for example, in medicine to reduce infections in burn treatments or to prevent bacteria colonization on protheses or catheters, to eliminate microorganisms on textile fabrics or for water treatment (Pal et al., 2007; Panáček et al., 2006; Hartemann et al., 2015). Silver has been known for thousands of years for its broad spectrum of bactericidal activity, mainly in the form of ionic silver, to fight infections and control spoilage, but it has been demonstrated that its substitution in the nanoparticle form may have additional advantages (Fernández et al., 2010; Marambio-Jones and Hoek, 2010; Gunawan et al., 2017).

The antimicrobial activity of colloid silver particles is influenced by size and specific properties such as shape, chemical composition, surface charge, coatings… (Rai et al., 2012). Silver nanoparticles with smaller sizes had a greater antimicrobial effect against different gram-negative

Abbreviations: AgNPs, Silver nanoparticles; Al_2O_3, Aluminum oxide; BHI, Brain heart infusion; $CaCl_2$, Calcium chloride; CFU, Colony-forming unit; CTAB, Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide; DLS, Dynamic light scattering; *E. coli*, *Escherichia coli*; ICP-MS, Inductively coupled plasma mass spectrometry; LB, Luria-Bertani; $MgCl_2$, Magnesium chloride; MH, Mueller-Hinton; NaCl, Sodium chloride; nm, Nanometers; p, p-value; PVP, Polyvinylpyrrolidone; SD, Standard deviation; SDBS, Sodium dodecyl benzene sulfonate; SDS, Sodium dodecyl sulfate; SiO_2-NPs, Silicon dioxide nanoparticles; SP-ICP-MS, Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry; TiO_2, Titanium dioxide; ZnO-NPs, Zinc nanoparticles; ZrO_2, Zirconium dioxide; ZrO_2-NPs, Zirconium dioxide nanoparticles; ν, Kinematic viscositiy; ρ, Densitiy.

* Corresponding author at: University of Zaragoza, Faculty of Medicine, C/ Domingo Miral sn, 50009 Zaragoza, Spain.
E-mail address: erubio@unizar.es (E. Rubio).

https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106618
Received 19 September 2022; Received in revised form 4 November 2022; Accepted 4 November 2022
Available online 8 November 2022
0167-7012/© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

bacteria (Morones et al., 2005; Baker et al., 2005). Moreover, the chemical composition of exposure media (pH, ionic strength, ionic composition, presence of natural organic matter) is also a relevant factor that would affect the toxicity of AgNPs (Millour et al., 2015; Vazquez-Muñoz et al., 2020; Bélteky et al., 2021).

For years, extensive research has been done on the antibacterial activity of silver nanoparticles and about how to improve their activity by controlling some properties such as the nanoparticle size (Agnihotri et al., 2014). It has been reported that the biological media (Stebounova et al., 2011) and their components could affect the size of the nanoparticles or their rate of dissolution (Pareek et al., 2018; Huynh and Chen, 2011; Li et al., 2010). Millour et al. (Millour et al., 2015) showed that the presence of salts like NaCl, $CaCl_2$ or $MgCl_2$, which are present in culture media, produces the aggregation of silver nanoparticles; as the presence of organic matter in complex media, such as tryptone or yeast extract, modifies the rate of aggregation in these culture media. In an extensive study performed by Vazquez-Muñoz et al. (Vazquez-Muñoz et al., 2020), in 2020, on the influence of the culture media on the antimicrobial activity of silver nanoparticles, they determined that the values of the minimal inhibitory concentration of silver nanoparticles against *Escherichia coli* changed up to two orders of magnitude by the influence of the composition of the culture medium. In some culture media, aggregation of silver nanoparticles is promoted so that their size increases up to 3 times.

The effect of different surfactants and polymers on the stability and aggregation of nanoparticles in aqueous media has been analyzed. For water-dispersed nanoparticles, the addition of anionic surfactants such as sodium dodecyl sulfate (SDS) (Yekeen et al., 2019) or sodium dodecyl benzene sulfonate (SDBS) (Yekeen et al., 2019; Ordóñez et al., 2020; Tran et al., 2022) decreases the sizes of nanoparticles. The presence of non-ionic surfactants such as Triton X100 (Yekeen et al., 2019; Tran et al., 2022) or PVP (Ordóñez et al., 2020) also contributes to obtain smaller sizes of nanoparticles. On the contrary, the addition of cationic surfactants such as Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) (Yekeen et al., 2019; Ordóñez et al., 2020; Tran et al., 2022), does not prevent the nanoparticle aggregation. Kvítek et al. (Kvítek et al., 2008) showed that SDS, Tween 80 (non-ionic surfactant) and PVP were the most effective surfactants in preventing the nanoparticle aggregation in water. In addition, the presence of SDS and Tween 80 in water, did not modify the antibacterial properties of the silver nanoparticles, whereas the presence of PVP reduced these properties. Later, when the contact between nanoparticles and bacteria was established in a culture medium to study their antibacterial activity, the stabilizing effect of the surfactant on the nanoparticles can change. The components of the culture media matrix and the added surfactants could modify the stability of the nanoparticles and their ability to aggregate, and consequently, their interaction with the bacteria. Therefore, the standardization of methodology is very important, allowing comparison of results obtained by different authors.

In this study, the addition of surfactants to the culture medium is proposed as a solution to the problem of nanoparticle aggregation in the evaluation of the antibacterial effect of silver nanoparticles. For this purpose, four different surfactants (SDS, Triton X100, Tween 80 and CTAB) dispersed in three culture media (Mueller-Hinton, Luria-Bertani and Brain Heart Infusion) have been evaluated to prevent the aggregation of silver nanoparticles. Aggregation of silver nanoparticles was studied by dynamic light scattering analysis (DLS) in short-term experiments and by single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS) for long incubation periods. *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Escherichia coli* K12 strain J62 were used as reference bacteria to study the effect surfactants on the viability of bacteria.

2. Experimental

2.1. Culture media

Three liquid culture media were studied: brain heart infusion (BHI) (Difco, Detroit, USA), Mueller-Hinton (MH) (Scharlau, Scharlab SL, Spain) and Luria-Bertani (LB) (Labkem, Labbox.com). Four surfactants at different concentrations were added to culture media (0, 0.1, 0.5, 1, 1.5 and 2%). Surfactants tested were Tween 80, Triton X-100, SDS and CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). The control sample contained a suspension of the tested nanoparticles in ultrapure water (Milli-Q Advantage, Molsheim, France). All assays were performed in triplicate.

The mixtures of culture media + surfactants were autoclaved for 20 min at 121 °C at 1 atm. These culture media were stored at 4 °C until use.

2.2. Nanoparticle suspensions

Nanoparticles used were a suspension of monodisperse citrate-stabilized silver nanoparticles of nominal diameter 60 ± 7 nm (NanoComposix, San Diego, CA, USA). The commercially available suspension of silver nanoparticles, after 1 min sonication, was diluted in the different sterile culture media to obtain a final concentration of 2 mg L^{-1}. After dilution and before each analysis, the diluted suspensions were sonicated for 1 min and 50 W in an ultrasonic bath (Ultrasons, J.P. Selecta, Barcelona, Spain). Longer sonication times were not used to avoid excessive heating of the suspensions. The control sample consisted of a suspension of nanoparticles in ultrapure water at the same final concentration.

2.3. Cell culture

For the bacteria assays, two *Escherichia coli* strains were used, *E. coli* ATCC 25922 and *E. coli* K12 strain J62 (F^-, *pro, his, trp, lac, Nal*^{r}) (Gomez-Lus et al., 1990; Hane and Wood, 1969). The strains were cultured on Mueller-Hinton agar at 37 °C for 24 h, and stored at −80 °C in sterile skimmed milk.

2.4. Procedures

2.4.1. Density and viscosity measurements of culture media

Densities (ρ) of culture media with and without surfactants were measured at 25 °C with an Anton Paar DSA 5000 vibrating tube densimeter. The standard uncertainty for temperature was 0.005 K and the uncertainty of density can be estimated in 10^{-4} g cm^{-3}.

Kinematic viscosities (ν) were determined at 25 °C using an Ubbelohde capillary viscometer and a measuring unit Schott-Geräte AVS-440. The temperature was controlled with a CT52 Schott-Geräte thermostat. The standard uncertainty for temperature was 0.01 K and the uncertainty for kinematic viscosities was 0.005 mm^2 s^{-1}. Dynamic viscosities, $\eta = \rho\nu$, were obtained from experimental kinematic viscosities and densities. The estimated uncertainty for dynamic viscosities was 0.005 mPa s.

2.4.2. Dynamic Light Scattering (DLS) measurements

Sonicated stock suspension of silver nanoparicles was added to each media of study to obtain a final concentration of 2 mg L^{-1}.

The hydrodynamic size of nanoparticles was characterized by a DLS instrument (Zetasizer Nano ZS, ZEN3600, Malvern, Worcestershire, United Kingdom) equipped with a flow cell (ZEN 0023). All the measurements were performed at 25.0 °C. Signal intensity and hydrodynamic diameter estimations were collected every 3 s.

2.4.3. Viability assays

Ten microliters of a 0.5 McFarland Turbidity Standard bacterial suspension were added to 90 μL of culture medium in a 96-well flat-

bottomed microtiter plate (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) and incubated for 24 h at 37 °C. Afterwards, 10 μL of each combination were seeded on a Petri dish containing MacConkey agar (McK, Bio-Rad, La Coquette, France) and incubated at 37 °C for 24 h.

For those combinatios in which differences in growth were observed in relation to the culture media without surfactants, 10 μL of a 1:100 dilution of the combinations were spread plated on MacConkey agar. The plates were incubated at 37 °C for 24 h. Then the numbers of bacterial colonies (CFU) were counted. The counts were considered the surviving number of bacteria. Analyses were carried out in triplicate.

Those culture media in which no differences were observed in relation to the culture media without surfactants, for both bacterial strains, were chosen as optimal culture media, interpreting that the viability of the bacteria was not affected by surfactants. In addition, to select the optimal culture medium for subsequent SP-ICP-MS measurements, another critical criterion was the similar nanoparticle size obtained in this medium and in ultrapure water.

2.4.4. Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS) measurements

Dilutions of the stock suspension of silver nanoparticles were prepared in the chosen optimal culture medium by accurately weighing (±0.1 mg) aliquots after 1 min sonication. Silver nanoparticles were incubated at 37 °C for 24 h and shaken at 130 rpm in an orbital incubator (OPAQ I10-OE, Ovan).

A Perkin-Elmer NexION 2000 ICP mass spectrometer (Toronto, Canada) was used throughout. The sample introduction system consisted of a glass concentric slurry nebulizer and a cyclonic spray chamber (Glass Expansion, Melbourne, Australia). Suspensions were measured in single particle mode using the Syngistix Nano-Application module version 2.5 (PerkinElmer Inc.). The dwell time used was 100 μs with a total acquisition time of 60s and recording 600,000 readings per time scan. The isotope monitored was ^{107}Ag.

2.4.5. Statistical analysis

All statistical analysis were performed using SPSS 26.0 (SPSS Corp., Armonk, NY USA). Variables were described with mean, standard deviation (SD) and variation coefficient. The Shapiro-Wilk test was used to verify that the distributions were normal. Analysis of variance (ANOVA) of one factor was used for the comparison between the methods of detection used for each culture media; if the distributions were not homoscedastic, Welch correction was carried out. Pair-wise comparisons were carried out with the Sidak correction if the distributions were homoscedastic (Levene test, $p > 0,05$) and Games-Howel if the distributions were not homoscedastic. Finally, t-student test was used to check if there were significant differences between the two best results obtained. The level of significance required in all the analyzes performed was <0.05.

3. Results and discussion

3.1. Influence of media composition on the nanoparticle size

Nanoparticle size is a determining factor in the interaction process bewteen nanoparticles and bacteria, because the larger the nanoparticle size, the more difficult it will be for them to enter to the bacteria. Therefore, the aggregation of nanoparticles in culture media is one of the main problems in the study of their activity against microorganisms.

Due to this, hydrodynamic sizes of silver nanoparticles diluted in different culture media were measured by DLS to determine the optimal composition of culture medium that allows to keep the original size of nanoparticles.

The most frequently used culture media for the growth of enterobacteria were selected for the study, Mueller-Hinton (MH) (Acay et al., 2019; Panáček et al., 2016; Gurunathan, 2015), Luria-Bertani (LB) (El-Kheshen and El-Rab, 2012; Sadeghi et al., 2010; Abbaszadegan et al., 2015; Morones-Ramirez et al., 2013) and brain heart infusion (BHI) (Toledo et al., 2020; Ravichandran et al., 2011; Callon et al., 2016). Because nanoparticle aggregation was observed in initial experiments, each one of them was mixed with different surfactant types, which were Tween 80, Triton X110 (non-ionic surfactants), SDS (anionic surfactant) and CTAB (cationic surfactant).

Table S1 shows experimental values of density, kinematic and dinamic viscosity obtained for each one of the culture media used in the determination of the hydrodynamic sizes by DLS.

Table 1 shows experimental hydrodynamic sizes of silver nanoparticles spiked in the three culture media with different types and concentrations of surfactants. The hydrodynamic size obtained for silver nanoparticles of 60 nm diluted in ultrapure water was 68.5 ± 3.2 nm, which agrees with the size certified by the supplier that was 64 nm. Thus, nanoparticles in water were used as a control sample.

As can be seen in Table 1, nanoparticle aggregation occurs in all media without surfactants. Certain concentrations of Triton X100, Tween 80 and SDS contributed to prevent aggregation, since as can be

Table 1
Mean hydrodynamic size of silver nanoparticles spiked in several culture media with different surfactants at different concentrations (mean ± standard deviation, $n = 9$). *Welch correction.

Culture media	Surfactant concentration %	Mean hydrodynamic size nm			
		Triton X100	Tween 80	SDS	CTAB
Mueller-Hinton	0	127.7 ± 6.0	127.7 ± 6.0	127.7 ± 6.0	127.7 ± 6.0
	0.1	119.5 ± 8.1	120.8 ± 9.0	116.9 ± 10.0	149.3 ± 7.3
	0.5	107.5 ± 8.7	112.3 ± 7.3	109.8 ± 9.4	141.4 ± 7.8
	1	71.4 ± 7.8	116.0 ± 7.4	113.4 ± 6.8	139.4 ± 8.6
	1.5	101.5 ± 7.6	106.8 ± 7.2	110.7 ± 7.2	135.1 ± 4.1
	2	91.6 ± 6.7	74.9 ± 6.5	95.9 ± 8.8	114.4 ± 3.7
ANOVA (*p*-value)		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Luria-Bertani	0	139.2 ± 8.3	139.2 ± 8.3	139.2 ± 8.3	139.2 ± 8.3
	0.1	118.5 ± 14.2	117.6 ± 10.4	112.0 ± 7.3	237.8 ± 24.7
	0.5	98.0 ± 8.3	109.6 ± 6.7	112.2 ± 3.9	144.6 ± 12.8
	1	87.6 ± 12.0	109.3 ± 7.6	108.9 ± 5.3	142.5 ± 0.9
	1.5	89.2 ± 11.9	94.6 ± 13.7	105.8 ± 4.4	135.4 ± 6.6
	2	81.7 ± 7.6	89.4 ± 6.8	95.9 ± 4.4	138.6 ± 7.4
ANOVA (p-value)		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001*
BHI	0	104.2 ± 10.8	104.2 ± 10.8	104.2 ± 10.8	104.2 ± 10.8
	0.1	109.8 ± 20.2	127.4 ± 21.6	102.7 ± 10.0	225.4 ± 48.7
	0.5	82.4 ± 7.4	114.7 ± 8.7	103.9 ± 31.1	285.3 ± 58.2
	1	96.6 ± 20.9	110.6 ± 11.9	119.5 ± 21.4	181.0 ± 38.5
	1.5	88.8 ± 12.8	97.8 ± 9.1	83.8 ± 6.6	179.9 ± 66.6
	2	84.3 ± 14.4	89.9 ± 9.8	86.5 ± 10.1	146.4 ± 9.7
ANOVA (p-value)		=0.006*	<0.001	<0.001*	<0.001*

observed, the nanoparticle sizes in the presence of these surfactants were lower than in their absence, except in the case of the addition, for any concentration, of Triton X100 and Tween 80 in BHI where no significant differences in sizes were observed in relation to the absence of these surfactants. In contrast, the CTAB surfactant did not prevent aggregation, and smaller sizes were obtained in the absence of this surfactant, in almost all cases. This fact indicated that the CTAB surfactant was not suitable to prevent aggregation of the nanoparticles.

The adsorption of surfactant on the nanoparticle surface influences the electrostatic and steric interactions between the nanoparticles and surfactant molecules (Yang et al., 2015). According to DLVO theory, the total interaction energy between charged particles is a summation of the Van der Waals attraction and the Electric Double Layer repulsion (Verwey, 1947; Derjaguin and Landau, 1993). While the Van der Waals attractive force is significant at a very small separation distance, the effect of Electric Double Layer repulsive force is generally stronger and in a wider range (Adair et al., 2001). Aggregation is prevented when the electrostatic repulsion between particles is dominant over the Van der Waals attraction (Tran et al., 2022).

The addition of SDS (anionic surfactant) (Table 1, and in Fig. 1A), decreased the sizes of silver nanoparticles compared to the absence of the SDS, in all three media studied. These differences were statistically significant for all concentrations ($p < 0.005$), except for 0.1% of SDS in MH medium and for the concentrations 0.1% - 1% of SDS in BHI medium. Due to the silver nanoparticles are negatively charged (zeta potencial: −46 mV), there will be electrostatic repulsion between them and the anionic surfactant molecules, resulting in the increasing stability of the colloidal nanoparticles dispersed in SDS and the chance of

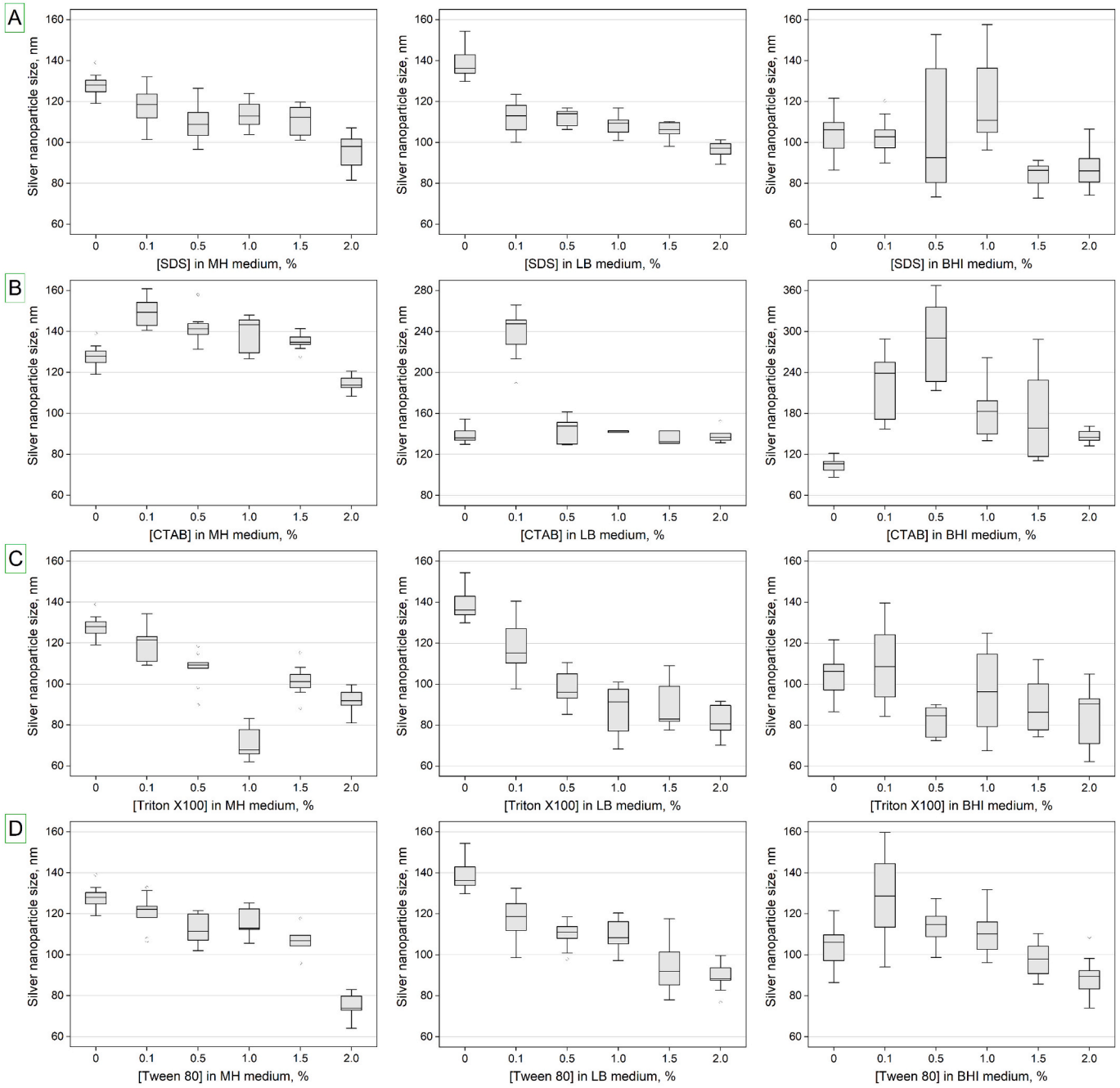


Fig. 1. Box plot representation of hydrodynamic sizes of silver nanoparticles spiked in the tested culture media with different concentrations of A: SDS (0–2%); B: CTAB (0–2%) added; C: Triton X100 (0–2%) and D: Tween 80 (0–2%).

nanoparticle aggregation is relatively low. This fact was observed in other studies with negatively charged particles (AgNPs, SiO_2-NPs, ZnO-NPs, ZrO_2-NPs) and anionic surfactants (SDS, SDBS) (Yekeen et al., 2019; Tran et al., 2022; Kvítek et al., 2008).

The addition of CTAB (cationic surfactant), increased the sizes of silver nanoparticles at almost all surfactant concentrations, in all media studied (Fig. 1B). In MH and BHI media, the nanoparticle size was significantly smaller in absence of surfactant than at any of the concentrations ($p < 0.001$), except for the concentration of 1.5% in BHI medium and for 0.1%, 0.5% and 2% in MH medium. In LB medium, no significant differences were found for any concentration of CTAB, except for the concentration of 0.1%, where the nanoparticle size was significantly higher than in the absence of CTAB. The electrostatic attraction between the cationic surfactant and the negatively charged nanoparticles can generate a multilayer structure of surfactant molecules on the nanoparticle surface and increase the hydrodynamic size (Tran et al., 2022; Fernando et al., 2019).

Fig. 1C and D show that in presence of Triton X100 and Tween 80 (non-ionic surfactants), a statistically significant decrease in nanoparticle sizes ($p < 0.005$) was observed in LB and MH media, except for the concentration of 0.1% of both surfactants in MH medium. In BHI medium, although the addition of both surfactants decreased the sizes of the nanoparticles for almost all concentrations, statistically significant differences were not observed in relation to their absence. The stability of the nanoparticle suspension with non-ionic surfactants was high. Probably, the balance between the repulsive and the attractive forces does not produce significant interaction between the non-ionic surfactant and the charged surfaces of the nanoparticles (Yekeen et al., 2019; Kvítek et al., 2008).

In agreement with the previously published results (Yekeen et al., 2019; Kvítek et al., 2008), the non-ionic surfactants Triton X100 and Tween 80 showed the highest ability to stabilize and prevent aggregation of silver nanoparticles, compared to anionic and, especially, cationic surfactants.

Generally, increasing the surfactant concentration, the nanoparticle size decreased ($p < 0.05$). In the case of the lowest concentrations of SDS (0.1%, 0.5% and 1%) in BHI medium and for 0.1% of SDS, Triton X100 and Tween 80 in MH medium, the nanoparticle sizes did not differ significantly regarding the absence of surfactants ($p > 0.05$). Therefore, higher concentrations of surfactants were chosen to prevent aggregation of the nanoparticles. In contrast, some authors describe that in water, increasing surfactant concentration, nanoparticle sizes increased (Tran et al., 2022), showing that the composition of the culture media could affect the behavior of the surfactants and nanoparticles.

As mentioned above, the addition of Triton X100 and Tween 80 in BHI medium did not produce significant differences in relation to the absence of these surfactants, while the addition of them in MH and LB media allowed to obtain significant smaller sizes. In addition, BHI medium showed the higher coefficients of variation than in other media, mainly with the addition of CTAB and with higher surfactant concentrations. Therefore, BHI medium was considered the least stable, and therefore the least suitable to prevent nanoparticle aggregation, compared to LB and MH media.

On the other hand, it was observed that for the lowest concentration (0.1%) of Triton X100, Tween 80 and SDS in LB medium, significantly smaller sizes were obtained compared to the absence of them, whereas for the same concentrations of these surfactants in MH medium, no significant differences were observed. This indicated that LB was more suitable for low concentrations of surfactants than MH medium.

It has been reported that the presence of salts such as NaCl allows the aggregation of nanoparticles because the thickness of the electrical double layer around the silver nanoparticles decreases as the ionic strength increases, and it enhances the close encounter of nanoparticles. Furthermore, anions such as Cl^-, can precipitate with silver ions around the silver nanoparticles and create a new coating that increases the size of the nanoparticles (Millour et al., 2015; Pareek et al., 2018). NaCl was included in LB and BHI composition, whereas it was not in MH. This could be an important factor for choosing the optimal medium, but in this study, no differences were observed between NaCl-containing and NaCl-free media. The presence of organic matter in culture media like tryptone and yeast extract, could affect the aggregation of silver nanoparticles by increasing the coagulation critical concentration, and so, the concentration of NaCl in the media might be lower than the coagulation critical concentration required to produce nanoparticle aggregation (Millour et al., 2015). Vazquez-Muñoz et al. observed that culture media with different compositions, such as MH and LB, had a similar effect on the hydrodynamic size of silver nanoparticles (Vazquez-Muñoz et al., 2020), which was consistent with those obtained in this study. LB, MH and BHI media contain proteins from different sources, such as beef (MH and BHI) or yeast (LB), and different concentrations of inorganic salts (high concentration in LB and BHI, and no salts in MH). Therefore, different mechanisms and interactions may occur between nanoparticles and components of the culture medium and affect the aggregation of silver nanoparticles (Vazquez-Muñoz et al., 2020).

Considering the results obtained, MH and LB with higher surfactant concentrations were chosen as a culture media for future studies. The optimal combinations of the culture media that prevented the aggregation of nanoparticles, and with which the results closest to the sizes of nanoparticles in ultrapure water were obtained, were: LB medium plus 1–2% of Triton X100, MH medium plus 1% of Triton X100, MH and LB media plus 2% of Tween 80 and SDS, and BHI medium plus 1.5% of SDS; being MH + 2% of Tween 80 and MH + 1% Triton X100, the best combinations of all.

3.2. Effect of the composition of the media on the bacterial viability

It must be taken into account that high concentrations of surfactant can affect the viability of the bacteria, negatively affecting the results of the bactericidal effectiveness of the nanoparticles. The follow culture media and surfactant concentrations were selected for the study of bacterial viability: MH + 2% of Triton X100; MH + 1% of Triton X100; LB + 2% of Triton X100; LB + 1% of Triton X100; MH + 2% of Tween 80; LB + 2% of Tween 80 and BHI + 1.5% of SDS, as well as, controls of the media MH, LB and BHI without surfactants.

A significant bacterial growth was observed on control media without surfactants for both *E. coli* strains. For *E. coli* ATCC, significant differences in growth were not observed in any of the media studied; except for BHI + 1.5% of SDS, where there was a considerable reduction in bacterial growth. In the case of *E. coli* J62, significant differences were observed only for medium of LB + 2% of Triton X100, where a growth reduction of some orders of magnitude was obtained.

For *E. coli* ATCC, the bacterial growth on LB control medium was of the same order as on the medium of LB + 2% of Triton X100, having a growth of $5 \times 10^5 \pm 6 \times 10^4$ CFU mL^{-1} and $3 \times 10^5 \pm 4 \times 10^4$ CFU mL^{-1}, respectively. On the contrary, $4 \times 10^5 \pm 5 \times 10^4$ CFU mL^{-1} grew on BHI medium, whereas there was no growth on the medium of BHI + 1.5% of SDS, which confirmed that SDS at this concentration affected the viability of the bacteria.

The massive growth of *E. coli* J62 in the Petri dishes did not allow colony counting. When 2% of Triton X100 was added to LB medium, countless bacteria also grew, but a qualitative reduction in growth and smaller colony size were observed, suggesting that the surfactant affected their development.

As a results of these viability studies, LB + 2% of Triton X100 and BHI + 1.5% of SDS were rejected as media for antibacterial experiments. Finally, because the viability of bacteria was not affected by surfactant, and the size of nanoparticles on these media was similar to that of nanoparticles in water, it was determined that the two most suitable media which prevent the aggregation of the silver nanoparticles studied were MH + 2% of Tween 80 and MH + 1% of Triton X100. Between both chosen media, no statistically significant differences were observed, and therefore, either of the two media could be chosen as the optimal

medium, although MH + 1% of Triton X100 medium had a higher standard deviation.

Different types of Tween (80 and 20) have been used in studies with silver nanoparticles (Kvítek et al., 2008; Fernando et al., 2019), where it has been observed that Tween 80 provided a considerable enhancement of the silver nanoparticle stability; whereas Triton X100 has been used in studies with silica, ZrO_2, Al_2O_3 or TiO_2 nanoparticles (Yekeen et al., 2019; Tran et al., 2022). Due to this, the medium chosen as optimal for researching interactions between bacteria and nanoparticles was MH + 2% of Tween 80.

3.3. Study of stability over time on size nanoparticles by SP-ICP-MS

A study of stability on size nanoparticles incubated 24 h in the chosen culture medium (MH + 2% of Tween 80) was performed to determine if there is a change in the original size of silver nanoparticles during long incubation periods.

Nanoparticle sizes were measured by ICP-MS after 24 h of incubation in MH + 2% of Tween 80 medium and were compared with nanoparticles diluted in ultrapure water. Results showed that nominal size obtained after the incubation time in the culture medium was 58.1 ± 0.1 nm, whereas the size for silver nanoparticles of 60 nm diluted in ultrapure water was 59.7 ± 0.4 nm. These values are in agreement with each other and with the nominal size certified by the supplier (60 ± 7 nm). Thus, this showed that nanoparticles are stable and do not suffer size transformations during incubation.

Fig. 2 shows the size distributions of 60 nm silver nanoparticles diluted in ultrapure water and incubated in MH + 2% of Tween 80 medium. Both distributions are similar, with mean sizes around 60 nm. No larger nanoparticles were observed in the size distribution, indicating that nanoparticles did not aggregate. In addition, nanoparticle recovery was 91.4 ± 2.5% in the case of the incubation on culture medium, confirming that nanoparticles were not aggregated.

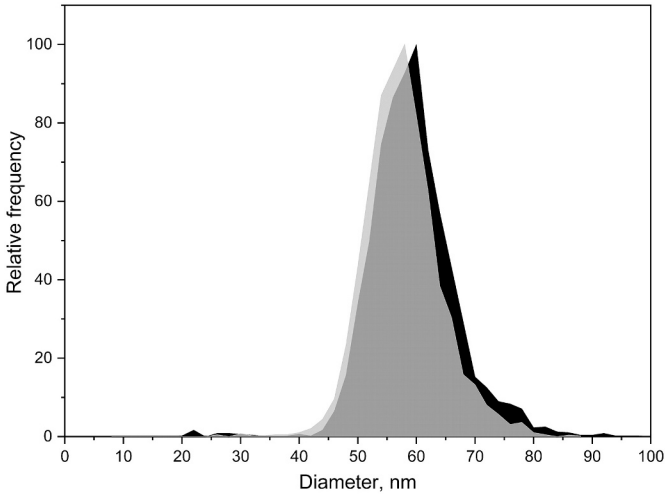


Fig. 2. Size distributions of 60 nm silver nanoparticles in water (black area) and incubated in MH + 2% of Tween 80 medium (gray area).

4. Conclusions

Based on the results of this study, it was determined that non-ionic surfactants (Triton X100 and Tween 80) have a greater ability to stabilize and prevent the aggregation of silver nanoparticles, compared to anionic (SDS) and cationic (CTAB) surfactants. In addition, higher concentrations of surfactants prevent aggregation of silver nanoparticles. In relation to the culture media studied, it was determined that MH and LB were the most stable growth media. Therefore, the optimal culture media were MH and LB with higher concentrations of Tween 80 and Triton X100 surfactants, and as it was demonstrated, these optimal culture media did not affect the viability of bacteria. Aggregation did not occur when nanoparticles were incubated in the medium for long incubations periods, so, the size of nanoparticles was stable over time.

CRediT authorship contribution statement

Ana C. Gimenez-Ingalaturre: Conceptualization, Data curation, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization, Funding acquisition. **Encarnación Rubio:** Methodology, Data curation, Formal analysis, Writing – review & editing, Visualization, Funding acquisition. **Patricia Chueca:** Data curation, Validation, Resources, Writing – review & editing, Visualization, Funding acquisition. **Francisco Laborda:** Conceptualization, Validation, Writing – review & editing, Visualization, Project administration, Funding acquisition. **Pilar Goñi:** Conceptualization, Methodology, Validation, Resources, Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

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

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities and the European Regional Development Fund, project RTI2018-096111-B-I00 (MICINN/FEDER) and the Government of Aragon (E29_20R and B43_20R).

A.C.G. thanks the Government of Aragón (DGA) for a predoctoral contract.

The authors would like to acknowledge Carlos Lafuente and Héctor Artigas (Group Platon of University of Zaragoza) for the use of their equipment and facilities for density and viscosity measurements; and the use of Servicio General de Apoyo a la Investigación-SAI, Universidad de Zaragoza.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106618.

References

Abbaszadegan, A., Ghahramani, Y., Gholami, A., Hemmateenejad, B., Dorostkar, S., Nabavizadeh, M., Sharghi, H., 2015. The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria: a preliminary study. J. Nanomater. 2015, 1–8. https://doi.org/10.1155/2015/720654.

Acay, H., Baran, M.F., Eren, A., 2019. Investigating antimicrobial activity of silver nanoparticles produced through green synthesis using leaf extract of common grape (Vitis Vinifera). Appl. Ecol. Environ. Res. 17, 4539–4546. https://doi.org/10.15666/aeer/1702_45394546.

Adair, J.H., Suvaci, E., Sindel, J., 2001. Surface and colloid chemistry. In: Encycl. Mater. Sci. Technol. Elsevier, pp. 1–10. https://doi.org/10.1016/b0-08-043152-6/01622-3.

Agnihotri, S., Mukherji, S., Mukherji, S., 2014. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. RSC Adv. 4, 3974–3983. https://doi.org/10.1039/C3RA44507K.

Baker, C., Pradhan, A., Pakstis, L., Pochan, D.J., Shah, S.I., 2005. Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. J. Nanosci. Nanotechnol. 5, 244–249. https://doi.org/10.1166/jnn.2005.034.

Bélteky, P., Rónavári, A., Zakupszky, D., Boka, E., Igaz, N., Szerencsés, B., Pfeiffer, I., Vágvölgyi, C., Kiricsi, M., Kónya, Z., 2021. Are smaller nanoparticles always better? Understanding the biological effect of size-dependent silver nanoparticle

aggregation under biorelevant conditions. Int. J. Nanomedicine 16, 3021–3040. https://doi.org/10.2147/IJN.S304138.
Callon, C., Ndob, A.M., Savignard, A., Rifa, E., Montel, M.-C., 2016. Escherichia coli O26: H11 growth in co-culture with an antagonistic strain of *Hafnia alvei* according to pH and temperature. Food Control 62, 117–124. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.022.
Derjaguin, B., Landau, L., 1993. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. Prog. Surf. Sci. 43, 30–59. https://doi.org/10.1016/0079-6816(93)90013-L.
El-Kheshen, A.A., El-Rab, S.F.G., 2012. Effect of reducing and protecting agents on size of silver nanoparticles and their anti-bacterial activity. Der. Pharma. Chem. 4, 53–65.
Fernández, A., Picouet, P., Lloret, E., 2010. Cellulose-silver nanoparticle hybrid materials to control spoilage-related microflora in absorbent pads located in trays of fresh-cut melon. Int. J. Food Microbiol. 142, 222–228. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.001.
Fernando, I., Qian, T., Zhou, Y., 2019. Long Term Impact of Surfactants & Polymers on the Colloidal Stability, Aggregation and Dissolution of Silver Nanoparticles. https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108781.
Gomez-Lus, R., Rivera, M.J., Gomez-Lus, M.L., Gil, J., Gomez-Lus, S., Castillo, J., Goni, P., Madero, P., Rubio, M.C., 1990. Resistance to apramycin in two enterobacterial clinical isolates: detection of a 3-N-acetyltransferase IV. J. Chemother. 2, 241–243. https://doi.org/10.1080/1120009X.1990.11739023.
Gunawan, C., Marquis, C.P., Amal, R., Sotiriou, G.A., Rice, S.A., Harry, E.J., 2017. Widespread and indiscriminate nanosilver use: genuine potential for microbial resistance. ACS Nano 11, 3438–3445. https://doi.org/10.1021/acsnano.7b01166.
Gurunathan, S., 2015. Biologically synthesized silver nanoparticles enhances antibiotic activity against gram-negative bacteria. J. Ind. Eng. Chem. 29, 217–226. https://doi.org/10.1016/j.jiec.2015.04.005.
Hane, M.W., Wood, T.H., 1969. *Escherichia coli* K-12 mutants resistant to nalidixic acid: genetic mapping and dominance studies. J. Bacteriol. 99, 238–241. https://doi.org/10.1128/jb.99.1.238-241.1969.
Hartemann, P., Hoet, P., Proykova, A., Fernandes, T., Baun, A., De Jong, W., Filser, J., Hensten, A., Kneuer, C., Maillard, J.Y., Norppa, H., Scheringer, M., Wijnhoven, S., 2015. Nanosilver: safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance. Mater. Today 18, 122–123. https://doi.org/10.1016/j.mattod.2015.02.014.
Huynh, K.A., Chen, K.L., 2011. Aggregation kinetics of citrate and polyvinylpyrrolidone coated silver nanoparticles in monovalent and divalent electrolyte solutions. Environ. Sci. Technol. 45, 5564–5571. https://doi.org/10.1021/es200157h.
Kvítek, L., Panáček, A., Soukupová, J., Kolář, M., Večeřová, R., Prucek, R., Holecová, M., Zbořil, R., 2008. Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs). J. Phys. Chem. C 112, 5825–5834. https://doi.org/10.1021/jp711616v.
Li, X., Lenhart, J.J., Walker, H.W., 2010. Dissolution-accompanied aggregation kinetics of silver nanoparticles. Langmuir. 26, 16690–16698. https://doi.org/10.1021/la101768n.
Marambio-Jones, C., Hoek, E.M.V., 2010. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. J. Nanopart. Res. 12, 1531–1551. https://doi.org/10.1007/s11051-010-9900-y.
Millour, M., Doiron, K., Lemarchand, K., Gagné, J.P., 2015. Does the bacterial media culture chemistry affect the stability of nanoparticles in nanotoxicity assays? J. Xenobiotics 5, 34–36. https://doi.org/10.4081/xeno.2015.5772.
Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramírez, J.T., Yacaman, M.J., 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology. 16, 2346–2353. https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059.
Morones-Ramirez, J.R., Winkler, J.A., Spina, C.S., Collins, J.J., 2013. Silver enhances antibiotic activity against gram-negative bacteria. Sci. Transl. Med. 5 https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006276, 190ra81.
Ordóñez, F., Chejne, F., Pabón, E., Cacua, K., 2020. Synthesis of ZrO 2 Nanoparticles and Effect of Surfactant on Dispersion and Stability. https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.01.236.
Pal, S., Tak, Y.K., Song, J.M., 2007. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 73, 1712–1720. https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06.
Panáček, A., Kvítek, L., Prucek, R., Kolář, M., Večeřová, R., Pizúrová, N., Sharma, V.K., Nevěčná, T., Zbořil, R., 2006. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. J. Phys. Chem. B 110, 16248–16253. https://doi.org/10.1021/jp063826h.
Panáček, A., Smékalová, M., Večeřová, R., Bogdanová, K., Röderová, M., Kolář, M., Kilianová, M., Hradilová, Š., Froning, J.P., Havrdová, M., Prucek, R., Zbořil, R., Kvítek, L., 2016. Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant *Enterobacteriaceae*. Colloids Surf. B: Biointerfaces 142, 392–399. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.03.007.
Pareek, V., Gupta, R., Panwar, J., 2018. Do physico-chemical properties of silver nanoparticles decide their interaction with biological media and bactericidal action? A review. Mater. Sci. Eng. C 90, 739–749. https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.093.
Rai, M.K., Deshmukh, S.D., Ingle, A.P., Gade, A.K., 2012. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. J. Appl. Microbiol. 112, 841–852. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05253.x.
Ravichandran, M., Hettiarachchy, N.S., Ganesh, V., Ricke, S.C., Singh, S., 2011. Enhancement of antimicrobial activities of naturally occurring phenolic compounds by nanoscale delivery against listeria monocytogenes, *Escherichia coli* O157:H7 and *salmonella typhimurium* in broth and chicken meat system. J. Food Saf. 31, 462–471. https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2011.00322.x.
Sadeghi, B., Garmaroudi, F.S., Hashemi, M., Nezhad, H.R., Nasrollahi, A., Ardalan, S., Ardalan, S., 2010. Comparison of the Anti-Bacterial Activity on the Nanosilver Shapes: Nanoparticles, Nanorods and Nanoplates. https://doi.org/10.1016/j.apt.2010.11.011.
Stebounova, L.V., Guio, E., Grassian, V.H., 2011. Silver nanoparticles in simulated biological media: a study of aggregation, sedimentation, and dissolution. J. Nanopart. Res. 13, 233–244. https://doi.org/10.1007/s11051-010-0022-3.
Toledo, V.H., Yoshimura, T.M., Pereira, S.T., Castro, C.E., Ferreira, F.F., Ribeiro, M.S., Haddad, P.S., 2020. Methylene blue-covered superparamagnetic iron oxide nanoparticles combined with red light as a novel platform to fight non-local bacterial infections: a proof of concept study against *Escherichia coli*. J. Photochem. Photobiol. B Biol. 209 https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111956, 111956.
Tran, T., Gonzalez Perdomo, M.E., Haghighi, M., Amrouch, K., 2022. Study of the synergistic effects between different surfactant types and silica nanoparticles on the stability of liquid foams at elevated temperature. Fuel. 315 https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.122818.
Vazquez-Muñoz, R., Bogdanchikova, N., Huerta-Saquero, A., 2020. Beyond the nanomaterials approach: influence of culture conditions on the stability and antimicrobial activity of silver nanoparticles. ACS Omega 5, 28441–28451. https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02007.
Verwey, E.J.W., 1947. Theory of the stability of lyophobic colloids. J. Phys. Colloid Chem. 51, 631–636. https://doi.org/10.1021/j150453a001.
Yang, Y.-J., Kelkar, A.V., Zhu, X., Bai, G., Ng, H.T., Corti, D.S., Franses, E.I., 2015. Effect of sodium dodecylsulfate monomers and micelles on the stability of aqueous dispersions of titanium dioxide pigment nanoparticles against agglomeration and sedimentation. J. Colloid Interface Sci. 450, 434–445. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.02.051.
Yekeen, N., Padmanabhan, E., Kamal Idris, A., 2019. Synergistic Effects of Nanoparticles and Surfactants on n-Decane-Water Interfacial Tension and Bulk Foam Stability at High Temperature. https://doi.org/10.1016/j.petrol.2019.04.109.

CHAPTER 13

Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: A Valuable Tool in Environmental Analysis

M. BAKIR, K. BEN-JEDDOU, A. C. GIMENEZ-INGALATURRE, E. BOLEA AND F. LABORDA*

Group of Analytical Spectroscopy and Sensors (GEAS), Institute of Environmental Sciences (IUCA), University of Zaragoza, Pedro Cerbuna 12, 50009, Zaragoza, Spain
*Email: flaborda@unizar.es

13.1 Introduction

Although colloidal and nano-size particles are naturally present in the environment, the growing development and use of nano-enhanced materials have led to recognising the relevance of the occurrence of engineered nanoparticles in different environmental compartments.[1,2] In this regard, metrological limitations related to the detection, characterization and quantification of nanoparticles in environmental samples has been one of the main drawbacks and still remains a challenge.[3] However, over the last ten years, the situation has been improving by the development of new analytical methods such as nanoparticle tracking analysis,[4] field flow fractionation hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry (FFF-ICP-MS),[5] and especially single particle ICP-MS (SP-ICP-MS).[6] The relevance of SP-ICP-MS

Chemistry in the Environment Series No. 9
Environmental Nanopollutants: Sources, Occurrence, Analysis and Fate
Edited by Joanna Szpunar and Javier Jiménez-Lamana
© The Royal Society of Chemistry 2023
Published by the Royal Society of Chemistry, www.rsc.org

is supported by the number of specific reviews and tutorials published to date.[6–12]

The analytical demands in the environmental domain are not only constrained to the analysis of field samples (waters, soils, sediments, sludges, *etc.*). Moving from the field to the laboratory, tests under controlled conditions, involving pristine nanoparticle or products containing nanoparticles, are required for the risk assessment of nano-enhanced materials. These laboratory-scale tests involve the simulation of the release and transformation processes that nanomaterials may undergo during their whole life cycle, as well as ecotoxicological studies through *in vitro* and *in vivo* assays. In all these areas, SP-ICP-MS has proved to be a suitable technique for the analysis of complex samples, providing reliable information about engineered nanoparticles and their transformation products,[12] but also about naturally occurring or incidental nanomaterials.[13]

13.2 Basic Principles of SP-ICP-MS

The theoretical basis of single particle detection applied to ICP-MS was outlined by Degueldre and Favarger[14] and summarized by Laborda *et al.*[6] Basically, when a sufficiently diluted suspension (number concentrations of 10^8 L^{-1} or lower) is introduced into an ICP-MS, particles are present in just some aerosol droplets, arriving into the plasma randomly, whereas the dissolved species are homogeneously distributed in all the droplets. Measuring at very high data acquisition frequencies (>100 Hz), with dwell times from milli- to microseconds, nanoparticles are detected as individual events over a continuous baseline due to the background or the dissolved element. The intensity of these events is related to the mass of the element in the nanoparticle, and hence to its size if additional information about the composition, shape and density of the nanoparticle is available, whereas the frequency of events is proportional to the number concentration of nanoparticles. Besides, information about dissolved forms of the element measured could also be obtained from the baseline.[15]

Depending on the dwell time selected, nanoparticle events can be recorded in two different forms. When using dwell times in the millisecond range (3–10 ms), larger than the duration of the ion cloud in the instrument, typically between 300 and 1000 μs, events are recorded as one-reading signals (pulses), whereas for dwell times in the microsecond range (10–200 μs), they are recorded as peaks (transient signals), comprising several readings (see Figure 13.1a). For pulses, the intensity of the event is given by the reading itself, whereas for peaks, the intensity is calculated as the sum of the individual readings along it.

Plotting the event intensity *vs.* the number of events from both milli- and microsecond time scan raw data, histograms with two distributions are obtained (see Figure 13.1b). The first distribution corresponds to the background and/or the presence of dissolved forms of the element measured and the second to the nanoparticles themselves. If the second distribution is

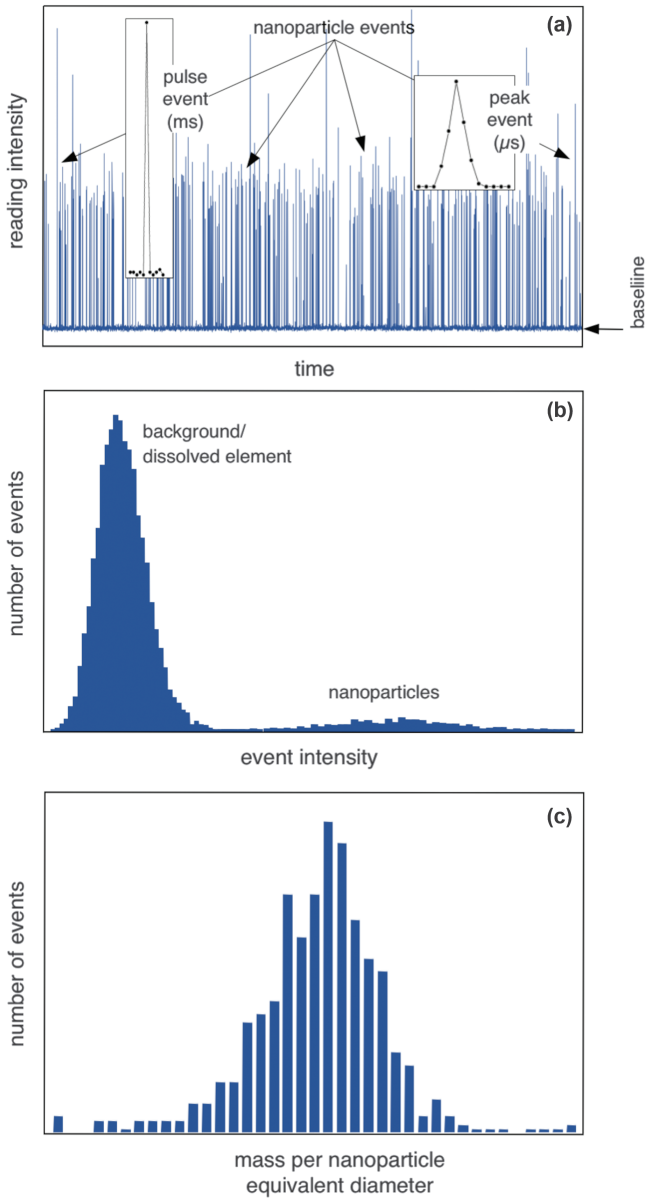


Figure 13.1 (a) Time scan of a suspension containing nanoparticles and dissolved forms of the same element. (b) Event intensity histogram of data from (a). (c) Mass per nanoparticle/size distribution of spherical nanoparticles calculated from the second intensity distribution in (b). Reproduced from ref. 12 with permission from the Royal Society of Chemistry.

further processed to convert the event intensities, the mass of the element per nanoparticle or size distributions can be obtained (see Figure 13.1c). Instrumental and metrological issues related to measurements, data acquisition and data processing have been summarized and described in detail in several reviews[6–8,10] and articles therein.

The different types of quantitative information on nanoparticles achievable by SP-ICP-MS requires different calibrations, which must be obtained through the measurement of the corresponding standards. Whereas dissolved element mass concentration calibration involves conventional elemental standards prepared from dissolved species of the element of concern, particle number concentration and size calibrations require reference materials characterized in number concentration or size, respectively. In the case of number concentration, a gold nanoparticle standard has recently become available,[16] although gold size standards with certified total metal concentration have also been used. Size or element mass per particle calibration should involve the use of size standards of nanoparticles with the same composition and shape as the nanoparticles under study. Because such standards are just available for certain nanoparticle compositions and not always in a wide range of sizes, indirect calibrations based on the use of dissolved standards of the element of interest, assuming that particles behave in the ICP-MS the same way as the dissolved element, and the determination of the nebulization efficiency are usually applied. Nebulization efficiency can be calculated by the frequency or the size methods,[17] which requires nanoparticle size and dissolved element standards, most usually gold, but also by the dynamic mass flow, a reference material free method.[18] An overview of calibration issues in SP-ICP-MS can be found in Laborda *et al.*[19]

13.3 Analytical Information and Figures of Merit

Two types of analytes are under the scope of SP-ICP-MS, namely nanoparticles and dissolved species. The information provided by SP-ICP-MS can be: (i) qualitative, about the presence of nanoparticulates and dissolved forms of specific elements; (ii) quantitative content, such as number and mass concentrations; and (iii) characterisation, about the mass of element/s per nanoparticle and nanoparticle size. Nevertheless, because the chemical composition of the particles is not usually available in many environmental samples, the size information is reported as an equivalent diameter, by assuming a specific composition (*e.g.*, metallic Ag, TiO_2) and a spherical shape.

In addition, other types of information can be obtained from SP-ICP-MS measurements, such as aggregation or agglomeration processes suffered by nanoparticles. This is especially relevant in environmental applications, like in the fate of nanoparticles in environmental conditions, since the constituents in these complex media (*e.g.*, organic matter) or the variations in pH or ionic strength, can cause changes in size, size distribution and concentration that can be monitored by SP-ICP-MS. Also, the dissolution processes of the nanoparticles can be studied since the technique allows the quantification of both

the particulate and the dissolved fractions of the element determined. All these topics will be discussed in detail in the following sections.

Figures of merit should be defined for both particle concentration and size (or mass of element per particle), but also for dissolved element mass concentration. Selectivity, precision, trueness, limits of detection (LOD) and measurement range have been regarded. Selectivity evaluation should consider not only polyatomic interferences, but also matrix constituents that may interfere with the nebulization even though large dilutions are often applied to prevent coincident particle events. Thus, changes in the nebulization efficiency may lead to bias on the particle number concentration, whereas changes in the ionization affect particle size. Precision has been evaluated through both repeatability and reproducibility, with repeatability values around 5% in size and 20% in number concentration, values that are even higher in the case of reproducibility. Higher bias is also commonly reported when considering number concentration with respect to particle size. The evaluation of trueness is limited to a recovery test due to the lack of certified reference material for nanoparticles in any type of matrix. In general, problems with discrimination of baseline signals from those of small particles and likely partial dissolution processes, which increase the baseline signal, are considered as the main contributions to the bias and low reproducibility reported.[19] Also, the instability of the spiked standard in the samples may lead to low recoveries.[20] For all these reasons, the confirmation of the results by independent methods, such as electron microscopy, is highly recommended when possible.

A comprehensive list of size LODs for metallic and oxide nanoparticles can be found in the literature.[11] Best-case values around 10 nm were calculated for most common nanoparticles at 100 μs dwell time using a commercial quadrupole instrument. These figures are improved when using double focussing spectrometers due to the better sensitivity attainable with these instruments, although the presence of dissolved forms of the element measured will degrade the LOD in either case. On the other hand, the number concentration LOD depends on the number of particle events detected in a blank and the acquisition time. As reference, the LODs of 100 particles per mL have been reported for acquisition times of 60 s.[11] Finally, the measurement range in number concentration depends on the occurrence of multiple particle events, which is proportional to the flux of particles through the plasma and the dwell time.[21] With conventional nebulization systems, linear ranges up to 10^8 L^{-1} can be achieved at microsecond dwell times. Linearity of size measurements are limited by low transport efficiencies and/or incomplete vaporization of large particles,[22,23] together with the saturation of the detector.[24] For instance, linear size ranges up to 1 μm for SiO_2 particles have been reported.[25]

13.4 Environmental Applications of SP-ICP-MS

Over the last 10 years, SP-ICP-MS publications have evolved from fundamental studies, proofs-of-concept and development of methods to a wide

range of applications in a variety of fields and scenarios, including the environment.[12] In the environmental field, the most complex scenario corresponds to the analysis of environmental samples (waters, soils, sediments, wastes, sludges, organisms, *etc.*) because of the unknown nature of the nanoparticles present, the low concentrations expected and the complexity of most of the matrices involved. Laboratory studies for simulating the release and fate of nanoparticles or products containing nanoparticles under relevant environmental conditions, as well as ecotoxicological assays, are a second group of scenarios showing relatively less complexity, because they are performed under controlled conditions by using pristine nanoparticles of selected sizes and concentrations in most cases.

This section has been organized according to the three scenarios listed above: (i) environmental samples, (ii) release and fate laboratory studies involving nanoparticles or products containing nanoparticles and (iii) *in vitro* and *in vivo* ecotoxicological tests.

13.4.1 Analysis of Environmental Samples

The increasing use of consumer and industrial products containing engineered nanomaterials can lead to the release of nanoparticles during their whole life cycle, eventually ending up in the environment. Waters, but also soils and sediments, as well as the organisms living in them, are the main targets for monitorization, with special attention to wastewater treatment plants (WWTPs) due to their role in both the removal and the eventual discharge of nanoparticles to natural waters. In addition, the detection of incidental nanoparticles of different origins has also been a matter of concern.

13.4.1.1 Waters

Nano-enabled sunscreens containing TiO_2 are a source of such nanoparticles in recreational waters.[26–30] For this reason, SP-ICP-MS has been used in several studies to determine TiO_2 nanoparticles in bathing areas. The analysis of water samples requires minimal sample preparation, which includes filtration or centrifugation to remove large particles. SP-ICP-MS results were complemented by transmission electron microscopy with energy dispersive X-ray spectroscopy (TEM-EDS)[29] and the detection of the organic component of sunscreens oxybenzone, confirming that sunscreen constituents, including Ti-containing nanoparticles, were present in the waters.[28,30] On the other hand, differentiation between natural and anthropogenic nanoparticles was studied through the ratios Ti/Al and Ti/Fe.[26–28]

TiO_2 nanoparticles are also used as additives in building materials. These materials can end up in landfills and potentially leach into the environment. Kaegi *et al.*[31] analysed landfill leachates by SP-ICP-MS and other complementary techniques (dynamic light scattering, electron microscopy), detecting Ti-containing particles in the samples studied. Some of these

particles were very similar to the white pigments detected in facades, whilst others were associated to primary minerals.

Although the presence of nanoparticles in tap water could be considered negligible, corrosion by-products from the distribution pipes can be released as nanoparticles.[32,33] The analysis of tap water by SP-ICP-MS confirmed the presence of Fe-, Pb-, Sn-, Ag- and Cu-containing nanoparticles. Fe and Cu particles were attributed to pipe corrosion, whereas Pb and Sn were associated with solder materials.[32] In a different study, the presence of silver traces in the copper pipes was found to be responsible for the release of nanoparticulate Ag into tap water.[33]

As mentioned above, WWTPs contribute to the removal of engineered nanoparticles, being important to evaluate the efficiency of the water treatment processes to control the discharge of nanoparticles into aquifers. The incidence of 13 types of nanoparticles throughout the wastewater treatment process was studied by SP-ICP-MS, analysing samples of influent, post-primary, effluent and reclaimed water.[34,35] The efficient removal of nanoparticles was observed along the wastewater treatment, removing 84–99% of natural and engineered nanoparticles from the influent to the reclaimed water except for Mg, Ni and Cd, where the removal ranged from 70 to 78%. On the other hand, Li *et al.*[36] demonstrated that despite the effective removal of Ag-containing nanoparticles from wastewater influents, the effluents contributed to an increase in the concentration of such particles in the receiving rivers.

13.4.1.2 Sludges, Sediments and Wastes

Since the sludges from WWTPs will end up in landfill, incineration plants or applied to agricultural soils, the determination of the nanoparticle concentrations in these samples is also relevant. Due to the high ratio of dissolved *vs.* particulate elements, as well as the interactions of the nanoparticles with the matrix, sludge samples are processed in different ways to extract the metal-containing nanoparticles prior to SP-ICP-MS analysis. Tou *et al.*[37] used acetic acid and analysed the extracts by SP-ICP-MS. Results showed that billions of Ti-, Fe- and Zn-containing nanoparticles per gram of sludge were extracted, suggesting that these nanoparticles could be released into the environment under acidic environmental conditions. Ion exchange resins have been used for removing more than 50% of the dissolved fraction of the metals, allowing the detection of smaller nanoparticles.[34]

A challenge in the analysis of environmental samples is the distinction between natural and engineered particles. Loosli *et al.*[38] analysed sewage sludge using a time-of-flight (TOF) instrument that allows multi-element detection and the determination of element ratios in individual particles. Their results revealed that natural TiO_2 particles were associated with elements like Al, Fe, Ce, Si, La, Zr, Nb, Ba, Th, Ta, W and U, with elemental ratios to Ti in agreement with average crustal ratios, whereas the presence of engineered TiO_2 particles was demonstrated and quantified by the Ti/Nb ratio.

In addition to the analysis of sludges, the impact of WWTPs can be monitored through the analysis of sediments close to WWTP discharge points. Metcalfe *et al.*[39] monitored Ag nanoparticles in sediments from a receiving lake, and determined whether silver could be released from such contaminated sediments. The results showed that most silver was associated with bottom and suspended sediments, although the element could be released both in the colloidal and dissolved fractions. These results demonstrated that contaminated sediments could be a continuing source of silver in the aquatic environment if sediments are re-suspended by currents, contributing to the exposure of aquatic organisms to silver.

Tou *et al.*[40] studied the occurrence and environmental implications of Ti- and Zn-containing nanoparticles in estuarine sediments, by applying different extraction methods and analysing the fractions extracted by SP-ICP-MS. Their results demonstrated that Ti-containing nanoparticles were mainly derived from the non-bioavailable fraction, which is considered safe according to conventional risk assessment methods. On the contrary, Zn-containing nanoparticles were mainly found in the bioavailable fraction, indicating a significant environmental risk from this element, which was the most abundant toxic metal found in the sediments.

As a consequence of mining activities, particles containing toxic elements can act as transport vectors of such elements, as it was demonstrated by Gomez-Gonzalez *et al.*[41] by analysing mine tailing wastes containing arsenic by SP-ICP-MS in combination with synchrotron techniques. Their study confirmed that arsenic was released as colloidal scorodite, a poorly soluble iron(III) arsenate, which was originally considered a stable form of arsenic in the environment.

13.4.1.3 Microorganisms and Aquatic Organisms

Nanoparticles released in the environment can accumulate in biota, biomagnifying along the food chain. The trophic transfer of Ag- and Ti-containing nanoparticles was investigated in a lake catchment by analysing water, sediments and aquatic organisms (plankton, crustaceans, molluscs and fishes) by SP-ICP-MS.[42] For the aquatic organisms, an alkaline digestion with tetramethylammonium hydroxide (TMAH) was used to extract nanoparticulate Ag and Ti. Results indicated that both types of particles were widely present in water and sediments, as well as in aquatic organisms, confirming the transfer of nanoparticulate Ag and Ti along the aquatic food chain. Similar studies demonstrated the presence of Ag-[43,44] and Ti-containing particles[45] in fishes and molluscs analysed by SP-ICP-MS.

The bioaccumulation of nanoparticles was also demonstrated by Xu *et al.*,[46] who analysed seawater and molluscs by SP-ICP-MS. Whereas seawater samples were analysed after dilution, molluscs were subjected to enzymatic digestion with pancreatin and lipase. Results indicated that particle concentration of Ti-, Cu-, Zn- and Ag-containing nanoparticles in molluscs were much higher than in the seawater, suggesting the bioaccumulation of the nanoparticles.

13.4.2 Laboratory Tests Involving Nanoparticles or Products Containing Nanoparticles

Whereas the analysis of environmental samples allows the occurrence of nanoparticles in the ecosystems to be known, as well as the exposure level of the organisms living in them, laboratory studies under relevant environmental conditions are used for simulating the release and fate of nanoparticles and their transformation products to understand their potential environmental risk.

13.4.2.1 Release Studies

The detection and characterization of the nanoparticles released from nano-enabled products under selected conditions is a common practice for predicting the environmental occurrence and exposure level to nanoparticles. Release studies based on the leaching of the nanoparticle-containing material with different types of waters are typically performed. Although ultrapure water has been used in some cases,[47,48] natural and model waters (*e.g.*, seawater,[49] freshwater,[49,50] acidic rainwater[49]) have also been used. More specific studies involved the use of stormwater runoff[51] and rain and snow waters under weathering conditions.[52] The studied materials included painted surfaces, in relation to the release of TiO_2[52] and Cu_2O[50] additives, TiO_2 and Ag enhanced textiles[47,53] or Cu-treated woods.[48] Road dust has been studied in relation to the emission of Pt-containing particles from vehicle catalysts.[51] Release studies by using SP-ICP-MS have not only been limited to inorganic particles, the technique has been used to confirm the release of incidental microplastics from consumer products by monitoring ^{13}C.[54] In these studies, sample preparation is limited to the separation by settling, filtration or centrifugation and the adequate dilution of the filtrate or the supernatant prior to SP-ICP-MS measurements for detection and size characterization of the particles released, as well as their quantification.

13.4.2.2 Fate Studies

In addition to the release of nanoparticles, the study of their stability and the transformations they undergo under environmental conditions (dissolution/oxidation, aggregation, *etc.*) is needed to evaluate their potential risk. SP-ICP-MS has proved to be an effective technique to evaluate the fate of nanoparticles in environmental conditions, because changes in size, size distribution and concentration can be monitored. In addition, the technique allows the quantification of both the particulate and the dissolved fractions of the element monitored, providing information about the dissolution of the nanoparticles.

A number of laboratory studies have been carried out to evaluate the changes that occurred when particles are brought into contact with natural waters,[55–59] soils[60–63] or sediments.[63,64] Sludges and wastewaters have also been considered to study the fate of nanoparticles in WWTPs.[65,66] Although

some studies considered the effects on Au,[59,63,67] TiO_2[59,61] or CeO_2,[60,61] most of them involved metallic Ag[56–59,64–67] or Ag-based nanoparticles (Ag_2S, AgCl).[55] These studies have shown that the behaviour of nanoparticles is influenced by their size, shape, chemical composition, coating and their initial concentration, as well as external conditions, such as temperature, pH or the presence of organic matter or chlorides.

Jimenez-Lamana *et al.*[56] studied the stability of Ag nanoparticles in lake water, showing that agglomeration depended on the surface coating, although natural organic matter improved their stability regardless of the coating. Wimmer *et al.*[55] confirmed that citrate coated Ag, AgCl and even Ag_2S nanoparticles were almost completely dissolved at environmental relevant concentrations in seawater within three days. They used SP-ICP-MS in combination with cloud point extraction for concentration and isolation of nanoparticles from dissolved silver species. The fate of Ag nanoparticles in wastewater was investigated by Azodi *et al.*,[66] confirming their dissolution followed by the subsequent formation of smaller Ag nanoparticles containing sulfur after 5 days. Donovan *et al.*[59] studied the effectiveness of conventional drinking water treatments to remove Au, Ag and TiO_2 nanoparticles from surface waters by using SP-ICP-MS. Their results indicated that lime softening removed most of the nanoparticles, whereas further treatment by alum coagulation combined with activated carbon adsorption resulted in complete removal of Au and Ag nanoparticles, and nearly complete removal of TiO_2 nanoparticles.

Soil studies involve the extraction of the nanoparticles prior to their detection by SP-ICP-MS. Apart from water,[61,62] tetrasodium pyrophosphate (TSPP) has also been used as an extracting agent.[60,64] Yang *et al.*[61] demonstrated that after long term incubation of soils with ZnO, TiO_2, CeO_2 and Ag nanoparticles, less than 1% of the TiO_2, CeO_2 and Ag nanoparticles were released into water, whereas zinc was only released in dissolved forms. Torrent *et al.*[62] also studied the adsorption and desorption of Ag nanoparticles in soils, confirming the high retention of Ag nanoparticles in the soils studied, as well as the release of dissolved silver. In the case of CeO_2 nanoparticles, Liu *et al.*[60] observed no significant change in particle size and concentration in soils aged for one month. The results obtained by El Hadri *et al.*,[63] using Au nanoparticles as model nanomaterial, suggests that the transport of engineered nanoparticles in soils and sediments is limited due to their hetero-aggregation with soil colloids.

13.4.3 *In Vitro* and *In Vivo* Ecotoxicological Tests

The bioaccumulation and toxicity of nanoparticles are processes still poorly understood, making *in vitro* and *in vivo* ecotoxicological tests worth studying in order to assess the behaviour and effects of engineered nanoparticles on living organisms. The use of SP-ICP-MS in this context is hampered by the complexity of the biological matrices involved and the need to extract the nanoparticles and their transformation products by using reliable digestion methods.

13.4.3.1 In Vitro *Studies*

In relation to the risk assessment of nanomaterials, different species of bacteria and algae have been investigated to study the uptake, biotransformation and ecotoxicity of nanoparticles under *in vitro* controlled conditions.

Mixtures of TiO_2, ZnO and Ag nanoparticles were added to artificial treated wastewater mixed with river water to evaluate the effect of nanoparticles on the river bacterial community.[68] After exposure, water samples were analysed by SP-ICP-MS to quantify the concentration of nanoparticles and dissolved species and to determine the mean size and size distributions of nanoparticles. Gomez-Gomez *et al.*[69] studied the uptake and biotransformation of Te nanoparticles by strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. A biotransformation from nanospheres to nanorods was confirmed by TEM and X-ray diffraction (XRD), whereas SP-ICP-MS was used after lysis of the bacteria to determine the number of particles per bacteria and to estimate the dimensions of the rod-shaped Te nanoparticles, confirming the accumulation of nanoparticles in the microorganisms.

In addition to the bacterial strains, algae have also been used for *in vitro* ecotoxicity tests. The model green algae *Chlamydomonas reinhardtii* was studied in a wastewater matrix to assess its interaction with Ag nanoparticles.[70] SP-ICP-MS was used to differentiate the dissolved fraction from nanoparticles, to quantify the bio-uptake of both silver species and to monitor the aggregation and dissolution of the nanoparticles. Dissolved silver bioavailability was decreased because of the water matrix and the presence of ligands, nonetheless Ag nanoparticles were more bioavailable to algae.

The ecotoxicity of chromium to the algae *Raphidocelis subcapitata* was investigated by the addition of Cr(III) and Cr(VI) to the International Organization for Standardization (ISO) medium for algal ecotoxicity testing.[71] SP-ICP-MS enabled the detection of incidental Cr-bearing nanoparticles after the addition of soluble Cr(III), linking the ecotoxicity to the presence of nanoparticles and/or ionic chromium. SP-ICP-MS was also used for the size determination of the biogenic nanoparticles produced by the algae *Aureobasidium pullulans*, which was incubated for 30 days in a culture media containing selenium and tellurium.[72]

13.4.3.2 In Vivo *Studies*

The assessment of nanoparticle ecotoxicity in terrestrial environments has been conducted by studying their uptake, bioaccumulation and impact on model soil organisms. These studies involved the spiking of soils and sediments with pristine nanoparticles, such as Ag,[73–75] Au[73,76] and CuO.[77,78] Model soil organisms included earthworms like *Lumbriculus variegatus*,[73,74] *Lumbricus rubellus*,[75] *Caenorhabditis elegans*[76] and *Eisenia andrei*[78] and the springtail *Folsomia candida*.[77,78] Apart from water extraction,[74] as earthworms are complex biological matrices, enzymatic[75] and alkaline[73,76] digestions were used prior to SP-ICP-MS analysis.

Size and coating had a minimal effect on the bioaccumulation of Ag nanoparticles in earthworms when added to sediments, whereas small

nanoparticles were more bioavailable from waters.[74] SP-ICP-MS served for quantification of the body burden, but also for the speciation of dissolved/nanoparticulate Ag accumulated in the earthworm tissue, being mainly present as dissolved forms.[75] SP-ICP-MS was also used for the quantification of Au nanoparticle uptake by *Caenorhabditis elegans* and the study of their biotransformation and aggregation in the gut.[76] Soil texture and nanoparticle concentration were reported to induce toxicity of CuO nanoparticles on *Folsomia candida*,[77] affecting their reproduction and growth at low concentrations in a loamy soil. Whereas in this study the toxicity was attributed to the particulate forms of CuO, in the work by Velicogna *et al.*,[78] the toxicity was related to the dissolution of the nanoparticles.

Ecotoxicological assays with Ag, Au, CeO_2 and TiO_2 in aquatic environments have been investigated using a variety of fish species, such as zebra fish (*Danio rerio*),[79,80] trout (*Oncorhynchus mykiss*),[81,82] and northern pike (*Esox lucius*),[57] as well as other aquatic model organisms, like the planktonic crustacean *Daphnia magna*,[73,83] the amphipod *Hyalella azteca*[84,85] and the mussel *Mytilus galloprovincialis*.[86] The uptake of nanoparticles by these organisms was performed by SP-ICP-MS after enzymatic or alkaline digestion tissues, although the hemolymph of *Daphnia magna* was analysed directly.[83] The *in vivo* formation of TiO_2 nanoparticles in mussels after titanium exposure was also confirmed by SP-ICP-MS.[86]

The development of nanofertilisers for agriculture and the environmental exposure of plants to engineered nanoparticles has led to several *in vivo* studies with edible plants (tomato, pumpkin, soybean, cucumber, cress, mustard, lettuce, kale, wheat, rice, radish). These studies mainly consisted of the germination and growth of the plant seeds in a growing medium (hydroponic solutions[87–96] or soils[97–102]) spiked with different types and concentrations of nanoparticles (Au,[88,90,97] Ag,[88,89,91,99,101] Ag_2S,[87] Cu,[101] CeO_2,[92,98,102] $CuO/Cu(OH)_2$,[92,103,104] TiO_2,[92–94] Pd,[95] Pt,[100] ZnO[96,101]). Nanoparticle uptake by roots and translocation to leaves was evaluated by the analysis of the roots, leaves and fruits of the plants.[87,91,94,100] In the case of Ag nanoparticles, their uptake was affected by the size and concentration of the nanoparticles, with small-sized nanoparticles more easily absorbed.[89] The detection by SP-ICP-MS of biogenic nanoparticles in leaves after exposure to ionic silver has also been reported.[91] Foliar exposure to nanoparticles has also been studied for Ag nanoparticles,[91] whose transformation to ionic silver was reported, and CuO nanoparticles, which were retained on the leaf surface.[103,104] However, Wang *et al.*[87] reported the uptake of Ag_2S nanoparticles by edible plants and their translocation to leaves without transformation or dissolution.

Analysis of plant tissues by SP-ICP-MS involves in most cases their enzymatic digestion with macerozyme R-10 to break down vegetal cells while preserving nanoparticle characteristics,[87–91,93–101,104] although other extraction procedures have been proposed, as natural deep eutectic solvents for CeO_2, TiO_2 and CuO extraction from radish[92] or the use of methanol for the extraction of copper-based nanoparticles from lettuce leaves to avoid their dissolution.[103]

13.5 Benefits and Limitations of SP-ICP-MS in Environmental Analysis

In spite of the features of SP-ICP-MS, solving analytical problems involving nanoparticles in environmental samples is a complex task that requires the combination of different analytical techniques in most cases. The simplest approach is based on the use of ICP-MS, both in standard and single particle modes, in conjunction with an electron microscopy technique (*e.g.*, TEM-EDS). Standard ICP-MS allows the determination of the total content of the element, whereas TEM-EDS allows the visualization of the particles, providing information about the morphology and composition if their concentration is not too low. In most cases, the nature of the nanoparticles detected by SP-ICP-MS is unknown, being described as element-containing particles, characterised by their element mass content per particle or an equivalent diameter by assuming a specific composition.

On the other hand, when the samples contain nanoparticles below the attainable size (or element mass per particle) LOD, the nanoparticle population will be partially recorded and the average size information will be overestimated, whereas the number concentrations will be underestimated. Under such constraints, the size and concentration information reported cannot be considered quantitative and should be restricted to confirm the presence of nanoparticles containing the element measured over a certain equivalent diameter and number concentration.

Although the implementation of SP-ICP-MS in commercial instruments by most ICP-MS manufacturers can be considered the key to the success of the technique, SP-ICP-MS is still on its way to become a mature technique, hindered by issues like the availability of validated methods and the traceability of their results, both of them conditioned by the availability of reference materials. In any case, the number of users and environmental applications is steadily increasing, mainly because the nano-environmental community is aware that SP-ICP-MS methods are both selective and sensitive enough to analyse inorganic nanomaterials in complex environmental samples.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities and the European Regional Development Fund, project RTI2018-096111-B-I00 (MICINN/FEDER) and the Department of Science, University and Knowledge Society of the Regional Government of Aragon, project E29_20R.

K. B. -J. thanks funding from the EU Horizon 2020 programme under the Marie Sklowdowska-Curie grant agreement no. 801586. A. C. G. thanks the Government of Aragón for a predoctoral contract.

References

1. S. J. Klaine, P. J. J. Alvarez, G. E. Batley, T. F. Fernandes, R. D. Handy, D. Y. Lyon, S. Mahendra, M. J. McLaughlin and J. R. Lead, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2008, **27**, 1825–1851.
2. J. R. Lead, G. E. Batley, P. J. J. Alvarez, M. N. Croteau, R. D. Handy, M. J. McLaughlin, J. D. Judy and K. Schirmer, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2018, **37**, 2029–2063.
3. M. Zhang, J. Yang, Z. Cai, Y. Feng, Y. Wang, D. Zhang and X. Pan, *Environ. Sci.: Nano*, 2019, **6**, 709–735.
4. J. A. Gallego-Urrea, J. Tuoriniemi and M. Hassellöv, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2011, **30**, 473–483.
5. F. Von Der Kammer, S. Legros, T. Hofmann, E. H. Larsen and K. Loeschner, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2011, **30**, 425–436.
6. F. Laborda, E. Bolea and J. Jiménez-Lamana, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 2270–2278.
7. F. Laborda, E. Bolea and J. Jiménez-Lamana, *Trends Environ. Anal. Chem.*, 2016, **9**, 15–23.
8. M. D. Montaño, J. W. Olesik, A. G. Barber, K. Challis and J. F. Ranville, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 5053–5074.
9. K. Flores, R. S. Turley, C. Valdes, Y. Ye, J. Cantu, J. A. Hernandez-Viezcas, J. G. Parsons and J. L. Gardea-Torresdey, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2019, 1–26.
10. D. Mozhayeva and C. Engelhard, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2020, **35**, 1740–1783.
11. F. Laborda, A. C. Gimenez-Ingalaturre, E. Bolea and J. R. Castillo, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2020, **169**, 105883.
12. E. Bolea, M. S. Jimenez, J. Perez-Arantegui, J. C. Vidal, M. Bakir, K. Ben-Jeddou, A. C. Gimenez-Ingalaturre, D. Ojeda, C. Trujillo and F. Laborda, *Anal. Methods*, 2021, **13**, 2742–2795.
13. M. D. Montaño, F. Von Der Kammer, C. W. Cuss and J. F. Ranville, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2019, **34**, 1768–1772.
14. C. Degueldre and P.-Y. Favarger, *Colloids Surf., A*, 2003, **217**, 137–142.
15. F. Laborda, J. Jiménez-Lamana, E. Bolea and J. R. Castillo, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2011, **26**, 1362–1371.
16. LGC, *Statement of measurement, Colloidal gold nanoparticles – nominal diameter 30 nmQuality Control Material LGCQC5050*, 2020.
17. H. E. Pace, N. J. Rogers, C. Jarolimek, V. A. Coleman, C. P. Higgins and J. F. Ranville, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 9361–9369.
18. S. Cuello-Nuñez, I. Abad-Álvaro, D. Bartczak, M. E. del Castillo Busto, D. A. Ramsay, F. Pellegrino and H. Goenaga-Infante, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2020, **35**, 1832–1839.
19. F. Laborda, A. C. Gimenez-Ingalaturre and E. Bolea, in *Analysis and Characterisation of Metal-Based Nanomaterials*, ed. R. Milacic, J. Scancar, J. Vidmar and H. Goenaga-Infante, Elsevier, 1st edn, 2021.
20. S. Weigel, R. Peters, K. Loeschner, R. Grombe and T. P. J. Linsinger, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2017, **409**, 4839–4848.

21. I. Abad-Álvaro, E. Peña-Vázquez, E. Bolea, P. Bermejo-Barrera, J. R. Castillo and F. Laborda, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 5089–5097.
22. K.-S. Ho, K.-O. Lui, K.-H. Lee and W.-T. Chan, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2013, **89**, 30–39.
23. M. Loula, A. Kaňa, R. Koplík, J. Hanuš, M. Vosmanská and O. Mestek, *Anal. Lett.*, 2019, **52**, 288–307.
24. R. Peters, Z. Herrera-Rivera, A. Undas, M. Van Der Lee, H. Marvin, H. Bouwmeester and S. Weigel, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2015, **30**, 1274–1285.
25. J. W. Olesik and P. J. Gray, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2012, **27**, 1143–1155.
26. A. P. Gondikas, F. Von Der Kammer, R. B. Reed, S. Wagner, J. F. Ranville and T. Hofmann, *Environ. Sci. Technol.*, 2014, **48**, 5415–5422.
27. A. Gondikas, F. von der Kammer, R. Kägi, O. Borovinskaya, E. Neubauer, J. Navratilova, A. Praetorius, G. Cornelis and T. Hofmann, *Environ. Sci.: Nano*, 2017, **5**, 313–326.
28. R. B. Reed, D. P. Martin, A. J. Bednar, M. D. Montaño, P. Westerhoff and J. F. Ranville, *Environ. Sci.: Nano*, 2017, **4**, 69–77.
29. A. K. Venkatesan, R. B. Reed, S. Lee, X. Bi, D. Hanigan, Y. Yang, J. F. Ranville, P. Herckes and P. Westerhoff, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2018, **100**, 120–126.
30. L. N. Rand, Y. Bi, A. Poustie, A. J. Bednar, D. J. Hanigan, P. Westerhoff and J. F. Ranville, *Sci. Total Environ.*, 2020, **743**, 140845.
31. R. Kaegi, A. Englert, A. Gondikas, B. Sinnet, F. von der Kammer and M. Burkhardt, *NanoImpact*, 2017, **8**, 73–79.
32. A. K. Venkatesan, B. T. Rodríguez, A. R. Marcotte, X. Bi, J. Schoepf, J. F. Ranville, P. Herckes and P. Westerhoff, *Environ. Sci. Water Res. Technol.*, 2018, **4**, 1923–1932.
33. A. Wimmer, J. Beyerl and M. Schuster, *Environ. Sci. Technol.*, 2019, **53**, 13293–13301.
34. P. Cervantes-Avilés and A. A. Keller, *Water Res.*, 2021, **189**, 116603.
35. Y. Huang, A. A. Keller, P. Cervantes-Avilés and J. Nelson, *ACS ES&T Water*, 2021, **1**, 205–213.
36. L. Li, M. Stoiber, A. Wimmer, Z. Xu, C. Lindenblatt, B. Helmreich and M. Schuster, *Environ. Sci. Technol.*, 2016, **50**, 6327–6333.
37. F. Tou, Y. Yang, J. Feng, Z. Niu, H. Pan, Y. Qin, X. Guo, X. Meng, M. Liu and M. F. Hochella, *Environ. Sci. Technol.*, 2017, **51**, 4831–4840.
38. F. Loosli, J. Wang, S. Rothenberg, M. Bizimis, C. Winkler, O. Borovinskaya, L. Flamigni and M. Baalousha, *Environ. Sci.: Nano*, 2019, **6**, 763–777.
39. C. D. Metcalfe, T. Sultana, J. Martin, K. Newman, P. Helm, S. Kleywegt, L. Shen and V. Yargeau, *Environ. Monit. Assess.*, 2018, **190**, 555.
40. F. Tou, J. Wu, J. Fu, Z. Niu, M. Liu and Y. Yang, *Sci. Total Environ.*, 2021, **754**, 142388.
41. M. A. Gomez-Gonzalez, E. Bolea, P. A. O'Day, J. Garcia-Guinea, F. Garrido and F. Laborda, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 5125–5135.
42. B. Xiao, Y. Zhang, X. Wang, M. Chen, B. Sun, T. Zhang and L. Zhu, *Environ. Sci.: Nano*, 2019, **6**, 3431–3441.

43. A. Grasso, M. Ferrante, G. Arena, R. Salemi, P. Zuccarello, M. Fiore and C. Copat, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2021, **18**, 4076.
44. M. V. Taboada-López, N. Alonso-Seijo, P. Herbello-Hermelo, P. Bermejo-Barrera and A. Moreda-Piñeiro, *Microchem. J.*, 2019, **148**, 652–660.
45. M. V. Taboada-López, S. Iglesias-López, P. Herbello-Hermelo, P. Bermejo-Barrera and A. Moreda-Piñeiro, *Anal. Chim. Acta*, 2018, **1018**, 16–25.
46. L. Xu, Z. Wang, J. Zhao, M. Lin and B. Xing, *Environ. Pollut.*, 2020, **260**, 114043.
47. A. Mackevica, M. E. Olsson and S. F. Hansen, *J. Nanopart. Res.*, 2018, **20**, 6.
48. R. S. Lankone, K. Challis, L. Pourzahedi, D. P. Durkin, Y. Bi, Y. Wang, M. A. Garland, F. Brown, K. Hristovski, R. L. Tanguay, P. Westerhoff, G. Lowry, L. M. Gilbertson, J. Ranville and D. H. Fairbrother, *Sci. Total Environ.*, 2019, **668**, 234–244.
49. Y.-S. Zimmermann, A. Schäffer, P. F.-X. Corvini and M. Lenz, *Environ. Sci. Technol.*, 2013, **47**, 13151–13159.
50. A. S. Adeleye, E. A. Oranu, M. Tao and A. A. Keller, *Water Res.*, 2016, **102**, 374–382.
51. K. Folens, T. Van Acker, E. Bolea-Fernandez, G. Cornelis, F. Vanhaecke, G. Du Laing and S. Rauch, *Sci. Total Environ.*, 2018, **615**, 849–856.
52. A. Azimzada, J. M. Farner, M. Hadioui, C. Liu-Kang, I. Jreije, N. Tufenkji and K. J. Wilkinson, *Environ. Sci.: Nano*, 2020, **7**, 139–148.
53. D. M. Mitrano, E. Lombi, Y. A. R. Dasilva and B. Nowack, *Environ. Sci. Technol.*, 2016, **50**, 5790–5799.
54. F. Laborda, C. Trujillo and R. Lobinski, *Talanta*, 2021, **221**, 121486.
55. A. Wimmer, A. Urstoeger, N. C. Funck, F. P. Adler, L. Lenz, M. Doeblinger and M. Schuster, *Water Res.*, 2020, **171**, 115399.
56. J. Jiménez-Lamana and V. I. Slaveykova, *Sci. Total Environ.*, 2016, **573**, 946–953.
57. J. D. Martin, P. C. Frost, H. Hintelmann, K. Newman, M. J. Paterson, L. Hayhurst, M. D. Rennie, M. A. Xenopoulos, V. Yargeau and C. D. Metcalfe, *Environ. Sci. Technol.*, 2018, **52**, 11114–11122.
58. C. Toncelli, K. Mylona, M. Tsapakis and S. A. Pergantis, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2016, **31**, 1430–1439.
59. A. R. Donovan, C. D. Adams, Y. Ma, C. Stephan, T. Eichholz and H. Shi, *Chemosphere*, 2016, **144**, 148–153.
60. W. Liu, H. Shi, K. Liu, X. Liu, E. Sahle-Demessie and C. Stephan, *J. Agric. Food Chem.*, 2021, **69**, 1115–1122.
61. Y. Yang, X. Bi, P. Westerhoff, K. Hristovski and J. E. McLain, *Environ. Eng. Sci.*, 2014, **31**, 381–392.
62. L. Torrent, E. Marguí, I. Queralt, M. Hidalgo and M. Iglesias, *J. Environ. Sci.*, 2019, **83**, 205–216.
63. H. El Hadri, S. M. Louie and V. A. Hackley, *Environ. Sci.: Nano*, 2018, **5**, 203–214.
64. L. Li, Q. Wang, Y. Yang, L. Luo, R. Ding, Z. G. Yang and H. P. Li, *Anal. Chem.*, 2019, **91**, 9442–9450.

65. L. Telgmann, M. T. K. Nguyen, L. Shen, V. Yargeau, H. Hintelmann and C. D. Metcalfe, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 5169–5177.
66. M. Azodi, Y. Sultan and S. Ghoshal, *Environ. Sci. Technol.*, 2016, **50**, 13318–13327.
67. K. Proulx and K. J. Wilkinson, *Environ. Chem.*, 2014, **11**, 392–401.
68. N. Londono, A. R. Donovan, H. Shi, M. Geisler and Y. Liang, *Chemosphere*, 2019, **230**, 567–577.
69. B. Gomez-Gomez, M. Corte-Rodríguez, M. T. Perez-Corona, J. Bettmer, M. Montes-Bayón and Y. Madrid, *Anal. Chim. Acta*, 2020, **1128**, 116–128.
70. A. Azimzada, N. Tufenkji and K. J. Wilkinson, *Environ. Sci.: Nano*, 2017, **4**, 1339–1349.
71. I. Aharchaou, J. S. Py, S. Cambier, J. L. Loizeau, G. Cornelis, P. Rousselle, E. Battaglia and D. A. L. Vignati, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2018, **37**, 983–992.
72. K. C. Nwoko, X. Liang, M. A. Perez, E. Krupp, G. M. Gadd and J. Feldmann, *J. Chromatogr. A*, 2021, **1642**, 462022.
73. E. P. Gray, J. G. Coleman, A. J. Bednar, A. J. Kennedy, J. F. Ranville and C. P. Higgins, *Environ. Sci. Technol.*, 2013, **47**, 14315–14323.
74. J. G. Coleman, A. J. Kennedy, A. J. Bednar, J. F. Ranville, J. G. Laird, A. R. Harmon, C. A. Hayes, E. P. Gray, C. P. Higgins, G. Lotufo and J. A. Steevens, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2013, **32**, 2069–2077.
75. S. Makama, R. Peters, A. Undas and N. W. van den Brink, *Environ. Chem.*, 2015, **12**, 643.
76. M. E. Johnson, S. K. Hanna, A. R. Montoro Bustos, C. M. Sims, L. C. C. Elliott, A. Lingayat, A. C. Johnston, B. Nikoobakht, J. T. Elliott, R. D. Holbrook, K. C. K. Scott, K. E. Murphy, E. J. Petersen, L. L. Yu and B. C. Nelson, *ACS Nano*, 2017, **11**, 526–540.
77. J. Fischer, A. Evlanova, A. Philippe and J. Filser, *Environ. Pollut.*, 2021, **270**, 116084.
78. J. R. Velicogna, D. Schwertfeger, A. Jesmer, C. Beer, J. Kuo, M. C. DeRosa, R. Scroggins, M. Smith and J. Princz, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2021, **217**, 112222.
79. H. K. Sung, E. Jo, E. Kim, S. Yoo, J. Lee, P. Kim, Y. Kim and I.-C. Eom, *Chemosphere*, 2018, **209**, 815–822.
80. F. Abdolahpur Monikh, L. Chupani, E. Zusková, R. Peters, M. Vancová, M. G. Vijver, P. Porcal and W. J. G. M. Peijnenburg, *Environ. Sci. Technol.*, 2019, **53**, 946–953.
81. N. J. Clark, R. Clough, D. Boyle and R. D. Handy, *Environ. Sci.: Nano*, 2019, **6**, 3388–3400.
82. N. J. Clark, R. Clough, D. Boyle and R. D. Handy, *Environ. Sci.: Nano*, 2021, **8**, 1642–1653.
83. L. D. Scanlan, R. B. Reed, A. V. Loguinov, P. Antczak, A. Tagmount, S. Aloni, D. T. Nowinski, P. Luong, C. Tran, N. Karunaratne, D. Pham, X. X. Lin, F. Falciani, C. P. Higgins, J. F. Ranville, C. D. Vulpe and B. Gilbert, *ACS Nano*, 2013, **7**, 10681–10694.

84. S. Kuehr, J. Klehm, C. Stehr, M. Menzel and C. Schlechtriem, *NanoImpact*, 2020, **19**, 100239.
85. S. Kuehr, R. Kaegi, D. Maletzki and C. Schlechtriem, *Chemosphere*, 2021, **263**, 127961.
86. F. Gallocchio, G. Biancotto, A. Moressa, F. Pascoli, T. Pretto, A. Toffan, G. Arcangeli, F. Montesi, R. Peters and A. Ricci, *Food Chem.*, 2020, **323**, 126841.
87. P. Wang, E. Lombi, S. Sun, K. G. Scheckel, A. Malysheva, B. A. McKenna, N. W. Menzies, F.-J. Zhao and P. M. Kopittke, *Environ. Sci.: Nano*, 2017, **4**, 448–460.
88. W. Y. Zhang, Q. Wang, M. Li, F. Dang and D. M. Zhou, *Nanotoxicology*, 2019, **13**, 1073–1086.
89. L. Torrent, M. Iglesias, E. Marguí, M. Hidalgo, D. Verdaguer, L. Llorens, A. Kodre, A. Kavčič and K. Vogel-Mikuš, *J. Hazard. Mater.*, 2020, **384**, 121201.
90. W.-J. Wei, L. Li, Y.-P. Gao, Q. Wang, Y.-Y. Zhou, X. Liu and Y. Yang, *Sci. Total Environ.*, 2021, 777, 146038.
91. C. C. Li, F. Dang, M. Li, M. Zhu, H. Zhong, H. Hintelmann and D. M. Zhou, *Nanotoxicology*, 2017, **11**, 699–709.
92. M. Jakubowska and L. Ruzik, *Anal. Biochem.*, 2021, **617**, 114117.
93. Y. Deng, E. J. Petersen, K. E. Challis, S. A. Rabb, R. D. Holbrook, J. F. Ranville, B. C. Nelson and B. Xing, *Environ. Sci. Technol.*, 2017, **51**, 10615–10623.
94. J. Wojcieszek, J. Jiménez-Lamana, L. Ruzik, M. Asztemborska, M. Jarosz and J. Szpunar, *Front. Environ. Sci.*, 2020, **8**, 1–12.
95. K. Kińska, J. Jiménez-Lamana, J. Kowalska, B. Krasnodębska-Ostręga and J. Szpunar, *Sci. Total Environ.*, 2018, **615**, 1078–1085.
96. J. Wojcieszek, J. Jiménez-Lamana, K. Bierla, M. Asztemborska, L. Ruzik, M. Jarosz and J. Szpunar, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2019, **34**, 683–693.
97. Y. Dan, W. Zhang, R. Xue, X. Ma, C. Stephan and H. Shi, *Environ. Sci. Technol.*, 2015, **49**, 3007–3014.
98. Y. Dan, X. Ma, W. Zhang, K. Liu, C. Stephan and H. Shi, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, 5157–5167.
99. D. Bao, Z. G. Oh and Z. Chen, *Front. Plant Sci.*, 2016, **7**, 1–8.
100. J. Jiménez-Lamana, J. Wojcieszek, M. Jakubiak, M. Asztemborska and J. Szpunar, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2016, **31**, 2321–2329.
101. J. Nath, I. Dror, P. Landa, T. Vanek, I. Kaplan-Ashiri and B. Berkowitz, *Environ. Pollut.*, 2018, **242**, 1827–1837.
102. D. Lizzi, A. Mattiello, B. Piani, E. Gava, G. Fellet and L. Marchiol, *Nanomaterials*, 2021, **11**, 229.
103. S. Laughton, A. Laycock, F. von der Kammer, T. Hofmann, E. A. Casman, S. M. Rodrigues and G. V. Lowry, *J. Nanopart. Res.*, 2019, **21**, 174.
104. A. A. Keller, Y. Huang and J. Nelson, *J. Nanopart. Res.*, 2018, **20**, 101.