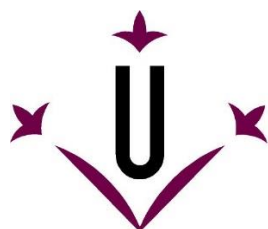




Universidad
Zaragoza



Universitat
de Lleida

Trabajo Fin de Máster

Estudio de la adsorción de sustancias macromoleculares sobre nanopartículas de ZnO y TiO_2

Autor

David Ojeda Asensio

Director/es

Carlos Rey Castro

Calin Adrian David

Ponente

Juan Ramón Castillo Suárez

Máster en Nanotecnología Ambiental / Universidad de Zaragoza

2014 / 2015

RESUMEN

Las nanopartículas de óxidos metálicos están siendo incorporadas en una amplia cantidad de productos de consumo expuestos al medio ambiente. Su comportamiento en aguas naturales y en fluidos biológicos es una incógnita de mucha relevancia para posteriores estudios sobre el impacto ambiental y toxicológico que puedan conllevar. En el presente trabajo se emplean dos de los más representativos tipos de estas nanopartículas, las de óxido de zinc (ZnO NPs) y las de dióxido de titanio (TiO₂ NPs), para analizar su interacción con dos componentes orgánicos naturales, la albúmina de suero bovino (BSA) y el ácido húmico (HA), en función de unos determinados parámetros físico-químicos. Factores como el pH del medio, las concentraciones de los componentes y la fuerza iónica son considerados para analizar su influencia sobre la estabilidad de los sistemas coloidales y la adsorción de materia orgánica (MO) sobre su superficie, produciendo la formación de coronas. Los resultados demuestran la importancia del pH del medio para las cantidades de MO adsorbida en las NPs, puesto que determinan las cargas superficiales de cada componente. Contra más ácidas sean las condiciones del medio mejores son las interacciones para la formación de coronas, mientras que conforme va aumentando el pH se produce una constante disminución de la capacidad de adsorción, llegando incluso a inhibirse. En cambio, los procesos de estabilidad coloidal parecen depender más de la fuerza iónica del medio que del pH. Si es lo suficientemente grande, la fuerza iónica produce unos apantallamientos en las cargas superficiales determinantes en el comportamiento y destino de los coloides. No obstante, otros factores como la concentración de MO o de nanopartículas, así como su propia naturaleza pueden tener importantes roles en función de determinadas condiciones del medio estudiado. En cualquier caso, tanto la formación de coronas como la estabilidad del sistema coloidal dependen siempre de las cargas electrostáticas de sus componentes, que en base a su carácter atractivo o repulsivo describirán el comportamiento que puedan tener en el entorno.

Palabras clave: *nanopartícula, TiO₂, ZnO, ácido húmico, HA, albúmina de suero bovino, BSA, estabilidad coloidal, isoterma, adsorción, cinética, agregación.*

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	2
ÍNDICE DE CONTENIDOS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	4
INTRODUCCIÓN	8
1. Nanomateriales en la actualidad.....	8
2. Nanopartículas de ZnO y TiO ₂	9
3. Factores que influyen en la estabilidad, solubilidad y transporte en medios acuosos.....	10
3.1. Estabilidad coloidal.....	11
3.2. Parámetros físico-químicos de las NPs.....	12
3.3. Factores del medio acuoso.....	13
3.4. Coronas macromoleculares.....	14
4. Relevancia para posteriores estudios: biodisponibilidad y toxicidad	15
OBJETIVOS Y ESTRUCTURA	16
MATERIAL Y MÉTODOS	16
1. Material	16
1.1. Nanopartículas de estudio	16
1.2. Suspensiones Stock:	17
- ZnO	17
- TiO ₂	17
1.3. Sustancias orgánicas macromoleculares:.....	17
- BSA	17
- Ácido húmico (HA)	18
1.4. Soluciones de trabajo (muestras).....	18
2. Métodos	19
2.1. Técnicas analíticas	19
- DLS y Electroforesis Doppler con Láser (LDE)	19
- ICP-OES.....	20
- Análisis de Carbono Orgánico y Nitrógeno	20
2.2. Metodologías analíticas	22
- Celdas de potenciometría	22
- Cinéticas de agregación	23
- Isotermas de adsorción.....	24
- Cálculos de especiación.....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
1. Caracterización de nanopartículas	27

- Nanopartículas de ZnO.....	27
- Nanopartículas de TiO ₂	29
2. Celdas de potenciometría	34
3. Cinéticas de agregación.....	38
- Estudio según el medio de trabajo.....	38
- Estudio según la presencia de BSA.....	39
- Estudio según la fuerza iónica.....	41
- Estudio según el orden de los reactivos.....	42
- Estudio según el pH.....	44
- Estudio según la concentración de TiO ₂ NPs.....	46
4. Isotermas de adsorción	48
- Calibraciones de materia orgánica.....	49
- Isotherma de adsorción de BSA en ZnO NPs.....	50
- Isotherma de adsorción de BSA en TiO ₂ NPs	58
- Isotherma de adsorción de HA en TiO ₂ NPs	63
CONCLUSIONES	68
Estabilidad coloidal	68
Adsorción de MO sobre NPs	69
BIBLIOGRAFÍA	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo de la nanotecnología y el mercado mundial en función de: a) regiones, b) aplicaciones; a lo largo del comienzo de siglo XXI. NAFTA: mercado de libre comercio entre Canadá, EEUU y México. Helmut Kaiser Consultancy, 2013.	9
Figura 2. Representación de las transformaciones que pueden sufrir las NPs en ambientes acuáticos (Markus et al, 2014).	10
Figura 3. Representación de la energía resultante de la interacción entre NPs en función de la distancia entre ellas, teniendo en cuenta las fuerzas de Van der Waals, la doble capa eléctrica y la teoría DLVO (que considera ambas) (Trefalt & Borkovec, 2014).	11
Figura 4. Disolución de ZnO NPs medidas tras 24 horas en suspensión acuosa en función del tamaño de partícula. Condiciones de concentración inicial de 500 ppm y pH 7.5 (Mudunkotuwa et al, 2012).	12
Figura 5. Diferentes escenarios de interacción entre nanopartículas y proteínas o materia orgánica disuelta del entorno, para formación de coronas (Lowry et al, 2012).....	14
Figura 6. TiO ₂ NPs (US Research Nanomaterials, Inc) empleadas para el presente trabajo.....	16
Figura 7. Gráfica que muestra las funciones de correlación en el tiempo para dos tipos de partículas de diferente tamaño. El factor 1 muestra una perfecta correlación, mientras que su disminución representa su pérdida progresiva hasta un tiempo infinito, (Zetasizer Nano User Manual, Man0317 Issue 5.0, 2009).....	19

Figura 8. Celda empleada durante la experimentación para realizar las medidas de movilidad electroforética de las NPs (Zetasizer Nano User Manual, Man0317 Issue 5.0, 2009).	20
Figura 9. Esquema de funcionamiento del equipo multi N/C® 3100 (Analytik Jena AG, Alemania).	21
Figura 10. Celda de trabajo para potenciometrías, en la caracterización de soluciones de NPs en interacción con BSA. La celda se muestra en sentido invertido puesto que está inutilizada. En ella se observan la entrada y salida del flujo de agua (burbujas interiores) para el dispositivo termostático.	22
Figura 11. Estándares de HA preparados para la calibración en el equipo multi N/C.	25
Figura 12. Imagen de muestras preparadas durante experimento de isoterma de adsorción entre MO y NPs, en la cetrífuga para la separación de la materia orgánica libre de la adsorbida junto con la nanopartícula.	26
Figura 13. Resultados de tamaños y potenciales zeta para las soluciones de ZnO NPs empleadas durante el estudio, a una concentración de 100 mg/L en agua MilliQ.	27
Figura 14. Distribuciones de tamaño por intensidad, volumen y número para tres repeticiones de muestra de ZnO NPs (100 mg/L) en agua MilliQ.	28
Figura 15. Comparativa de tamaños y potenciales zeta para dos tipos de muestra, una con nanopartículas de ZnO en agua MilliQ, y otra con la misma concentración de nanopartículas (100 mg/L) pero con presencia de BSA (100 mg/L) y una fuerza iónica de 0.1M.	28
Figura 16. Representación gráfica de los resultados comparativos para dos tipos de muestras con nanopartículas de ZnO (100 mg/L). El primero, en azul, con la nanopartícula exclusivamente en MilliQ; el segundo en un medio con BSA (100 mg/L) y con fuerza iónica 0.1M (NaNO ₃).	29
Figura 17. Resultados de tamaños y potenciales zeta para las soluciones con TiO ₂ NPs empleadas durante el estudio, con una concentración de 100 mg/L en agua MilliQ.	30
Figura 18. Distribuciones de tamaño por intensidad, volumen y número para tres repeticiones de muestra de TiO ₂ NPs (100 mg/L) en agua MilliQ.	30
Figura 19. Comparativa de tamaños y potenciales zeta para varios tipos de muestra. Una con nanopartículas de TiO ₂ en agua MilliQ, y el resto con la misma concentración de NPs (100 mg/L) pero con presencia variable de MO (BSA ó HA) y con una fuerza iónica también variable (0.1 ó 0.001M).	31
Figura 20. Representación gráfica de los resultados comparativos para dos tipos de muestras con nanopartículas de TiO ₂ (100 mg/L). El primero, en azul, con la nanopartícula exclusivamente en MilliQ; el segundo en un medio con BSA (100 mg/L) y con fuerza iónica 0.1M (NaNO ₃).	32
Figura 21. Representación de los diferentes estudios comparativos para distintos medios con TiO ₂ NPs.	33
Figura 22. Representaciones de los potenciales zeta en función del pH para dos casos: BSA (Sasidharan et al, 2013); y Ácido Húmico (SRHA) (Mohd Omar et al, 2014).	34
Figura 23. Resultados del experimento de la celda potenciométrica con nanopartículas de TiO ₂ (100 mg/L) junto con BSA (100 mg/L) a una fuerza iónica 0.1M. Todo ello en un rango de pH comprendido entre 5 y 10.	35
Figura 24. Representaciones de los resultados de la celda potenciométrica con TiO ₂ NPs + BSA, en función del pH para diámetros hidrodinámicos y potenciales zeta.	36
Figura 25. Representaciones de la variación de tamaños y potenciales zeta de TiO ₂ NPs en función del pH en dos estudios distintos. A la izda. Loosli & Stoll (2012); a la dcha. Berg et al (2009).	37

Figura 26. Representación de las cantidades de BSA adsorbidas sobre la superficie de ZnO NPs y su relación respecto al pH (Sasidharan et al, 2013).	37
Figura 27. Comparación de las cinéticas en dos medios diferentes de trabajo. Uno con la NP en agua MilliQ sin fuerza iónica. El segundo con BSA en interacción con las NPs a una fuerza iónica de 0.1M.	38
Figura 28. Comparación de cinéticas en función de si hay presencia o no de BSA en la solución. En la gráfica de arriba la fuerza iónica es de 0.001M, mientras que en la de abajo es de 0.1M. 40	
Figura 29. Conjunto de cinéticas para estudio de relevancia de la presencia de BSA en la estabilización de nanopartículas de TiO ₂ en función de dos valores de fuerza iónica, 0.1 y 0.001M.	41
Figura 30. a) Sedimentación de nanopartículas de ZnO en función del tiempo para distintas concentraciones de HA, a pH constante y a una fuerza iónica 0.02M (NaCl). b) Medidas de los potenciales zeta en función de la concentración de húmico en el medio. c) Cálculos de interacciones de acuerdo con la teoría DLVO para explicar las variaciones energéticas en función de las concentraciones de HA (Bian et al, 2011).	41
Figura 31. Conjunto de representación de cinéticas de agregación para estudiar la relevancia de la fuerza iónica en los procesos de agregación. Cuatro casos de estudio: 0.1, 0.05, 0.01 y 0.001M.	42
Figura 32. Estudio de cinéticas de agregación en función del orden seguido de los reactivos. Los tres factores a considerar son las TiO ₂ NPs (100 mg/L), la BSA (100 mg/L) y la fuerza iónica (0.1M).	43
Figura 33. Eficiencias de sedimentación de ZnO NPs, con o sin recubrimientos de HA en dos medios de NaCl y de CaCl ₂ , ajustados a pH 7.8. Representaciones en función de unos niveles crecientes de fuerza iónica (Jiang et al, 2010).	44
Figura 34. Comparativa de cinéticas en función del pH del medio para dos casos: arriba, a una fuerza iónica 0.1M, abajo, 0.001M. Todo ello para las muestras con TiO ₂ NPs (100 mg/L) con HA (100 mg/L).	44
Figura 35. Comparación de cinéticas para cada uno de los pH's de estudio, en función de la fuerza iónica del medio.	46
Figura 36. Comparación de cinéticas en función de la concentración de TiO ₂ NPs para pH 4 y 7.	46
Figura 37. Estudio de cinéticas en función de la concentración de TiO ₂ NPs para dos casos: arriba, para pH 4; abajo para pH 7.	47
Figura 38. Relación de tamaños de nanopartícula (ZnO) en función de la concentración de BSA en el medio (mg/L), medidos tras cuatro horas de interacción (Sasidharan et al, 2013).	48
Figura 39. Resultados de los estándares de BSA preparados para su calibración en el equipo, mediante el método NPOC, que servirán para el tratamiento de datos posterior en las isotermas de adsorción.	49
Figura 40. Recta de calibración para los estándares de BSA mediante el método NPOC.	49
Figura 41. Tabla de concentraciones de los estándares preparados para la calibración de HA, con sus resultados en UA tras su medición en el equipo.	50
Figura 42. Recta de calibración para los estándares de HA mediante el método NPOC.	50
Figura 43. Tabla recopilatoria de las muestras preparadas para la isoterma de adsorción de BSA en ZnO NPs.	51
Figura 44. Resultados gráficos de una experiencia previa a la isoterma, donde se observa el salto de pH en la adsorción de las muestras si no hay un control intermedio de pH.	51
Figura 45. Resultados de isoterma de adsorción de BSA en nanopartículas de ZnO, mostrando los resultados en forma de concentración de BSA libre (sin adsorber) y adsorbido.	52

Figura 46. Representación gráfica de resultados de la isoterma de adsorción de BSA sobre nanopartículas de ZnO. Arriba se muestran los resultados de BSA libre en función del pH, mientras que abajo se muestra las concentraciones de proteína adsorbida sobre ZnO NPs.....	53
Figura 47. Representaciones de las concentraciones de BSA libres en función del pH para cada uno de los tres tipos de muestras, en función de la concentración total de BSA presente inicialmente en las muestras.....	54
Figura 48. Representaciones de las concentraciones de BSA adsorbidas en función del pH para cada uno de los tres tipos de muestras, en función de la concentración total de BSA presente inicialmente en las muestras.....	55
Figura 49. Representación de los valores obtenidos en la isoterma para las cantidades adsorbidas en función de las cantidades de nanopartículas de ZnO para cada muestra, para cada pH determinado.....	56
Figura 50. Representación de tamaños y potenciales zeta para las muestras de la isoterma de adsorción de BSA sobre nanopartículas de ZnO, en función del pH del medio.....	57
Figura 51. Variaciones de potencial zeta para ZnO NPs en función del pH (Mohd Omar, 2014).	57
Figura 52. Tabla recopilatoria de muestras para la isoterma de adsorción de BSA en TiO ₂ NPs.	59
Figura 53. Resultados de isoterma de adsorción de BSA en nanopartículas de TiO ₂ , mostrando los resultados en forma de concentración de BSA libre, adsorbida y en función de las cantidades de nanopartícula en cada muestra.	60
Figura 54. Representaciones de los resultados de isoterma de adsorción de BSA en nanopartículas de TiO ₂ en función de la cantidad de BSA libre, la adsorbida y la adsorbida en función de la masa de nanopartículas presentes en cada muestra.....	61
Figura 55. Representación de tamaños y potenciales zeta para las muestras correspondientes a la isoterma de adsorción de BSA en nanopartículas de TiO ₂ en función del pH para dos fuerzas iónicas.....	63
Figura 56.. Tabla recopilatoria de muestras para la isoterma de adsorción de HA en TiO ₂ NPs.	64
Figura 57. Resultados de isoterma de adsorción de HA en nanopartículas de TiO ₂ , mostrando los resultados en forma de concentración de HA libre, adsorbida y en función de las cantidades de nanopartícula en cada muestra.	65
Figura 58. Representaciones de los resultados de la isoterma de adsorción de HA en TiO ₂ NPs, en función de la cantidad de HA libre, adsorbida y adsorbida en función de las cantidades de NPs en las muestras, para los dos casos de estudio de diferentes fuerzas iónicas.	66
Figura 59. Representación de tamaños y potenciales zeta de las muestras de la isoterma de adsorción de HA en TiO ₂ NPs en función del pH del medio.	67

INTRODUCCIÓN

1. Nanomateriales en la actualidad

La Nanociencia se describe como la rama de conocimiento de los procesos y propiedades que tienen lugar en el rango de escala más bajo posible para la materia, antes de alcanzar las dimensiones atómicas (Lead & Valsami-Jones, 2014). Dicha escala, que comprende de 1 a 100 nm, supone el marco en el que se clasifican los nanomateriales y constituye a día de hoy uno de los sectores tecnológicos de mayor interés con grandes posibilidades de desarrollo debido a las propiedades físico-químicas que los materiales adquieren en estas dimensiones.

Pese a la gran novedad que puede suponer este campo, la aplicación de nanomateriales (NMs) siempre ha estado presente en la historia del hombre, aunque su uso se haya producido sin la comprensión y el control que caracterizan su estado actual (Hull & Bowman, 2009). Las primeras nociones de su utilización datan del siglo V o IV a.C. en el antiguo Egipto y en China, donde se empleaba oro soluble con propósitos estéticos y curativos. Con el paso de los siglos, aparece la aplicación de oro y plata en forma coloidal para la ornamentación de productos como vasos o copas, o la fabricación de vidrieras para edificios romanos que en función de la dispersión de la luz producía diversos efectos ópticos. Ésta última sería la aplicación fundamental durante varios siglos posteriores para su inclusión en catedrales. Las bases de su comprensión no se presentarían hasta el siglo XVII, cuando se desarrollaron los avances en la química coloidal. Gracias a ello se consideraron ciertos fundamentos que supondrían conocimientos clave para la síntesis de NMs y, consecuentemente, la capacidad de desarrollo de la nanotecnología. No obstante, no fue hasta el siglo XX cuando se impulsaron definitivamente conceptos como la escala nanométrica y su concepción, o la nanotecnología. Este desarrollo de su entendimiento siempre ha ido de la mano con el progreso científico y tecnológico; más particularmente, con el desarrollo de técnicas microscópicas y el conocimiento sobre la naturaleza de los electrones y sus propiedades ópticas. Posteriores descubrimientos a finales del siglo de nanomateriales basados en carbono, como los fullerenos, los nanotubos de carbono (CNTs) o, más recientemente, el grafeno, constituyeron la incorporación de nuevos conceptos y conocimientos que constantemente se siguen renovando (Lead & Valsami-Jones, 2014). En la actualidad la UE define nanomaterial como “un material natural, secundario o fabricado que contenga partículas, sueltas o formando un agregado o aglomerado y en el que el 50 % o más de las partículas en la granulometría numérica presente una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre 1 y 100 nm”.

Se espera que el uso de NMs tenga un gran potencial para la mejora de productos industriales y de consumo, necesidades energéticas, sistemas de seguridad, electrónica e ingeniería, así como aplicaciones en medicina y medioambiente. Su interés reside en unas propiedades físico-químicas muy especiales que los convierten en materiales únicos, con grandes posibilidades en un amplio rango de sectores. Dichas propiedades son debidas a factores como la escala nanométrica, sus configuraciones electrónicas y estructurales, y su extremadamente elevado ratio de área superficial/volumen (Hull & Bowman, 2009). Con este gran marco de aplicaciones, resulta imposible ignorar la relevancia que tiene o que tendrá la nanotecnología en el mercado, debido a los niveles de producción de materiales que contienen o conforman los NMs. De acuerdo con los datos que presenta Helmut Kaiser Consultancy (2013), el mercado afectado por la nanotecnología era estimado en 110.6 billones de dólares americanos en 2003, para proyectarse hasta 891.1 billones en 2015 en todo el mundo (figura 1).

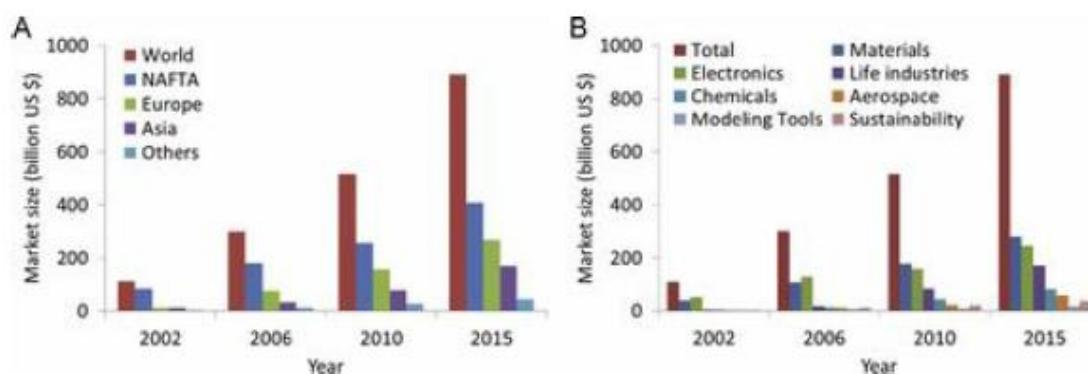


Figura 1. Desarrollo de la nanotecnología y el mercado mundial en función de: a) regiones, b) aplicaciones; a lo largo del comienzo de siglo XXI. NAFTA: mercado de libre comercio entre Canadá, EEUU y México. Helmut Kaiser Consultancy, 2013.

Se observa el aumento exponencial de inversiones en este sector con el paso de los años, pero también hay que hacer incidencia en la cantidad de productos que contienen NMs y que se encuentran en el mercado de forma disponible. Cosméticos, cremas solares, pinturas y recubrimientos, catalizadores, lubricantes, textiles, fármacos, productos de cuidado personal, productos alimenticios (y sus envases), electrónica, celdas de combustión, baterías, aditivos, armas y explosivos son tan solo algunos ejemplos de ellos. Resulta muy complicado estimar datos de productos que los contienen o están basados en ellos, debido a que muchos de ellos pueden no ser declarados en su utilización de NMs por la falta de una obligación legal para dicha información (Lead & Valsami-Jones, 2014).

Ante la relevancia que pueden adquirir, es importante la evaluación de los riesgos potenciales que pueden conllevar, tanto para la salud humana como para el medioambiente. El entendimiento de los riesgos ayudará a mejorar e incluso a asegurar su protección frente a estos materiales. Además, su conocimiento supondrá un salvoconducto hacia su desarrollo sostenible en la industrial de la nanotecnología, llamado a ser uno de los vectores económicos globales de este próximo siglo.

2. Nanopartículas de ZnO y TiO₂

Dos de los nanomateriales más empleados son las nanopartículas de óxido de zinc (ZnO NPs) y de dióxido de titanio (TiO₂ NPs). Ambos son óxidos metálicos, compartiendo características como la semiconducción o su capacidad antimicrobiana, las cuales los hacen muy atractivos para diversas aplicaciones.

El ZnO tiene una estructura cristalina que le confiere unas determinadas propiedades ópticas y eléctricas únicas, en combinación con las características a escala nanométrica. Es un material semiconductor con un ancho gap entre sus bandas de valencia y de conducción, con emisión cercana al ultravioleta, alta conductividad y propiedades piezoeléctricas. Todo ello conlleva un gran interés por este material para aplicaciones como los sensores electrónicos, células solares, catálisis, recubrimientos, cosmética y transducción energética (Mohd Omar et al, 2014). Además es un fotocatalizador muy efectivo, por lo cual también puede emplearse en tareas de remediación medioambiental para la eliminación de contaminantes y desinfecciones médicas. Es muy empleado en productos como plásticos, cerámicas, vidrio, cemento, caucho, lubricantes, pinturas, pigmentos, baterías, etc. Uno de los productos que más lo incluyen son los cosméticos de cuidado personal y los protectores solares, debido a su capacidad de absorción de ultravioleta (Ma et al, 2013).

Por su parte, el TiO_2 presenta aplicaciones fundamentalmente como fotocatalizador, aunque también destaca por su uso en remediación medioambiental, en gran cantidad de productos de consumo como blanqueador, o como protección contra radiación ultravioleta. También suelen ser incorporados en textiles por su capacidad antimicrobiana (Gondikas et al, 2014). Como producto en polvo, ya se empleaba como pigmento desde la antigüedad. Supone un candidato ideal para multitud de aplicaciones industriales debido a su alta estabilidad química, disponibilidad como material y su relativo bajo coste (Carneiro et al, 2014).

Su presencia en tal cantidad de productos, así como su continuo crecimiento en cuanto a niveles de producción, hacen aumentar la preocupación sobre sus efectos potenciales una vez liberados en el medioambiente. Sobre todo en ambientes acuáticos, que se estima que será el principal destino de estos dos óxidos metálicos (Calin et al, 2012).

3. Factores que influyen en la estabilidad, solubilidad y transporte en medios acuosos

Para la evaluación de los riesgos de estos nanomateriales es indispensable estudiar en primer lugar cómo se transportan y transforman en el medio de estudio, ya sean medios naturales, medios de cultivo o fluidos biológicos. Esta información es esencial para el desarrollo de modelos posteriores que permitan estimar en qué formas y cantidades pueden alcanzar a los organismos vivos, pudiendo ser causa de diferentes efectos negativos en su interacción con ellos (Li et al, 2013).

El comportamiento de las nanopartículas en medios acuosos depende de sus características físico-químicas específicas. Éstas, a su vez, están condicionadas por ciertos parámetros propios del medio. Mientras las fuentes y emisiones determinan la cantidad de nanomaterial que está presente, los procesos y transformaciones que en ellos se producen determinan las formas en que se presentan y en qué compartimentos dentro del propio sistema. Un ejemplo puede ser si se disponen en los sedimentos o en dispersión en la fase acuosa. Es importante conocer la forma porque, ya sea como partícula individual, con recubrimiento o sin él, o adsorbido a material del entorno, determinará su biodisponibilidad y toxicidad (Markus et al, 2014).

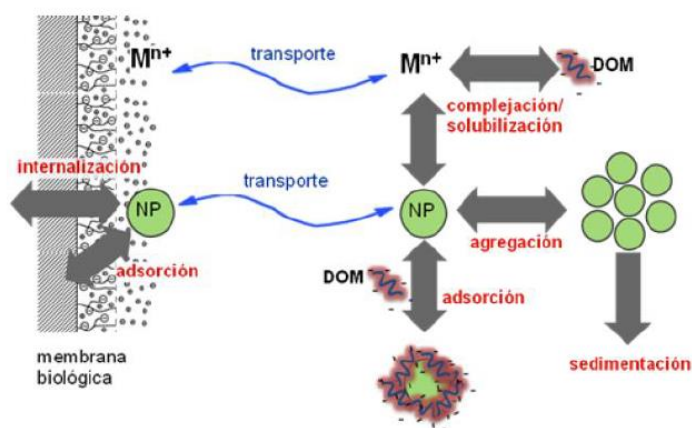


Figura 2. Representación de las transformaciones que pueden sufrir las NPs en ambientes acuáticos (Markus et al, 2014).

Una vez liberadas en ambientes acuáticos, el transporte, disolución y comportamiento de las nanopartículas estarán determinados por su estabilidad en el medio. La estabilidad depende de las propiedades de la partícula como el tamaño, la carga superficial, la morfología, etc. Y las condiciones del medio acuoso tales como el pH, la fuerza iónica, la presencia de electrolitos o

ligandos orgánicos. De entre todos, estos últimos son particulares de cada sistema y pueden tener una gran relevancia en la estabilidad coloidal, debido al dominio de procesos de adsorción en la interacción nanopartícula-ligando para la formación de coronas (Xu & Jiang, 2014).

3.1. Estabilidad coloidal

Una dispersión coloidal se define como un sistema donde la fase dispersa, las partículas, se encuentran dispersas en una fase continua en una situación de desequilibrio. Es el tipo de sistemas que forman las nanopartículas (como el ZnO y el TiO₂) en los medios acuosos. Debido a su escala de tamaños, presentan algunas características como dispersión de radiación, movimiento browniano y ciertas propiedades eléctricas. Además, debido a la elevada superficie específica que presentan las NPs, presentan unos rasgos de inestabilidad muy grandes en términos termodinámicos. Esta inestabilidad potencia procesos que tienen lugar en la interfase como adsorción, coagulación, floculación, sedimentación, y demás tipos de reacciones superficiales. Para saber si un sistema es o no estable, es necesario considerar las interacciones que puede haber entre NPs. Éstas interacciones están formadas por las fuerzas de Van der Waals, la doble capa eléctrica, los efectos de hidratación, la hidrofobicidad, las interacciones estéricas y los enlaces poliméricos. Las dos primeras de estas interacciones constituyen la base de la teoría DLVO, un modelo cuantitativo desarrollado para la teoría de la estabilidad coloidal.

Esta teoría DLVO considera que las partículas coloidales están sometidas a fuerzas de atracción y repulsión, existiendo un balance entre todas ellas. El movimiento browniano provoca la colisión entre partículas, y si son las fuerzas de atracción las que predominan se produce la aglomeración tras la colisión. Si, por el contrario, son las fuerzas de repulsión las que predominan, éstas permanecen separadas. Las fuerzas de atracción suelen estar representadas por las fuerzas de Van der Waals, mientras que las de repulsión provienen de la interacción entre las dobles capas eléctricas que rodean las partículas, aunque también pueden ser atractivas.

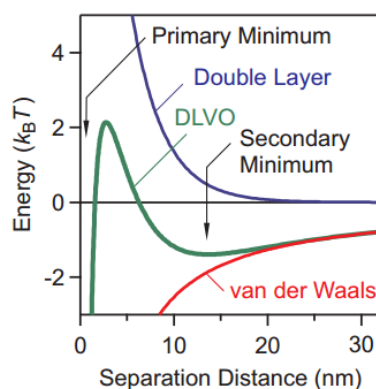


Figura 3. Representación de la energía resultante de la interacción entre NPs en función de la distancia entre ellas, teniendo en cuenta las fuerzas de Van der Waals, la doble capa eléctrica y la teoría DLVO (que considera ambas) (Trefalt & Borkovec, 2014).

En la figura 3 se muestra esquemáticamente en qué consiste esta teoría, que define el comportamiento de atracción o repulsión entre partículas coloidales de acuerdo a un efecto neto de sus energías, que definirán la situación de estabilidad. Se observa que cuando las distancias entre ellas son muy grandes no hay repulsión. Conforme se aproximan la repulsión va aumentando, hasta que se encuentran con una barrera energética que definirá su interacción. Si es superada, debido a una cantidad de energía atractiva suficiente, el sistema avanza hacia un estado mínimo de energía (coagulación) que supone un punto sin reversibilidad.

Si la barrera no es superada, se vuelve a un mínimo secundario de energía (floculación) que sí puede ser reversible. Estas barreras energéticas pueden variar en función de condiciones del medio tales como la temperatura o la fuerza iónica, quedando principalmente determinado por la carga superficial de las nanopartículas para definir la naturaleza de su atracción o repulsión.

3.2. Parámetros físico-químicos de las NPs

Como se ha explicado anteriormente, los parámetros físico-químicos de las propias nanopartículas en el medio son relevantes para el estudio de su comportamiento en los sistemas acuosos. Propiedades como el tamaño de partícula, la concentración o la forma pueden influir en su estabilidad, solubilidad o transporte.

Los tamaños de nanopartícula están relacionados con los procesos de disolución en el medio acuoso. De acuerdo con los modelos teóricos, se prevé un mayor ratio de disolución cuanto menores sean los tamaños, como resultados de un incremento en su superficie específica (Ma et al, 2013). Mudunkotawa et al (2012), así lo corrobora experimentalmente con su estudio que relaciona los factores de tamaño y solubilidad. Pese a mostrarse una relación directa, los resultados de solubilidad pueden mostrar una gran sensibilidad a unas condiciones experimentales particulares, en función del pH, temperatura, composición del medio, etc. Además, muchas de las ecuaciones empleadas para ello muestra que la dependencia no es tanta con el tamaño primario de las nanopartículas como con los radios de los agregados formados y su concentración en el medio (David et al, 2012).

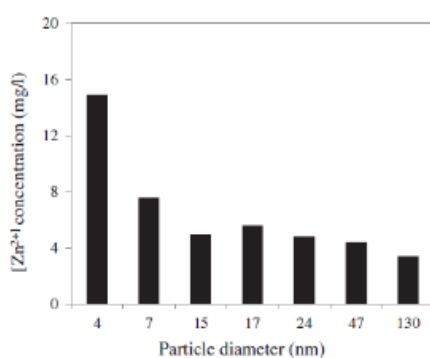


Figura 4. Disolución de ZnO NPs medidas tras 24 horas en suspensión acuosa en función del tamaño de partícula. Condiciones de concentración inicial de 500 ppm y pH 7.5 (Mudunkotuwa et al, 2012).

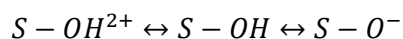
La concentración en el medio determinará en gran parte la cantidad de interacciones que se producen entre nanopartículas en el sistema acuoso. Majedi et al (2014) realizaron un estudio multiparamétrico con ZnO NPs para comprobar la relevancia de varios factores en su comportamiento y destino. En él se concluye que un aumento de su concentración influye en la estabilidad de la suspensión, puesto que incrementa la frecuencia de colisiones que entre ellas se produce. Como resultado, esto conlleva un fomento de los fenómenos de agregación y posible sedimentación, con datos de diámetros hidrodinámicos superiores cuando la concentración es mayor.

En cuanto a la forma de las nanopartículas, no se muestra como uno de los factores más relevantes a la hora de definir su comportamiento o destino. Más bien está relacionado con la posible toxicidad que puedan producir en los organismos que en dichos medios se encuentren. Mu et al (2014) estudiaron su efecto en diferentes formas de ZnO NPs, concluyendo que solo cuando la concentración en el medio es muy superior al límite de equilibrio de solubilidad, factores como la forma adquieren una mayor importancia.

3.3. Factores del medio acuoso

Como principales condiciones que pueden influir sobre las nanopartículas en medios acuosos, destaca el papel del pH, la fuerza iónica, la temperatura y la presencia de materia orgánica disuelta (MOD).

La estabilidad de cualquier dispersión coloidal depende de la carga electrostática de las partículas. Los protones e hidroxilos son iones determinantes para los óxidos metálicos. En la siguiente reacción puede observarse, siendo S la superficie del óxido metálico en cuestión:



En ella se observa que la carga superficial de las nanopartículas depende del pH del medio (Ma et al, 2013). Un término clave para comprender la influencia del pH es el de punto isoeléctrico. Este corresponde al valor de pH para el cual la NP tiene una carga neta nula, si es distinto la propia partícula adquirirá una carga. En función de estos valores de pH la estabilidad quedará determinada en el medio, puesto que influirá sobre sus fuerzas electrostáticas superficiales. Si no hay ningún tipo de material en el entorno como MOD o nutrientes presente, las cargas electrostáticas determinarán la interacción entre las NPs mediante fuerzas de repulsión. Es decir, cuando se encuentra sobre el punto isoeléctrico, existe una gran posibilidad de aumentar el fenómeno de agregación, puesto que no existen cargas superficiales que ejerzan una repulsión. Por el contrario, si el pH se encuentra en un valor distinto del punto isoeléctrico, las NPs adquirirán una carga superficial que puede ser suficiente para evitar la agregación y, por tanto, aumentar la estabilidad coloidal (Mohd Omar, 2014).

Además, el pH también tiene un efecto sobre la solubilidad de las nanopartículas. Li et al (2013) mostraron la relación que existe entre disolución y toxicidad con respecto a las condiciones de pH. La concentración de Zn^{2+} disminuye con el incremento de la alcalinidad del medio. Eso puede ser debido a la formación de una capa de hidróxidos alrededor de la superficie de las NPs, inhibiendo su disolución a alto pH.

La fuerza iónica del medio tiene su principal influencia sobre dos fenómenos, la solubilidad y la agregación de las nanopartículas. Al aumentar el contenido de sales en el medio acuoso, se produce un aumento de la solubilidad de las mismas. Li et al (2013) estudia el efecto que pueden tener diferentes especies de cationes y aniones sobre ZnO NPs. Concluye que en función de la especie se fomentará la solubilidad del sistema, habiendo casos en los que no se favorezca en absoluto. La presencia de ciertos aniones supone una adición de ligandos para el zinc que produce un aumento en su solubilidad. Además, también puede influir en el fenómeno de agregación. Esto es debido a que la presencia de electrolito induce un apantallamiento de las cargas electrostáticas superficiales de la nanopartícula, produciendo una disminución de las fuerzas repulsivas y aumentando la posibilidad de interacción, y su consiguiente agregación (Majedi et al, 2014).

La temperatura es uno de los factores más relevantes de medios acuosos puesto que puede producir cambios en las propiedades y el comportamiento de las NPs de manera radical. En aguas naturales, la variación de la temperatura superficial puede influir en la movilidad, adsorción superficial e hidrólisis de estos nanomateriales. De forma indirecta también puede modificar las condiciones del propio medio en cuanto a viscosidad, densidad y tensión superficial. Otro factor de gran relevancia reside en la propia naturaleza de los nanomateriales, relacionado a su vez con la temperatura. Y es que en función de cómo sea el proceso de disolución, las variaciones de temperatura producirán un tipo específico de reacción en ellos. Para la gran mayoría de los óxidos metálicos (entre ellos el TiO_2), la disolución es un proceso

endotérmico. No obstante, para el ZnO es exotérmico. Esta diferencia provoca que su solubilidad se reduzca al aumentar la temperatura del medio, al contrario que en el resto de casos (Majedi et al, 2014).

3.4. Coronas macromoleculares

Por último cabe destacar la materia orgánica disuelta (MOD). Los ambientes acuáticos naturales presentan, en mayor o menor medida, algunas sustancias orgánicas como ácidos húmicos o fúlvicos, sustancias poliméricas, etc. Su presencia en el medio suele estar relacionada con fenómenos de adsorción superficial sobre las NPs, produciendo unos recubrimientos orgánicos denominados coronas. Estos recubrimientos afectan a su estabilidad, puesto que pueden modificar su carga superficial, alterando su comportamiento en el medio. La carga de estas sustancias, que también depende del resto de condiciones del medio, resulta un factor decisivo para la atracción o repulsión con las nanopartículas y formar este sistema proteína-NP. Al producir variaciones en la carga neta de la nanopartícula tras formarse la corona, su comportamiento y destino está dominado por estos procesos adsorción, determinando también la posible toxicidad que pueda producir (Xu & Jiang, 2014).

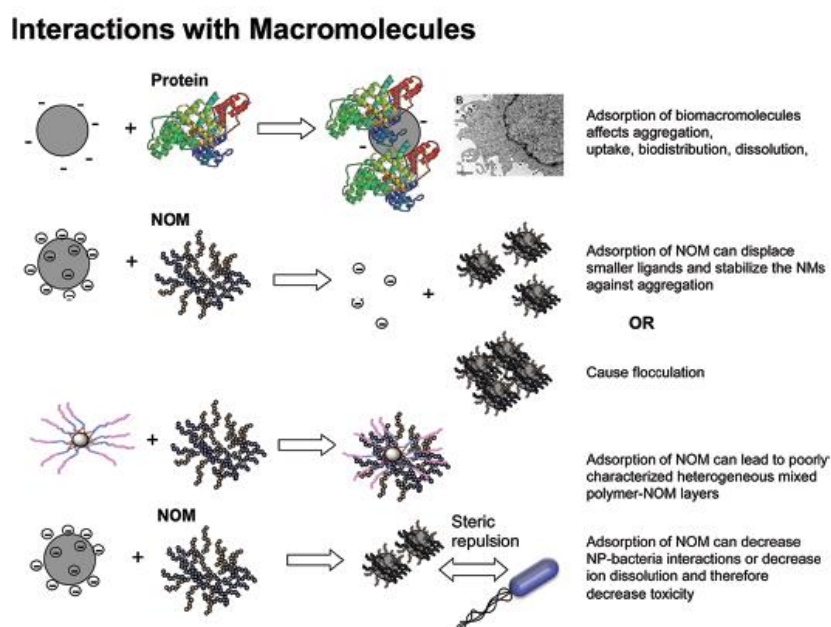


Figura 5. Diferentes escenarios de interacción entre nanopartículas y proteínas o materia orgánica disuelta del entorno, para formación de coronas (Lowry et al, 2012).

El concepto de corona comienza a surgir en la década de los 90, para designar los recubrimientos formados en los sistemas coloidales. Actualmente comienzan a considerarse por su relevancia en el comportamiento que pueden tener los nanomateriales, tanto en sistemas biológicos como en entornos naturales. En lo relativo a su composición, cabe destacar que representan, al igual que los propios sistemas coloidales per se, unos sistemas termodinámicamente inestables. Esta inestabilidad conlleva que la formación y composición de las coronas puede variar en función del tiempo de exposición en el entorno y el número de macromoléculas que puedan adsorberse sobre la superficie del NM. Su constitución es debida a que las nanopartículas tienen una altísima energía superficial que buscan disminuir, por lo que se producen las uniones a partir de sustancias del alrededor. En función de su grado de unión, se diferencian entre “hard coronas” y “soft coronas”. Las primeras se corresponden con las que tienen unos enlaces lo suficientemente fuertes como para poder ser aislados del NM solamente tras varios procesos

de lavado y centrifugación. Por otro lado, las “soft coronas” están enlazadas de forma más débil, por lo que ya en etapas de lavado pierden su unión con el nanomaterial. En cuanto a su composición, se pueden distinguir dos tipos principalmente: las coronas proteicas y las eco-coronas. Las coronas proteicas se forman al formarse uniones del NM con proteínas propias de sistemas biológicos como el suero o plasma, y su estudio suele tener como objetivo el reconocimiento celular que su formación conlleva para su interiorización y producción de impactos en ellas. Las eco-coronas se forman en ambientes naturales con presencia de materia orgánica disuelta, y cuyo estudio suele estar más encaminado a la estabilidad de partículas y su biodisponibilidad (Lead & Valsami-Jones, 2014).

4. Relevancia para posteriores estudios: biodisponibilidad y toxicidad

Como se ha explicado anteriormente, el comportamiento de las nanopartículas en medios acuosos depende de varios factores. Las propias características físico-químicas que hacen de ellos materiales únicos, determinan en gran parte el comportamiento que puedan tener. No obstante, no es sino con la consideración de los factores del propio medio, cuando realmente se presente un marco adecuado para poder estudiar las interacciones y posibles efectos sobre las nanopartículas presentes, en busca de entender su comportamiento y destino.

Para la evaluación de los riesgos ambientales y toxicológicos que puedan conllevar este tipo de nanomateriales, es indispensable estudiar en primer lugar cómo se transportan y transforman en diferentes medios. Esta información es esencial para poder completar estudios posteriores como puedan ser los relacionados con biodisponibilidad y toxicidad de estos materiales. Precisamente una de las conclusiones de muchos trabajos en toxicología es la falta de resultados experimentales con los que contrastar los obtenidos (Li et al, 2010; Bilinova et al, 2010; Aruoja et al, 2009; Zhu et al, 2008). Este problema viene derivado fundamentalmente por la falta de unos protocolos o procedimientos estandarizados sobre modelos de medios u organismos de trabajo en ensayos de toxicología. Para poder definir unas pautas, es necesario conocer previamente en qué formas y que serie de transformaciones han sufrido las nanopartículas hasta llevar al estado final con el que puedan interactuar con los organismos pertinentes de acuerdo a las propias características del entorno. Es por ello que estos estudios sobre cómo influyen diferentes parámetros ambientales de medios acuosos en procesos de transformaciones de los NMs tienen una especial relevancia.

Este trabajo se realiza de acuerdo con estas consideraciones, empleando como nanomateriales dos tipos de nanopartículas, de ZnO y TiO₂. El estudio se centra en las interacciones que puede haber entre estas NPs y ciertas macromoléculas modelo en sistemas acuosos. Para ello no solo se estudian cinéticas de agregación para describir los procesos de formación de recubrimientos orgánicos (coronas), sino que se profundiza en una variación de ciertas condiciones ambientales como son la fuerza iónica, la concentración de NP o de materia orgánica, y el pH. Todo ello para investigar cómo influyen en los procesos de adsorción para la formación de coronas. Como sustancias macromoleculares se escogen dos tipos diferentes de materia orgánica. Uno es la albúmina de suero bovino (BSA) para la formación de coronas proteicas (características de sistemas biológicos), y el otro es ácido húmico (HA) para eco-coronas (sistemas naturales).

OBJETIVOS Y ESTRUCTURA

El presente trabajo tiene dos objetivos principales:

- El primer objetivo consiste en el estudio experimental de la adsorción de sustancias macromoleculares modelo, albúmina de suero bovino (BSA) y ácido húmico comercial, sobre muestras de nanopartículas de ZnO y TiO₂. Ambos tipos de nanomaterial están compuestos por tamaños de partícula promedio inferiores a 100 nm.
- El segundo objetivo es el análisis de la influencia de ciertos parámetros ambientales como el pH, la fuerza iónica y la concentración de diferentes componentes sobre las isothermas de adsorción de estos nanomateriales.

Para todo ello se emplearán una serie de técnicas de Dispersión de Luz Dinámica (DLS), Electroforesis Doppler con láser, ICP-OES y Espectroscopía de Absorción Atómica (AAS). Además, se obtendrán y analizarán datos de procesos como isothermas de adsorción, cinéticas de agregación y cálculos de especiación para la interacción de las NPs con las sustancias macromoleculares. Finalmente, se realizará un análisis de los resultados obtenidos en función de posibles mecanismos fisicoquímicos involucrados, y de la información existente en bibliografía acerca de sistemas similares.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material

1.1. Nanopartículas de estudio

Las NPs de ZnO fueron obtenidas como polvo seco procedentes de IoLiTec (Ionic Liquid Technologies GmbH). Su diámetro primario promedio es de 20 nm de diámetro, con una superficie BET de 31.8453 m²/g.

En el caso de las NPs de TiO₂ (rutilo), fueron recibidas en forma de disolución, con 85% de agua. La casa comercial desde donde fueron suministradas fue US Research Nanomaterials, Inc (Houston, Texas). El producto tiene una pureza del 99.9% en TiO₂, con un diámetro de partícula primaria promedio entre 5 y 15 nm. La concentración estimada en origen era en torno a 15 g/L, aunque como se verificaría posteriormente, se cuantificó en 21 g/L.



Figura 6. TiO₂ NPs (US Research Nanomaterials, Inc) empleadas para el presente trabajo.

1.2. Suspensiones Stock:

- ZnO

Se prepararon disoluciones Stock con una concentración final de 1g/L a partir de los productos comerciales obtenidos en polvo. Estas suspensiones eran preparadas en agua MilliQ (Synergy UV, Millipore) sin ningún tipo de aditivo o electrolito.

Debido a que el material presenta una proporción importante de partículas de gran tamaño y alguna impureza, se preparaba inicialmente una disolución de 4 g/L, a partir de pesada en balanza. La solución era sonicada en un primer baño de ultrasonidos (Branson 3210, 100W) durante 30 minutos. Tras un reposo de 10 minutos, para propiciar la sedimentación de las impurezas de gran tamaño, se recuperaba el sobrenadante por decantación y finalmente era trasvasado a un matraz, con una concentración final estimada de 1 g/L. Antes de cualquier tipo de operación con estas suspensiones es necesario volver a sonicar en ultrasonidos durante 30 minutos más. Las soluciones eran almacenadas a temperatura ambiente, para evitar favorecer su solubilidad en caso de guardarse en nevera, durante una semana como máximo.

- TiO₂

La preparación de las suspensiones Stock de TiO₂ son similares a las del ZnO. En este caso su sencillez aumentaba porque no era necesario un paso intermedio de extracción del sobrenadante por decantación, debido a su alta pureza. Las concentraciones finales de 1 g/L eran conseguidas mediante pesada de la solución comercial inicial, de la que fue necesario un proceso de cálculo de concentración para determinar su exactitud, preparadas con agua MilliQ (Synergy UV, Millipore).

Para ello, se realizaron una serie de pesadas de la solución inicial de nanopartículas en pesasustancias. El procedimiento consiste en la comparación de su peso con 1 ml de stock antes de introducirlo en horno y tras su vaporización al estar 90 minutos en su interior a una temperatura de 80°C. Calculando la diferencia de pesadas se obtuvo la concentración real del producto con TiO₂, alrededor de 21 g/L.

Prevía preparación del Stock de 1g/L, es necesario sonicar la muestra en ultrasonidos (Branson 3210, 100W) durante 30 minutos. Lo mismo para su posterior utilización en experimentos. A partir de estas soluciones se preparan el resto de muestras. Su almacenamiento también se realizaba en matraces aforados, a temperatura ambiente, durante un periodo como máximo de una semana.

1.3. Sustancias orgánicas macromoleculares:

- BSA

La albúmina de suero bovino es una de las proteínas plasmáticas más características debido a su relevancia para estudios bioquímicos. En este tipo de estudios de interacción con nanomateriales, tiene gran relevancia debido a su tendencia a acumularse en la interfase entre soluciones y superficies sólidas (Sasidharan et al, 2012). Gracias a su enlace reversible en función de la carga de las nanopartículas, es muy útil en el estudio de la influencia de algunos parámetros del entorno en la interacción de la BSA con una dispersión coloidal.

La BSA fue adquirida de la casa comercial Sigma-Aldrich (EEUU), en forma de polvo. Para la preparación de las soluciones stock que se emplearán en los experimentos es necesario un procedimiento específico de tratamiento. Dicho procesos consta de dos fases principales: una solución inicial al 1% y el stock final al 0.05%. Para las disoluciones se empleaba agua MilliQ como medio. Inicialmente se prepara una solución en tubo falcon con una concentración al 1%

m/v, agitando el contenido pero evitando la formación de espuma. La solución se almacena durante un día en nevera a una temperatura de 4°C, antes de poder finalizar su preparación. Posteriormente, se realiza una filtración mediante una jeringuilla con filtro de 0.2 micras en cabina de flujo laminar. Para finalizar, se procede con una dilución de la solución con BSA hasta que la concentración final sea del 0.05%, en agua MilliQ. El almacén de la BSA preparada se realiza en nevera, siendo su periodo de utilización inferior a dos semanas.

- Ácido húmico (HA)

Los ácidos húmicos representan una sustancia modelo dentro de la materia orgánica natural (NOM). Suelen estar formados por estructuras muy complejas, con tendencia a carga negativa en condiciones ambientales. La determinación de una estructura específica representa un gran desafío debido a su alta variedad de desarrollo superficial, que puede incluso modificarse en función de las condiciones de su entorno. Dadas estas características, surge un marco complicado para el estudio de interacciones potenciales con nanomateriales. No obstante, su tendencia a formar recubrimientos sobre la superficie de las nanopartículas para aportar variaciones en la carga superficial y estabilidad estérica, hacen de que se muestre un gran interés por su estudio, además de que son muy representativos de sistemas naturales acuáticos (Lead & Valsami-Jones, 2014).

En su utilización para este estudio, fue adquirido procedente de Sigma-Aldrich (EEUU). Se dispuso de una solución purificada, siguiendo los procedimientos estándar de purificación y liofilización (Vermeer, A.W.P., 1996). Para conocer la concentración exacta del stock que se disponía, se realizaron una comparación de pesadas en pesasustancias, de forma análoga a las soluciones de TiO_2 , resultando en unos valores de concentración de 11.86 g/L. En esta ocasión para pesar en estado de sequedad, se dejaron las muestras con 10 ml de HA 3 días en horno a unos 80°C. A partir de la solución de partida, se prepararon el resto de stocks a unas concentraciones de 5 g/L aproximadamente con agua MilliQ. Éstos fueron almacenados en nevera a 4°C, y servirían para la preparación de las muestras de trabajo y los patrones necesarios durante las experimentaciones. Su periodo de utilización también era de dos semanas, momento en el cual se renovaba la disolución.

1.4. Soluciones de trabajo (muestras)

Las muestras para el estudio se prepararon a una temperatura de 25°C, situación que se conseguía estabilizar por la utilización de incubadoras en los casos de muestras que se emplearon para las isotermas de adsorción, en el estudio de la interacción NP-Materia orgánica (MO). Para conseguir una determinada fuerza iónica, que normalmente era de 0.1M, se empleaba NaNO_3 1M. En la medida de la concentración de materia orgánica en las muestras por AAS no se empleó ningún tipo de tampón que estabilizara el pH. De modo que para controlar los rangos de interés (variable en cada experimento, pero siempre entre 4 y 10) se realizaban medidas de las muestras en diversos momentos del ensayo mediante un electrodo de vidrio combinado (Orion 9103) en un pHmetro (Orion 920+, Thermo Electron Corporation). Para la modificación del pH se emplearon HNO_3 y NaOH 0.1M y 0.001M en función del grado de variación que se quisiera conseguir.

El orden de preparación para las muestras de trabajo está constituido por la preparación de un medio con NaNO_3 para obtener una determinada fuerza iónica y con una cantidad de ácido o base calculado previamente para conseguir un determinado pH, mediante el programa Visual Minteq v. 3.0 (Gustafsson, J. P., 2010); después la adición de materia orgánica (ya fuera BSA o HA) y por último la solución de nanopartículas correspondiente (ZnO o TiO_2). Esto en el caso de las isotermas de adsorción y las celdas de interacción. Para el estudio de cinéticas de agregación

se variaban los órdenes en ocasiones para estudiar cómo podían afectar a la dinámica de adsorción de la materia orgánica sobre las nanopartículas.

2. Métodos

2.1. Técnicas analíticas

- DLS y Electroforesis Doppler con Láser (LDE)

Se empleó DLS (Dispersión de Radiación Dinámica) para la evaluación de los diámetros hidrodinámicos de las partículas en las muestras, con el objetivo del estudio de la distribución de tamaños y el fenómeno de agregación. Las medidas se realizaron en el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Bedford, MA), que utiliza un láser de He-Ne de una longitud de onda de 633 nm. La dispersión de radiación se detecta mediante un fotodetector situado en un ángulo fijo de 173°. Los resultados que con tal instrumentación se obtienen permiten la comprobación de estabilidad en las dispersiones y el seguimiento de los diámetros medios en función del tiempo.

Su fundamento teórico se basa en las medidas de la dispersión de radiación en función del movimiento browniano que produce el dinamismo de las NPs, para su relación con unos tamaños de partícula específicos. El láser produce un haz incidente sobre las nanopartículas, produciendo unas fluctuaciones en las intensidades dispersadas que serán analizadas. Esta conversión de tamaños en función de las intensidades es posible debido a un sistema de correlación, basado en las medidas del grado de similitud entre dos señales en un periodo de tiempo. En DLS estos periodos suelen ser muy pequeños, del orden de microsegundos o incluso nanosegundos. Debido al movimiento browniano que experimentan las nanopartículas en una suspensión, el tamaño de las mismas está relacionado con una mayor o menor velocidad, descrito en la ecuación de Stokes-Einstein, donde las de mayor tamaño se mueven más lentamente y viceversa. En función de los tamaños también variará la fluctuación de las intensidades de radiación dispersada, siendo mayor la fluctuación conforme menor es el tamaño de nanopartícula. De este modo el equipo evalúa las funciones de correlación de señales en el tiempo para analizar las fluctuaciones y poder relacionarlas con el comportamiento de un tamaño determinado, transformándolo en distribuciones de tamaño (Zetasizer Nano User Manual, Man0317 Issue 5.0, 2009).

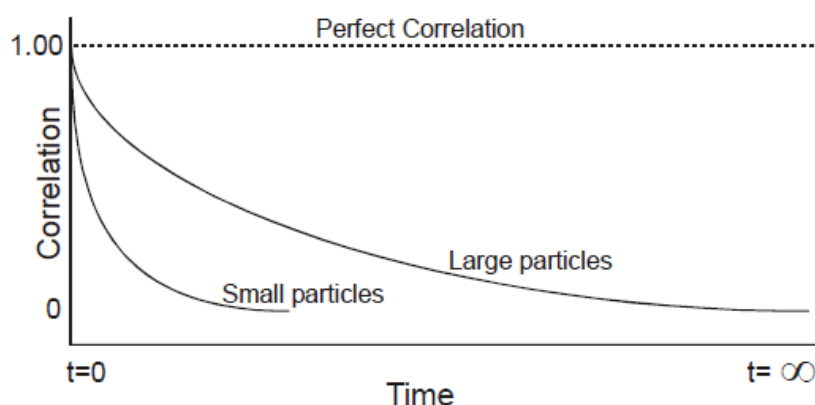


Figura 7. Gráfica que muestra las funciones de correlación en el tiempo para dos tipos de partículas de diferente tamaño. El factor 1 muestra una perfecta correlación, mientras que su disminución representa su pérdida progresiva hasta un tiempo infinito, (Zetasizer Nano User Manual, Man0317 Issue 5.0, 2009).

Las medidas de la movilidad electroforética (EPM), realizadas con el mismo equipo (Zetasizer Nano ZS), permiten el análisis de la movilidad de las partículas cargadas bajo la aplicación de un

campo eléctrico sobre las muestras mediante la técnica de Electroforesis Doppler con Láser (LDE). Aplicando un campo eléctrico en una suspensión coloidal se produce la migración de las partículas hacia uno de los electrodos, fenómeno denominado electroforesis. La movilidad electroforética es la magnitud que se puede medir, describiéndose como la velocidad de la partícula por unidad de campo eléctrico aplicado. El procedimiento de medición consiste en el análisis de una luz láser que es dispersada por las partículas cuando se aplica un campo eléctrico sobre la suspensión. La radiación dispersada por las partículas cargadas experimenta un desplazamiento en su frecuencia debido al efecto Doppler, que es detectado en el equipo y convertido a un valor de movilidad determinado. Estos valores de movilidad electroforética son importantes porque se relacionarán con potenciales zeta mediante la ecuación de Henry (Zetasizer Nano User Manual, Man0317 Issue 5.0, 2009).

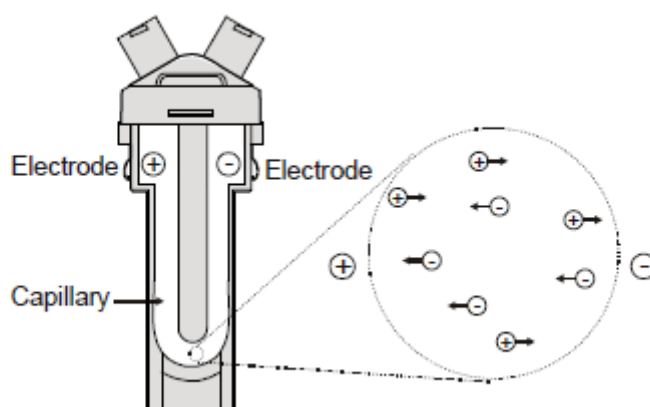


Figura 8. Celda empleada durante la experimentación para realizar las medidas de movilidad electroforética de las NPs (Zetasizer Nano User Manual, Man0317 Issue 5.0, 2009).

Los potenciales zeta de las muestras permitirán el estudio de cómo la carga superficial de las NPs puede influir en su interacción con materia orgánica, su variación una vez se producen los fenómenos de adsorción y su análisis en función de ciertos factores del medio.

- ICP-OES

La Espectroscopía de Emisión Óptica con Plasma Acoplado Inductivamente es una técnica analítica empleada para la detección de metales traza. El plasma es empleado para la atomización de la muestra, donde se producirá una excitación de los iones, que tras volver a su estado fundamental producen una emisión característica de un elemento particular. Esta radiación es dispersada por la red de difracción y el detector óptico se encarga de la medición de las intensidades. En función de la intensidad se determina la concentración del elemento en la muestra. El equipo de ICP-OES (Spectro Analytical Instruments and Activa-S, Horiba Scientific) fue empleado para la determinación de la concentración real de Zn contenida en las disoluciones empleadas para la experimentación a partir del material con nanopartículas de ZnO, y corregir las posibles diferencias entre estimaciones de concentración preparada.

- Análisis de Carbono Orgánico y Nitrógeno

El análisis de contenidos de las muestras en carbono y nitrógeno se realizó mediante el equipo multi N/C® 3100 (Analytik Jena AG, Alemania). Éste permite el análisis simultáneo de diferentes tipos de contenidos de carbono en muestras acuosas como el Carbono Orgánico Total (TOC), el Carbono Orgánico No Purgable (NPOC), el Carbono Total (CT), el Carbono Inorgánico Total (TIC) o el Nitrógeno Total (NT) en muestras acuosas. El control y la evaluación de los datos de las mediciones se realizaron mediante el software de control multiWin.

El principio de funcionamiento (figura 9) consiste en la introducción de la muestra en un sistema de alimentación por inyección para la digestión de la muestra mediante la oxidación de alta temperatura termocatalítica en horno, que puede llegar a temperaturas de entre 850 y 900°C. La parte alícuota de la muestra se dosifica automáticamente desde un tubo de atomización. Allí se produce la pirolisis y oxidación de las muestras en la corriente del gas portador, que sirve como medio para las reacciones. El gas formado se enfría en un serpentín de condensación con una posterior separación. Tras un proceso de secado y separación de gas de efecto corrosivo, el gas de medición CO_2 es llevado al detector NDIR (detector de absorción de infrarrojos no dispersos). Los gases con moléculas de átomos que no son similares poseen en la banda de frecuencia infrarroja unas bandas de absorción específicas. Si un haz de luz es enviado en la zona activa de infrarrojo, estos componentes de gases absorben en longitudes de onda una parte proporcional del haz completo, sugiriendo en función de su proporción su concentración en la mezcla de gas. El receptor de haz empleado es selectivo para CO_2 . La concentración de CO_2 y NO se registra varias veces en un segundo. De la sucesión de señales se forma una integración a lo largo del tiempo. Esta integral es proporcional a la concentración de carbono y/o nitrógeno presente en la solución medida, que mediante una función de calibración anteriormente establecida se determina el contenido en la muestra (Multi N/C® 3100 Manual, 2010).

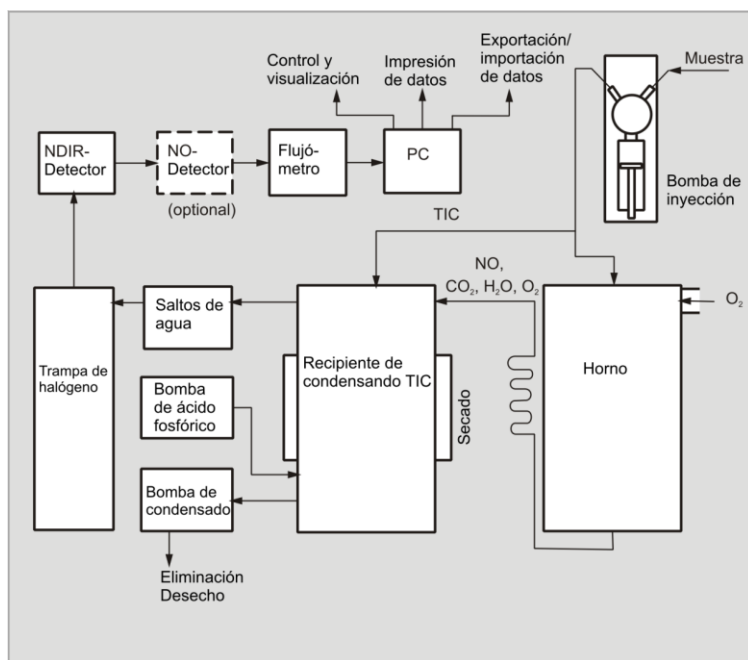


Figura 9. Esquema de funcionamiento del equipo multi N/C® 3100 (Analytik Jena AG, Alemania).

Este equipo se emplea en este trabajo para la determinación de las concentraciones de carbono o nitrógeno que están presentes en las muestras tras un periodo de incubación donde se ha producido una interacción entre materia orgánica y nanopartículas. Las concentraciones se corresponden a las cantidades de BSA o HA libre en la muestra, que servirán para calcular la cantidad que queda adsorbida en la superficie de las nanopartículas formando las coronas al conocer la concentración inicial de materia orgánica presente en las muestras. Estos resultados se aplicarán en el estudio de las isothermas de adsorción para los dos tipos de nanopartículas (ZnO y TiO₂) en diferentes condiciones del medio. El cálculo de las concentraciones de materia orgánica es posible al haber establecido una calibración en este mismo equipo con patrones de HA o BSA a diferentes concentraciones.

Los análisis realizados a cada una de las muestras se corresponden a TOC, NPOC y TN. Para la integración de TOC (análisis de carbono orgánico total) se emplea un método diferencial específico, consistente en una diferencia de señales entre carbono total (TC) y carbono total inorgánico (TIC), que son medidas de forma simultánea. Para el análisis del carbono orgánico no purgable (NPOC) se emplea una variedad respecto a los otros, aplicando una acidificación previa de la muestra con HCl (2N) para eliminar el CO₂ presente en la muestra.

2.2. Metodologías analíticas

- Celdas de potenciometría

Son dispositivos donde se encuentran unas determinadas disoluciones de trabajo que permiten el control de ciertas condiciones de medida, como la temperatura y el pH en el que se disponen. En la figura 10 se muestra el tipo de celda con el que se trabajó, permitiendo un aislamiento del exterior para controlar también la posible entrada de CO₂ en su interior que puede influir en el pH final de medida. Este control es importante, sobre todo en las medidas con ZnO, puesto que una variación en sus niveles puede producir su solubilización desde la superficie de las nanopartículas, impidiendo la correcta caracterización de sus interacciones con BSA.



Figura 10. Celda de trabajo para potenciometrías, en la caracterización de soluciones de NPs en interacción con BSA. La celda se muestra en sentido invertido puesto que está inutilizada. En ella se observan la entrada y salida del flujo de agua (burbujas interiores) para el dispositivo termostático.

El objetivo principal de las celdas de potenciometría es la caracterización de un tipo de nanopartículas, o bien de ZnO o bien de TiO₂, en su interacción con BSA, preparados en una disolución a una fuerza iónica determinada dentro de la celda. La caracterización consiste en la extracción de una alícuota de la muestra para la medida de tamaño y potencial zeta en el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Bedford, MA) y así estudiar la variación de estos parámetros que determinan la interacción proteína-NP en función del pH. Para el control de la temperatura, que también puede influir en el proceso de formación de coronas proteicas, se emplea una red de conexiones por el que fluye agua a la entrada y salida de la celda, a modo de panel termostático, que mantiene unas condiciones fijas de temperatura para la solución de trabajo a 25°C. Además para evitar la presencia de CO₂ se emplea un sistema de alimentación que bombea nitrógeno gas en su interior. La celda solo es abierta para la extracción de alícuotas durante la experimentación. También cuenta con la presencia de un electrodo de vidrio combinado (Orion 9103), conectado en un pHmetro (Orion 920+, Thermo Electron Corporation). Para la modificación del pH se emplearon HNO₃ y NaOH 0.1M y 0.001M en función del grado de

variación que se quisiera conseguir. Los experimentos realizados en este apartado se clasifican en dos tipos de experimentos, los realizados con NPs de ZnO y los que emplean NPs de TiO₂, siempre con presencia de BSA en la solución para estudiar su interacción. Los experimentos abarcan un rango de pH de 5 a 10, para estudiar su comportamiento en un amplio rango de condiciones. Puesto que puede haber problemas de solubilidad con el ZnO a bajo pH, que se estima comenzará a producirse a partir de un nivel de pH 8, se trabaja desde el pH más elevado hacia condiciones más ácidas. La solución en la celda se mantiene en agitación para evitar problemas de sedimentación.

Para ambos tipos de nanopartícula las condiciones son las mismas. La solución de trabajo consiste en un medio acuoso con una fuerza iónica 0.1M, preparado a partir de NaNO₃ (1M). Las concentraciones de la solución son preparadas por pesada, y trasvasadas finalmente a la celda en un volumen final de 50 ml. Una vez preparada la celda se añaden 100 ppm de BSA (0.05%) en su interior, con el sistema termostático en funcionamiento y con bombeo de nitrógeno. Se produce el ajuste de la solución mediante adiciones de NaOH (0.1M) hasta pH 10, registrado en el pHmetro, que ha sido calibrado previamente. Tras su ajuste, se añade finalmente la nanopartícula correspondiente en una concentración de 100 mg/L (sonicada previamente durante 30 minutos en baño de US), y se ajusta de nuevo el pH, que ha podido ser modificado. Antes de la estabilización, se producen anotaciones de las cantidades de ácido o base que se van adicionando a la solución, para la estimación real final de las concentraciones para cada medida de caracterización. Una vez estabilizado en un valor específico de pH, se procede con la extracción de 1 ml de muestra para trasvasarlo a una cubeta donde se medirán los tamaños y potenciales zeta en el equipo Zetasizer. Tras su medida se procede a la acidificación de la solución en la celda hasta un nuevo pH, donde tras su estabilización se realizará de nuevo una medida. Los puntos de estabilización de pH establecidos corresponden a 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

- Cinéticas de agregación

Las cinéticas de agregación se corresponden con el estudio de los procesos de interacción entre nanopartícula y materia orgánica en función del tiempo. Para ello se empleó el equipo Zetasizer, que mediante DLS sirvió para la caracterización de los tamaños de nanopartícula, con o sin recubrimiento, en diversos tipos de condiciones. En este caso los experimentos solo están realizados con nanopartículas de TiO₂, y su interacción con dos tipos de materia orgánica: BSA y HA. Los procedimientos son bastante similares entre sí, con una preparación inicial de las soluciones de estudio, con unas determinadas condiciones. Las soluciones siempre tenían tres componentes fundamentales: las nanopartículas de TiO₂, la materia orgánica correspondiente, y NaNO₃ en una concentración específica para la fuerza iónica de la dispersión. Tras su preparación, se realizaron unas medidas de las muestras en cubetas de cuarzo con un volumen de 1 ml. Dentro del equipo de medida Zetasizer, se pueden controlar los resultados de las medidas mediante el software (Zetasizer Software, Malvern Instrument Ltd). Dentro de todas las posibilidades que ofrece, se establecen para las medidas con DLS para los tamaños de las muestras una serie de parámetros optimizados como son la posición del haz incidente y el atenuador, para la mejor lectura posible en la medida. En el caso de la realización de las cinéticas, es necesario cambiar estos dos a unos valores fijos, que son determinados mediante su optimización a partir de una medida inicial de cada muestra. Además, también se fijan los tiempos de medida para la obtención de datos en breves periodos de tiempos, tanto en su número como en su duración. El proceso de toma de datos por parte de Zetasizer se estima en un mínimo de media hora por cinética realizada, para el análisis de su comportamiento en el tiempo. Los resultados se recopilan en tamaños de partícula (z-average) estimados en función del tiempo.

Los diferentes experimentos llevados a cabo sirvieron para la comparación de diversos factores para analizar cómo influyen en la interacción entre componentes y estudiar posibles fenómenos de agregación. Estos factores corresponden a cada experimento, siendo el primero de ellos el medio de trabajo, con la comparación de las cinéticas en función de si las nanopartículas de TiO_2 se encontraban en MilliQ, o en el medio de trabajo (con BSA y a una fuerza iónica 0.1M). También se estudiaron en función del pH en que se encuentre la muestra, comparando los resultados para valores de pH 5, 7 y 9, con la misma solución de trabajo. Factores de composición de la muestra como la concentración de BSA que interactúa con la nanopartícula, distintas fuerzas iónicas y el propio orden de los reactivos fueron a su vez analizados para comprobar su influencia. Por último, se estudió la relevancia de la concentración de nanopartícula para analizar su comportamiento, comparando cinéticas con concentraciones de 100 mg/L con 50 mg/L.

- Isotermas de adsorción

Las isotermas de adsorción se describen como el estudio de la adsorción de materia orgánica (BSA o HA) en la superficie de las nanopartículas a una temperatura constante. Estas representan la cantidad de soluto que queda ligado en la superficie del sólido coloidal formando un recubrimiento frente a su concentración total en la fase acuosa.

La principal condición que caracteriza estos experimentos es la fijación de la temperatura en la que se producen las interacciones, a 25°C, gracias a la utilización de incubadora (Labnet 211DS) en agitación orbital. Las diferentes muestras fueron preparadas en un determinado rango de pH, para la posterior caracterización de los procesos de adsorción en función a esta variable. Los experimentos realizados se pueden clasificar en tres grupos principales. El primero se basa en las isotermas de adsorción de BSA en la superficie de nanopartículas de ZnO , con diferentes concentraciones de proteína en las muestras (20, 100 y 500 ppm), con el fin de analizar las diferencias en los procesos de interacción en función de la cantidad de proteína que se encuentra en el entorno, todo ello en un rango de pH que comprende de 7 a 10. En segundo lugar, se estudia la adsorción de BSA con nanopartículas de TiO_2 en un rango de 5 a 10, pero con distintas fuerzas iónicas (0.1M y 0.001M) para cada muestra. De este modo se observará la relevancia que el electrolito puede tener en un proceso en el cual predominan las interacciones por cargas electrostáticas. Finalmente, se realizó una isoterma para el caso de TiO_2 con HA, también a diferentes fuerzas iónicas (mismo caso que el anterior experimento). Esto servirá para observar si hay una diferencia de comportamiento en los procesos de formación de coronas en función de la materia orgánica presente, con la que se pueda producir una adsorción potencial.

Previo a cualquier procedimiento experimental con las muestras, fue necesario realizar unas calibraciones tanto con la BSA como con HA en el equipo multi N/C® 3100 (Analytik Jena AG, Alemania). El equipo se emplea en las mediciones de contenidos en carbono (NPOC) y nitrógeno (TN) para la determinación de las concentraciones de materia orgánica presentes en las muestras. Puesto que el software trabaja en Unidades de Área (UA), como señal, es necesario un paso intermedio para calcular las concentraciones correspondientes. La cantidad de materia orgánica en las muestras no es la total inicial contenida durante su preparación, sino que como se explicará posteriormente se corresponde con las cantidades libres, es decir, que no han sido adsorbidas en la superficie de las nanopartículas durante el proceso de incubación. Los estándares consisten en muestras que únicamente contienen unas determinadas concentraciones de MO, siendo su rango determinado mediante el máximo que pueden contener (el inicial en las muestras) de 100 ppm.

En el caso de la BSA se parte de un preparado en polvo con una concentración inicial de 10 g/L. A partir de él se preparan los estándares en unas concentraciones de 100, 50, 25, 10, 2, 1 y 0.5 mg/L. Las concentraciones fueron determinadas específicamente por pesada para posteriores cálculos, siendo preparados en agua MilliQ. Para las concentraciones más bajas se empleó como disolución intermedia el estándar de 100 mg/L. Posteriormente, se realizan las pertinentes medidas en el equipo multi N/C® 3100, obteniéndose los resultados en Unidades de Área (ver apartado Resultados) para modalidad NPOC, carbono orgánico no purgable. Con ellos se realizará una representación de las unidades de área en función de la concentración con la que han sido preparados de BSA y se obtiene la recta de calibración para posteriores cálculos en muestras reales. En el caso del ácido húmico se procede de manera análoga, solo que a partir de un stock inicial de 3.558 g/L de HA, y con un estándar más añadido de 5 mg/L. Las concentraciones de los estándares son, por tanto, de: 100, 50, 25, 10, 5, 2, 1 y 0.5 mg/L.

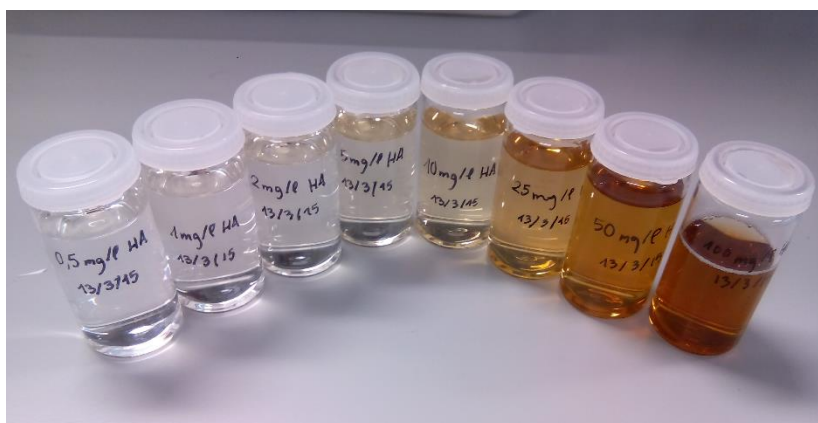


Figura 11. Estándares de HA preparados para la calibración en el equipo multi N/C.

Tras las calibraciones correspondientes para el equipo de medida de carbono orgánico, ya se pueden llevar a cabo los procedimientos correspondientes a las isotermas de adsorción de las muestras con BSA o HA en interacción con nanopartículas. La preparación de las muestras, al igual que en el caso para la cinética de agregación, se corresponde con tres componentes principales: NaNO_3 para la fuerza iónica, la MO determinada (BSA o HA) y las nanopartículas (de ZnO o TiO_2). En primer lugar se prepara el medio con la fuerza iónica y la materia orgánica, se produce un ajuste de pH, mediante adiciones de HNO_3 o NaOH (0.1M) preestablecidas, y por último la nanopartícula. Es importante aclarar que las adiciones se realizan con volúmenes escalonados de ácido o base, para procurar tener en cada muestra un pH distinto, dentro del intervalo determinado. Tras su preparación se dejan en incubadora durante 48 horas, en unas condiciones de agitación orbital constante (40 rpm) a una temperatura de 25°C. Tras 24 horas en incubadora, se realizan unas medidas de pH de las muestras para comprobar si se mantienen estables respecto a los de sus inicios durante su preparación o si se han producido variaciones. En tales casos, se realizan unas pequeñas adiciones de HNO_3 o NaOH (0.001M) para unos determinados valores, que quedan registrados. De este modo se intenta asegurar tener el máximo número de puntos representativos para los posteriores resultados en función del pH. Después de ser medidos y en algunos casos ajustados, se devuelven a la incubadora, donde permanecerán 24 horas más hasta completar los días de interacción. Una vez finalizado este periodo, se miden de nuevo en el pHmetro, tomando los valores como los finales. Se toma de cada uno de ellos un volumen de 1.5 ml en eppendorfs, para la posterior medida de tamaños y potenciales zeta en el equipo Zetasizer, y complementar los resultados a su caracterización. Del resto de muestra se toman 14 ml que se trasvasaran a unos tubos falcon para su posterior

centrifugación, en unas condiciones de 1 hora de duración a 4700 rpm (4816 Gs) a 25°C. Durante el proceso de centrifugación se produce la separación de las nanopartículas con BSA o HA adsorbido (hard coronas) como sedimento, mientras que el resto queda libre de la interacción en el sobrenadante. Tras su finalización, el sobrenadante es recogido, estimándose en un volumen de 10 ml, lo necesario para las posteriores medidas en el equipo multi N/C® 3100 para medir el carbono orgánico no purgable (NPOC), cuyas concentraciones de materia orgánica libre se calcularan mediante las calibraciones realizadas anteriormente con los estándares preparados. De este modo, los resultados son finalmente representados como cantidades de MO libre (en concentración y en porcentaje), como MO adsorbida y como cantidad de MO por masa de nanopartícula (denominado bibliográficamente como función “q”, g BSA/ g ZnO NP); todo ello en función del pH. Las condiciones de cada uno de los experimentos se muestran gráficamente junto con los resultados en el apartado de resultados y discusión.

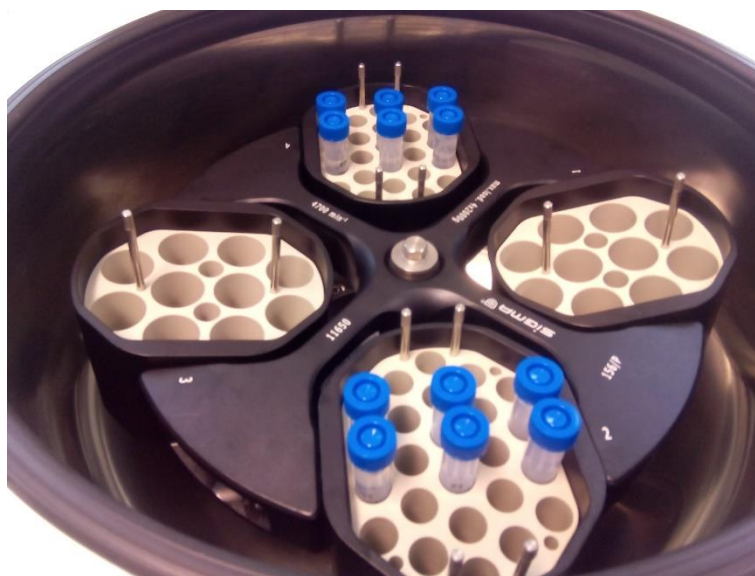


Figura 12. Imagen de muestras preparadas durante experimento de isoterma de adsorción entre MO y NPs, en la cetrífuga para la separación de la materia orgánica libre de la adsorbida junto con la nanopartícula.

- Cálculos de especiación

Las cantidades totales de zinc y titanio de cada muestra se reparten entre diferentes especies químicas posibles. Un ejemplo es en el caso del zinc como Zn^{2+} , $Zn(OH)^+$, $Zn(OH)_2(aq)$, $ZnO(s)$, etc. La cantidad relativa de cada especie depende de la concentración total de zinc, así como del pH, fuerza iónica y temperatura, que puede ser calculado mediante diferentes programas informáticos de especiación a partir de las constantes de formación termodinámicas de las diferentes sustancias. En este trabajo se empleó el programa Visual MINTEQ (versión 3.0, Gustafsson, J. P, 2010), que incluye modelos de equilibrio químico para cálculos de especiación en metales, considerando equilibrios de solubilidad, adsorción, etc. y que está especialmente diseñado para aguas naturales. En concreto, fue empleado a lo largo de este trabajo para estudiar las problemáticas que la solubilidad del ZnO podría causar a bajo pH, de modo que tanto en experimentos de celdas de potenciometría como en isotermas de adsorción se pudiera estimar unas concentraciones adicionales para la preparación de las muestras a una cantidad que realmente supusiera no tener pérdidas de ZnO en forma de nanopartícula por esta solubilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Caracterización de nanopartículas

Los resultados obtenidos en la caracterización de los dos tipos de nanopartículas empleados a lo largo de este estudio se corresponden con las medidas de los tamaños y potenciales zeta de soluciones que los contienen, siempre tomándose como una primera toma de contacto para observar si se da un fenómeno de agregación para unas determinadas condiciones o si en la variación de componentes del medio se propician cambios en los tamaños de las partículas o la carga superficial, sin fijarse unas condiciones de pH o temperatura específicas. Para ello se empleó el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Bedford, MA), preparando las muestras de acuerdo con los protocolos descritos en el apartado de Material y Métodos. Todos los resultados se obtuvieron por triplicado, presentándose finalmente como una media de entre los tres valores.

- Nanopartículas de ZnO

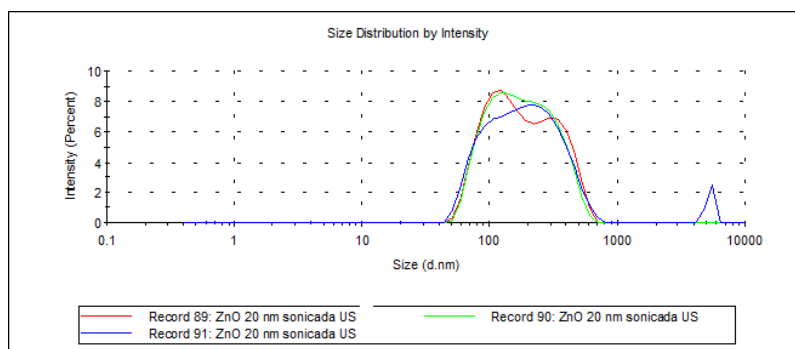
Para la preparación de las muestras con nanopartículas de ZnO, se emplearon stocks preparados previamente con una concentración de 1 g/L. Tras un periodo de baño de ultrasonidos de un total de 30 minutos se trasvasaba un volumen hasta la cubeta correspondiente (figura 8) a una concentración de 100 mg/L, donde se realizarán las mediciones de tamaño y potencial zeta. Los resultados se muestran en la figura 13.

ZnO NPs					
Diámetro (nm)			Potencial zeta (mV)		
214.5	210.1	185.9	-34.1	-34.6	-34.3

ZnO NPs			
Diámetro medio (nm)	SD (nm)	Potencial zeta medio (mV)	SD (mV)
203.5	15.4	-34.33	0.25

Figura 13. Resultados de tamaños y potenciales zeta para las soluciones de ZnO NPs empleadas durante el estudio, a una concentración de 100 mg/L en agua MilliQ.

Los parámetros de tamaño en nm son los correspondientes a los diámetros hidrodinámicos obtenidos mediante DLS, mientras que el potencial zeta es obtenido mediante una correlación entre las movilidades electroforéticas medidas en el mismo equipo. Aparte de estos resultados, también se obtienen mediante el software de Zetasizer Nano ZS los distintos tipos de distribuciones respecto al tamaño en intensidad, número y volumen; que pueden aportar información adicional.



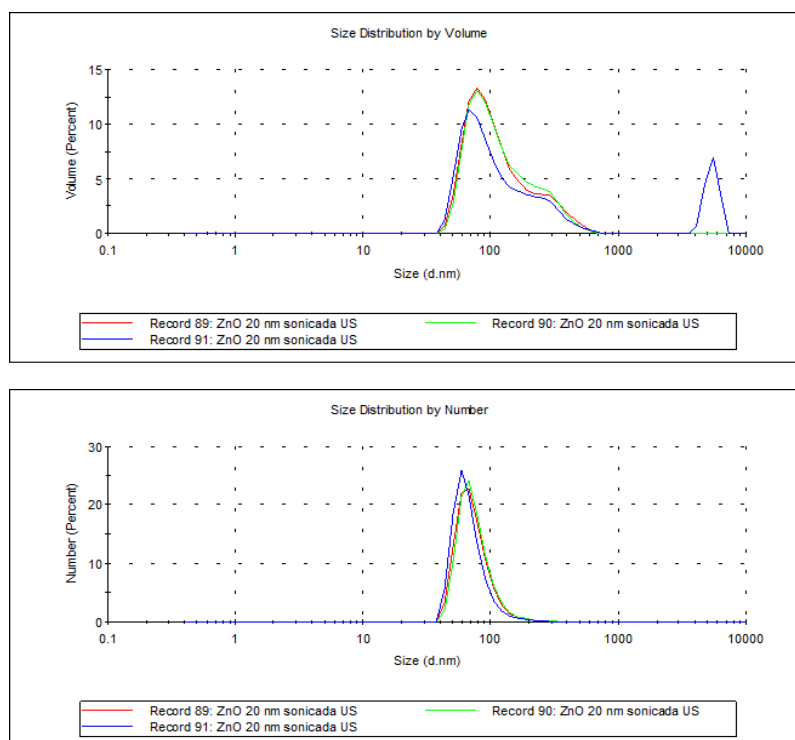


Figura 14. Distribuciones de tamaño por intensidad, volumen y número para tres repeticiones de muestra de ZnO NPs (100 mg/L) en agua MilliQ.

Estas distribuciones muestran las tres repeticiones de las medidas para la misma muestra, cuyos datos quedan reflejados en la figura 13. En ellos se observa que la distribución por número difiere de las otras dos representaciones al no mostrar un pico comprendido entre un tamaño de 1000 y 10000 nm. El principal problema de las técnicas DLS es que la presencia de cualquier sustancia, incluso polvo, que tenga un tamaño superior al analito de estudio, puede producir unas señales en la dispersión de radiación muy grandes frente a las nanopartículas. Esto produce la integración de tales picos en volumen e intensidad, sin embargo no son relevantes en número, puesto que puede deberse a un artefacto cuya presencia es despreciable. Las gráficas sirven para corroborar que las repeticiones muestran distribuciones idénticas de medida, sin presentar problemas por posible sedimentación entre medidas dentro de la muestra, lo cual también queda presente observando los valores de las desviaciones estándar para los tamaños y los potenciales zeta. Exceptuando la última medida, que es algo menor que el resto, pudiendo ser debido a que el pico registrado para mayores tamaños produzca una disminución en la lectura de intensidades para los picos de menor tamaño.

Estos resultados se comparan con los tamaños y potenciales para las nanopartículas en un medio que tendrá las mismas características que la mayoría de experimentos posteriores, tanto en las celdas de potenciometría como en las isothermas de adsorción. Dichas condiciones son la presencia de BSA (100 ppm) y la adición de electrolito (NaNO_3) 0.1M para ver cómo influye sobre los parámetros de estudio. La comparación de los resultados se muestra en la figura 14.

Muestra	Diámetro medio (nm)	SD (nm)	Potencial zeta medio (mV)	SD (mV)
ZnO NP	203.5	15.40	-34.33	0.25
ZnO NP + BSA + NaNO_3	435.3	12.36	-11.80	0.53

Figura 15. Comparativa de tamaños y potenciales zeta para dos tipos de muestra, una con nanopartículas de ZnO en agua MilliQ, y otra con la misma concentración de nanopartículas (100 mg/L) pero con presencia de BSA (100 mg/L) y una fuerza iónica de 0.1M.

Se observa que los tamaños registrados son mucho mayores, más del doble, en el caso de la presencia de BSA y electrolito, que cuando se encuentra exclusivamente la nanopartícula. La desviación estándar de los resultados apenas ha variado, lo que indica una buena sincronización de los resultados en sus distintas repeticiones. En cuanto al potencial zeta se observa que la carga superficial medida es menor (-11.8 mV) en términos de valor absoluto que cuando solo está la nanopartícula (-34.33 mV). Ambos fenómenos están relacionados, puesto que con un descenso de la carga superficial de las nanopartículas, estas tienden a la agregación por la disminución de la repulsión de sus cargas superficiales. En posteriores apartados de experimentación se incidirá más en si este fenómeno es debido a la adsorción de BSA en la superficie de la nanopartícula, que puesto que tienen a su vez una carga neta puede influir en el potencial zeta de las partículas, o si puede deberse a la presencia de electrolito en la solución, que aumenta la fuerza iónica del medio. Este aumento produce un apantallamiento de las cargas superficiales que también puede disminuir las repulsiones electrostáticas de las partículas.

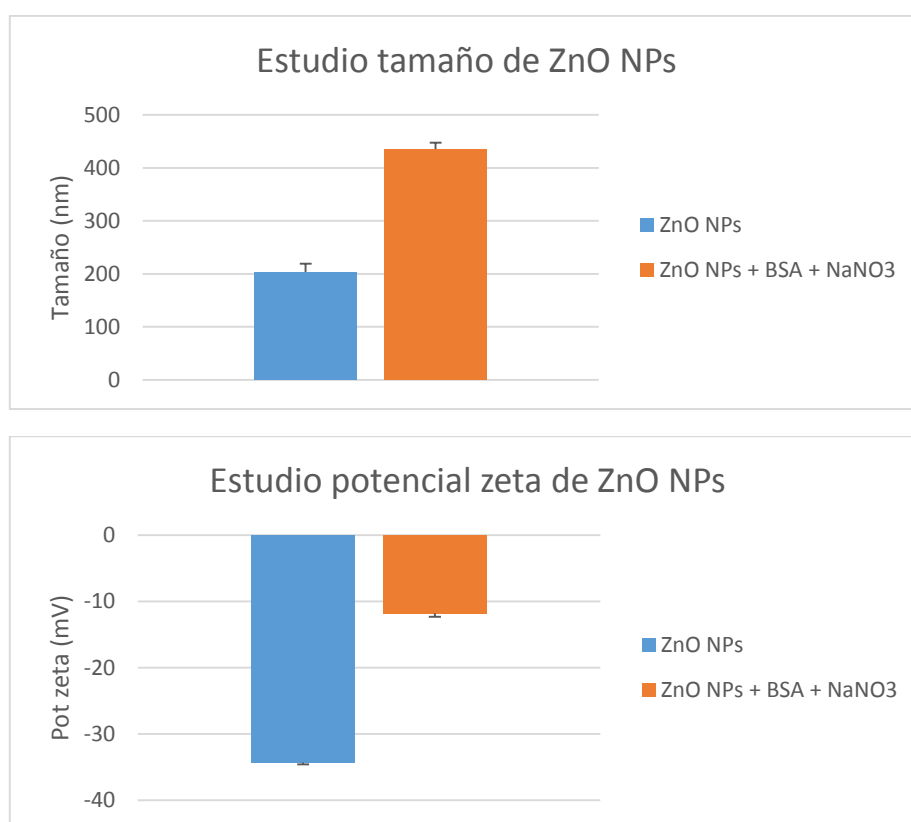


Figura 16. Representación gráfica de los resultados comparativos para dos tipos de muestras con nanopartículas de ZnO (100 mg/L). El primero, en azul, con la nanopartícula exclusivamente en MilliQ; el segundo en un medio con BSA (100 mg/L) y con fuerza iónica 0.1M (NaNO₃).

- Nanopartículas de TiO₂

Al igual que en el caso del ZnO, se emplearon stocks preparados previamente con una concentración de 1 g/L de rutilo para las muestras de TiO₂. Tras un periodo de baño de ultrasonidos de un total de 30 minutos se trasvasa un volumen hasta la cubeta correspondiente (figura 8) en una concentración de 100 mg/L, donde se realizarán las mediciones de tamaño y potencial zeta. Los resultados se muestran a continuación:

TiO ₂ NPs					
Diámetro (nm)			Potencial zeta (mV)		
255.3	257.8	259.9	-44.7	-44.6	-44.0

TiO ₂ NPs			
Diámetro medio (nm)	SD (nm)	Potencial zeta medio (mV)	SD (mV)
257.67	2.30	-44.43	0.38

Figura 17. Resultados de tamaños y potenciales zeta para las soluciones con TiO₂ NPs empleadas durante el estudio, con una concentración de 100 mg/L en agua MilliQ.

Se observan unos resultados similares respecto a las soluciones de nanopartículas de ZnO, aunque no puedan relacionarse directamente. En ambos casos los tamaños sin fijación de condiciones de pH y temperatura son del orden de unos 200 nm. Respecto al tamaño primario de partícula que indica el productor hay una clara diferencia (en torno a 5 o 15 nm), si bien las condiciones y técnicas de medida son totalmente distintas. Donde sí se aprecia una distinción es en la carga superficial de las nanopartículas de dióxido de titanio, superiores en valor absoluto a las de óxido de cinc. Se remarca esta diferencia porque puede suponer un dato de interés para posteriores estudios en la adsorción de materia orgánica en su superficie.

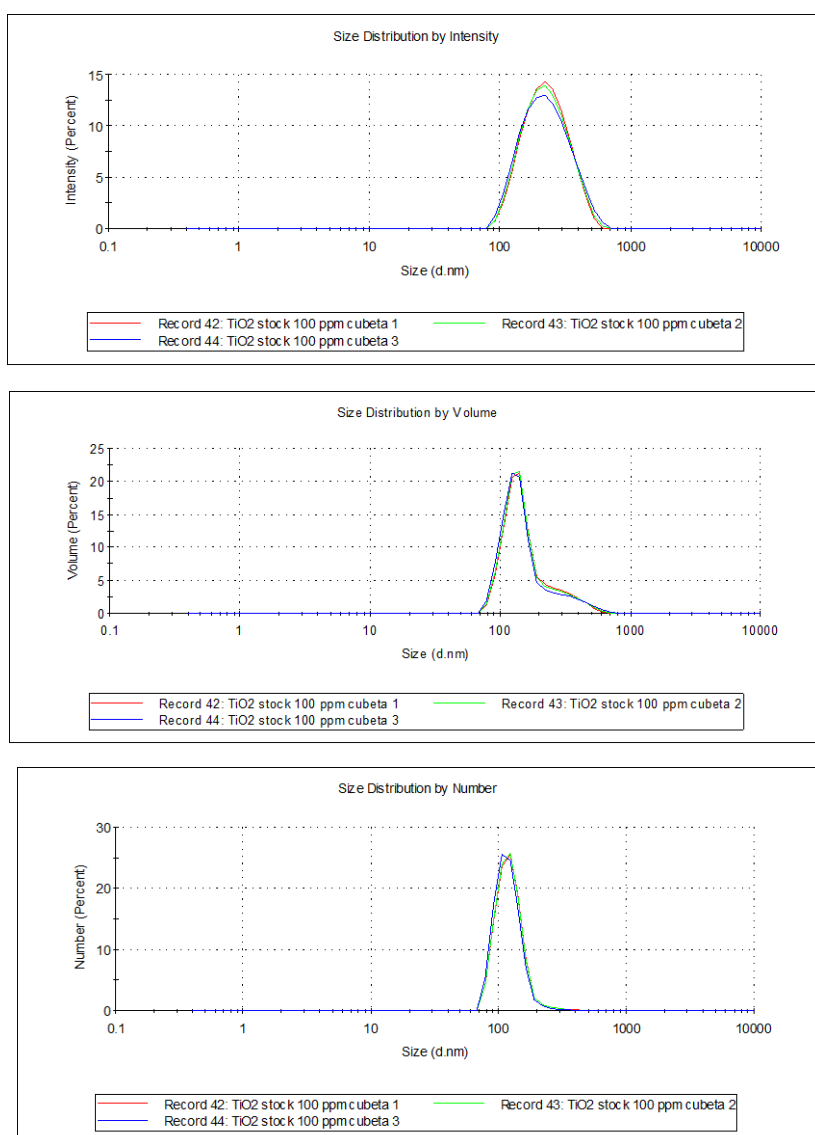


Figura 18. Distribuciones de tamaño por intensidad, volumen y número para tres repeticiones de muestra de TiO₂ NPs (100 mg/L) en agua MilliQ.

Los tres tipos de distribuciones muestran la fuerte correlación de las señales para las repeticiones de las medidas realizadas en la muestra, descartándose problemas por sedimentación o por influencia de artefactos en la medida de la dispersión de radiación. En cuanto al pico obtenido en la distribución por número se muestra un bajo grado de polidispersidad.

En este caso, se emplea para la comparativa de resultados en la caracterización no solo BSA como materia orgánica con la que puede interactuar la nanopartícula, sino también HA. Esto supondrá el estudio de un mayor número de casos que puede ayudar a vislumbrar diferencias en fenómenos de adsorción y agregación en diferentes tipos de materia orgánica. Las condiciones son idénticas que en el caso anterior con ZnO NPs, con la MO en concentraciones de 100 mg/L, y con una fuerza iónica de 0.1M. Además, se incluye también como novedad la consideración de una fuerza iónica más baja (0.001M) para ver su efecto en la posible agregación y en la carga superficial tanto para el caso con BSA como con HA. Los resultados se muestran tabulados en la figura 19.

Muestra	I (M)	Diámetro medio (nm)	SD (nm)	Pot zeta medio (mV)	SD (mV)
TiO ₂ NP	-	205.77	0.67	-44.43	0.38
TiO ₂ NP + BSA + NaNO ₃	0.1	206.93	1.18	-17.43	0.25
TiO ₂ NP + BSA + NaNO ₃	0.001	214.40	1.21	-	-
TiO ₂ NP + HA + NaNO ₃	0.1	635.10	40.31	-	-
TiO ₂ NP + HA + NaNO ₃	0.001	211.87	3.35	-	-

Figura 19. Comparativa de tamaños y potenciales zeta para varios tipos de muestra. Una con nanopartículas de TiO₂ en agua MilliQ, y el resto con la misma concentración de NPs (100 mg/L) pero con presencia variable de MO (BSA ó HA) y con una fuerza iónica también variable (0.1 ó 0.001M).

Lo primero que se observa es que no hay un cambio en los tamaños de diámetros hidrodinámicos de partícula para el caso que las TiO₂ NPs se encuentran aisladas en MilliQ respecto al medio con BSA y con fuerza iónica 0.1M. Esto es significativo porque en cambio sí que se produce una fuerte variación en el potencial zeta de las muestras, disminuyendo en valor absoluto (-17.43) respecto a la situación inicial (-44.43). Es decir, se produce un cambio en las cargas superficiales de las nanopartículas por efecto de la presencia de BSA o por acción de la fuerza iónica, que puede producir apantallamiento de las cargas con una reducción del potencial zeta de éstas, o por acción conjunta. No obstante, este fenómeno de variación no afecta a los tamaños de nanopartícula que permanecen estables con valores prácticamente idénticos en ambos casos. Esto puede ser debido a que se produce un efecto de reducción de la carga superficial al ser adsorbido sobre la superficie de las nanopartículas la BSA, o por el apantallamiento producido por la fuerza iónica, siendo la cantidad adsorbida lo suficientemente alta como para producir una estabilidad en el TiO₂ que evite fenómenos de agregación, resultado en unos valores de diámetros hidrodinámicos que no ofrecen variaciones.

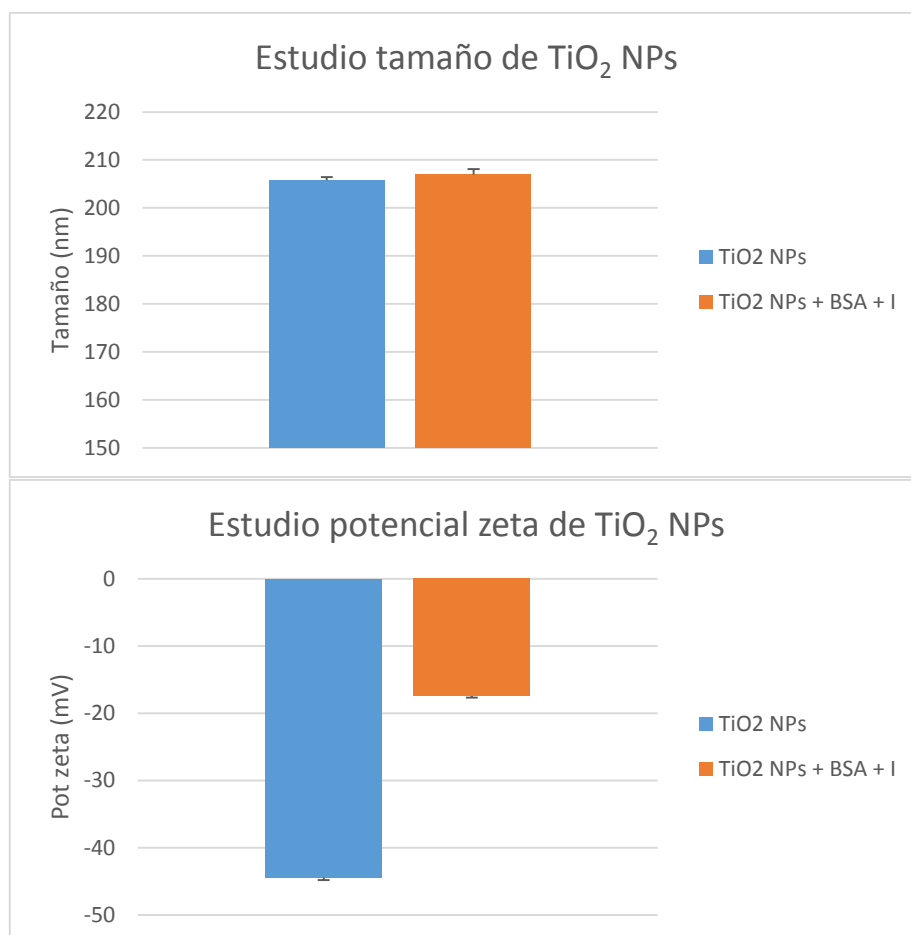


Figura 20. Representación gráfica de los resultados comparativos para dos tipos de muestras con nanopartículas de TiO₂ (100 mg/L). El primero, en azul, con la nanopartícula exclusivamente en MilliQ; el segundo en un medio con BSA (100 mg/L) y con fuerza iónica 0.1M (NaNO₃).

Si estos resultados se comparan con los obtenidos para el caso de ZnO en las mismas condiciones (figura 16), se observan diferentes comportamientos. Siendo el tamaño primario el mismo en condiciones de agua MilliQ, en el caso del ZnO se produce un aumento considerable de los tamaños de partícula cuando se le añade la BSA junto con una fuerza iónica, siendo estable para el TiO₂. El comportamiento de los potenciales zeta es similar para ambos tipos de nanopartícula, con una disminución de los valores absolutos de las cargas cuando se añade el medio en cuestión. La diferencia de comportamiento solo afecta al tamaño, dando como resultado una diferencia de carga negativa neta entre ambos tipos de nanopartícula, ya que siendo mayor en el caso del TiO₂ a pesar del efecto de la fuerza iónica, es lo suficientemente notable como para producir repulsiones electrostáticas entre partículas, mientras que para el ZnO el potencial está más cerca del punto isoeléctrico.

En el resto de casos de estudio tan solo se comparan los tamaños registrados, sin precisar los potenciales puesto que tan solo se corresponde con un primer acercamiento para ver si se producen modificaciones. En posteriores apartados de resultados se profundiza mucho más en los factores que pueden influir en estos cambios y la relevancia que tienen.

Comparando entre los casos con BSA a diferentes fuerzas iónicas (0.1 y 0.001M) no se observan diferencias entre los tamaños de partícula obtenidos, quizá la pequeña variación observada (con unos diámetros en torno a 10 nm mayores para la fuerza iónica más baja) se corresponde con un menor fenómeno de apantallamiento de cargas, puesto que las repulsiones electrostáticas

no son inhibidas en su totalidad. Esto parece indicar que en el fenómeno de estabilidad parece tener una mayor influencia la interacción de la nanopartícula con la proteína que el fenómeno de apantallamiento que pueda provocar el electrolito.

Los resultados también son muy similares en cuanto a las condiciones de fuerza iónica 0.001M para los casos de interacción de TiO_2 con BSA o con HA. Esto indica que a una fuerza iónica tan baja, donde no se produce apenas apantallamiento de las cargas, la estabilidad de las partículas se mantiene tanto en su interacción con BSA como con HA, siendo la naturaleza de la materia orgánica un factor secundario puesto que la propia repulsión electrostática de las partículas ya evita la posible agregación entre sí. No obstante, donde sí que hay una clara diferenciación entre el tipo de materia con la que interactúa la nanopartícula es en el caso de fuerza iónica 0.1M. En estas condiciones, con la presencia de BSA los tamaños se establecen en 207 nm. Sin embargo, con la presencia de HA los tamaños aumentan considerablemente, hasta 635 nm, con una clara tendencia a la agregación. En estas condiciones, donde las cargas superficiales han sido apantalladas, la interacción de la materia orgánica con la nanopartícula determinará si se produce agregación entre partículas o si se formarán recubrimientos proteicos (coronas) para estabilizar los tamaños. En esta diferenciación de resultados lo que resulta obvio es que la naturaleza de las interacciones es diferente entre los dos tipos de MO, siendo claramente visible en el caso de mayor fuerza iónica y siendo irrelevante cuando la fuerza iónica es menor. Según estos resultados parece que la naturaleza de la materia con la que tenga lugar la interacción de la nanopartícula tiene un rol importante en su futura situación de estabilidad, siendo la fuerza iónica del medio a su vez determinante en la propia MO.

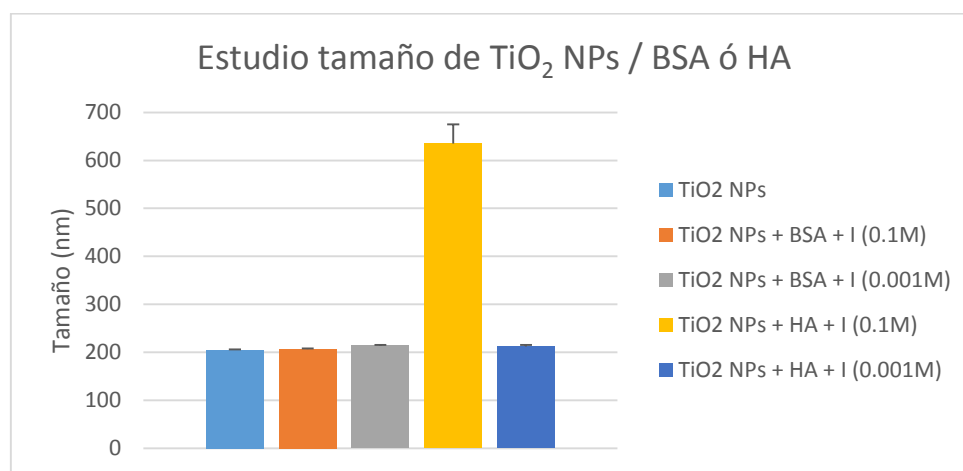


Figura 21. Representación de los diferentes estudios comparativos para distintos medios con TiO_2 NPs.

En los trabajos de Sasidharan et al (2013) y Mohd Omar (2014) se emplean nanopartículas de ZnO , estudiando su interacción con BSA y con HA, respectivamente. De ellos se obtienen datos de gran interés como el potencial zeta de estos tipos de materia orgánica en diferentes pH, lo que permite una mejor explicación de los resultados obtenidos. En cualquier rango siempre presentan carga negativa, aumentando en ambos casos cuanto más básicas son las condiciones (figura 22). Por lo que aun sin controlar las condiciones de pH en estas caracterizaciones se supone tendrán un potencial negativo. Esto conlleva en sus trabajos un aumento de la carga negativa tras la interacción de la MO con las nanopartículas correspondientes. En este caso se observa lo contrario, con unas disminuciones de las cargas en los valores absolutos. El principal motivo de esta diferencia de comportamiento es que en sus experiencias, tanto Mohd Omar et al como Sasidharan et al, no emplean ninguna fuerza iónica en los medios, y como se ha visto

anteriormente parece tener una relevancia en la determinación de la carga superficial muy relevante. De este modo se explicaría ese descenso de cargas al añadir la materia orgánica.

Por otro lado, en estos trabajos también se corrobora que la adsorción de la MO con las nanopartículas aumenta su estabilidad, traducido en reducción de tamaños de diámetros hidrodinámicos analizados. Este comportamiento se corresponde con los resultados obtenidos en esta primera caracterización, donde se mantienen constantes los tamaños de nanopartículas en todos los casos, salvo el que empleaba HA con una fuerza iónica 0.1M.

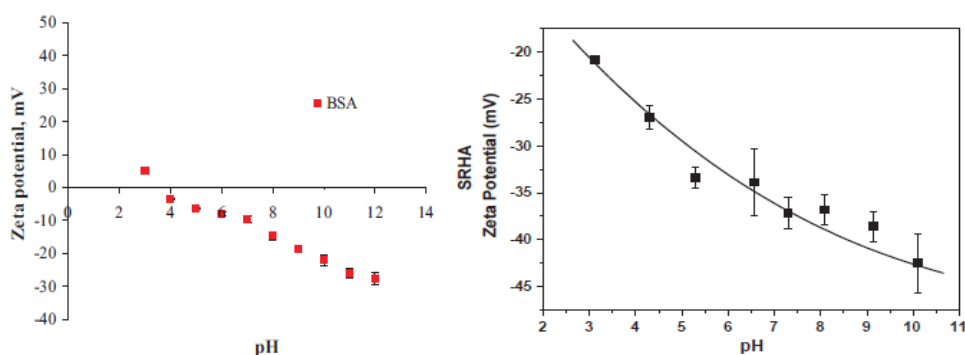


Figura 22. Representaciones de los potenciales zeta en función del pH para dos casos: BSA (Sasidharan et al, 2013); y Ácido Húmico (SRHA) (Mohd Omar et al, 2014).

2. Celdas de potenciometría

El objetivo principal de las celdas de potenciometría es la caracterización de tamaños de partícula y potenciales zeta en un rango determinado de pH. Para ello se emplean unas celdas específicas (figura 10) que permiten su aislamiento, así como la fijación de unas condiciones para conseguir la estabilización de los coloides de las muestras. La temperatura se fijó a 25°C, y la alimentación del sistema con CO₂ permitió la mejora de estabilización de pH. En principio, se quería trabajar con experimentos que consideraran tanto nanopartículas de ZnO como de TiO₂. No obstante, debido a la dificultad encontrada para producir estabilizaciones en el pH para el caso del ZnO se decidió trabajar exclusivamente con el dióxido de titanio. Este hecho puede ser debido a que el ZnO presenta una particularidad en su proceso de disolución, puesto que es exotérmico, a diferencia de la mayoría de óxidos metálicos. Con ello, su solubilidad se reduce al aumentar la temperatura del medio, aunque en las condiciones fijadas de 25°C sigue representando un problema. Para contrarrestar este efecto se intentó aumentar el sistema de alimentación de dióxido de carbono aunque los resultados no mejoraron. Por ello, ante la gran dificultad de fijación de pH aun llevándose a cabo durante varios días en las celdas de trabajo, se decidió trabajar con las nanopartículas de TiO₂ para caracterizar su comportamiento en diámetros hidrodinámicos y potenciales zeta en un rango de pH de 5 a 10, que será el de trabajo para posteriores experimentos como las isotermas de adsorción. También se continuará trabajando con el ZnO en las isotermas y en las cinéticas de agregación, aunque como se comprobará posteriormente también se producen problemas en estas primeras.

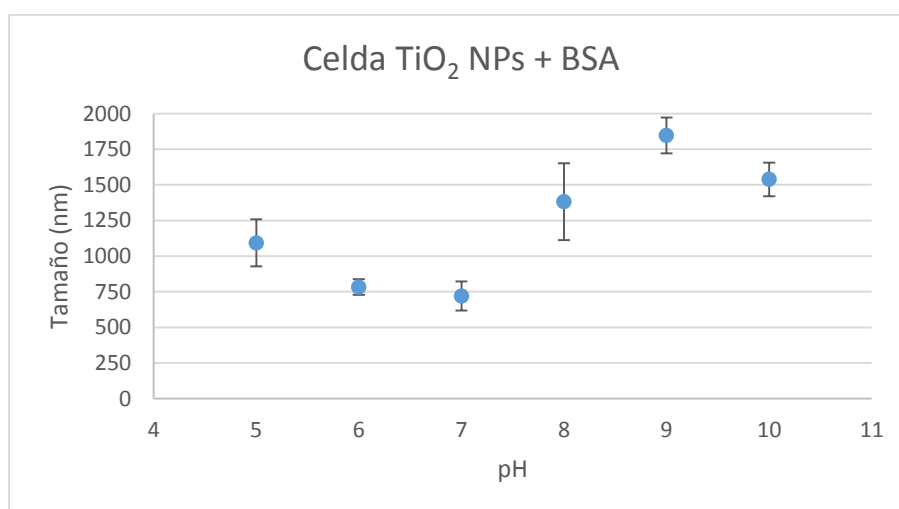
Los resultados que se presentan corresponden a la celda potenciométrica que contiene nanopartículas de TiO₂ (100 mg/L) en interacción con BSA (100 mg/L). La celda es preparada mediante una primera adición de la solución de trabajo consistente en agua MilliQ con BSA en una concentración de 100 ppm, y con una cantidad de NaNO₃ para aportar una fuerza iónica de 0.1M. Tras su preparación en la celda, se inicia un ajuste de pH para la condición más básica determinada, en este caso 10, y progresivamente se irá acidificando sobre la misma celda. Las variaciones de pH se llevan a cabo a través de adiciones de ácido o base (HNO₃ o NaOH, 0.1M)

para su ajuste, controlados siempre con un electrodo de vidrio combinado (Orion 9103) conectado en el pHmetro (Orion 920+, Thermo Electron Corporation). Tras su ajuste se añade la nanopartícula y se ajusta el primer pH hasta su estabilidad. Las medidas realizadas en el equipo Zetasizer se realizan por triplicado para cada muestra a un pH específico, mostrándose en los resultados el promedio de éstos y su desviación estándar. Las condiciones de medida y las adiciones correspondientes se muestran en la siguiente tabla:

pH ₀	Adición HNO ₃ 0.1M (μL)	Adición NaOH 0.1M (μL)	pH _f	Diámetro (nm)	SD (nm)	Pot zeta (mV)	SD (mV)
7.4	-	170	10.17	1538.0	118.12	-21.6	0.75
10.17	50	-	9.15	1846.0	126.11	-21.5	1.02
9.15	10	-	8.06	1381.3	269.52	-19.9	0.81
8.06	8	-	7.15	720.2	101.84	-18.7	0.95
7.15	28	-	6.08	783.1	55.58	-15.5	0.46
6.08	20	-	4.92	1092.7	165.42	-6.6	0.56

Figura 23. Resultados del experimento de la celda potenciométrica con nanopartículas de TiO₂ (100 mg/L) junto con BSA (100 mg/L) a una fuerza iónica 0.1M. Todo ello en un rango de pH comprendido entre 5 y 10.

Los resultados muestran unos diámetros hidrodinámicos muy superiores a los caracterizados previamente en el caso del TiO₂ en estas condiciones (en torno a 200 nm), con unos valores que alcanzan el mínimo a pH 7 con 720 nm, y el máximo en torno a pH 9 (1850 nm). En todos los casos parece haber agregación, si bien hay grandes diferencias en el grado en que se produce. Se observan dos tendencias principales, una desde pH 5 hasta 7, y otra desde 7 hasta pH 10. En el primero la tendencia es una disminución de los tamaños, mientras que tras superar la situación de pH neutro el aumento es más abrupto conforme las condiciones se vuelven más básicas. En el caso de los potenciales zeta se muestra una tendencia mucho más clara y uniforme. Conforme aumenta el pH del medio aumenta la carga superficial de las nanopartículas en interacción con la BSA. El mínimo se encuentra a pH 5 con un valor de -6.6 mV, mientras que el máximo se presenta en la condición más básica con -21.6 mV. En los puntos más ácidos el salto de potencial zeta es mucho más marcado, mientras que conforme se acerca a los pH más básicos estas variaciones se suavizan.



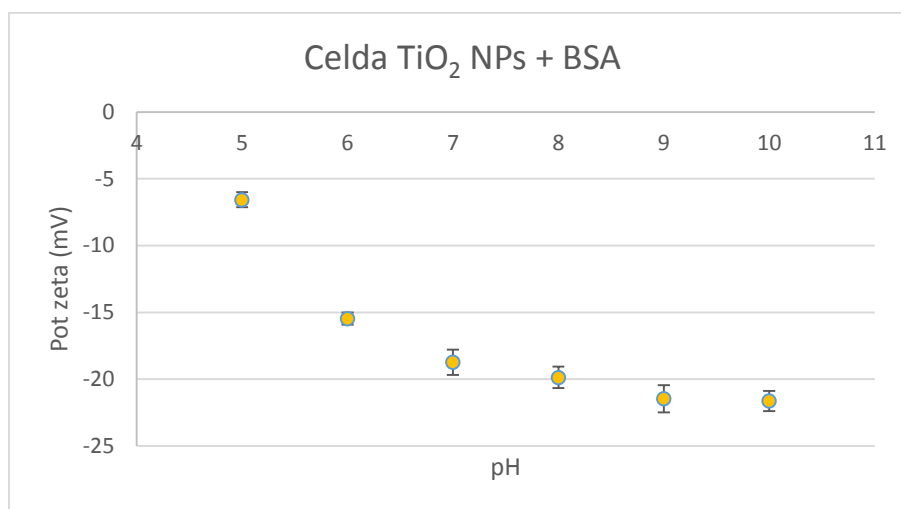


Figura 24. Representaciones de los resultados de la celda potenciométrica con TiO_2 NPs + BSA, en función del pH para diámetros hidrodinámicos y potenciales zeta.

De acuerdo con la caracterización realizada para las nanopartículas de TiO_2 , éstas presentan por sí mismas una carga superficial negativa. Conforme a los resultados de Hu et al (2010) el comportamiento de este tipo de nanopartículas es un descenso constante en el potencial zeta conforme aumenta la basicidad del medio. Además, de acuerdo con Sasidharan et al (2013), la BSA presenta un comportamiento similar (figura 22), solo que menos marcado. De modo que es de esperar que conforme interactúen estos dos componentes en el medio se adquiriera una carga más negativa, aumentado en valor absoluto si las condiciones son más básicas (figura 24).

En cambio, la tendencia de los tamaños de partícula no muestra correspondencia con los resultados de otros trabajos. De acuerdo con las caracterizaciones de Loosli & Stoll (2012) y de Berg et al (2009), los tamaños de partícula, y por tanto su comportamiento respecto a fenómenos de agregación, responde a las variaciones de su carga superficial. Estas cargas están definidas por el pH del entorno donde se encuentren, mostrando los principales picos de agregación en el punto isoelectrico. Si solo está presente la nanopartícula de TiO_2 , la caracterización de ambos trabajos sitúa que el punto isoelectrico se encuentra en torno a pH 6. En esta zona se puede observar (figura 25) que los diámetros de partícula son los más acentuados, debido a que la nanopartícula no tiene una repulsión electrostática que actúa como barrera para evitar fenómenos de agregación. Si esta barrera no existe o es muy baja, la frecuencia de colisiones que determinan las dispersiones coloidales puede provocar un gran aumento en la agregación de partícula que se corresponden con los picos de las gráficas. Las regiones de pH más ácidas o básicas a esta zona no presentan agregación puesto que la partícula está cargada o bien positivamente en el caso de condiciones ácidas, o bien negativamente en condiciones básicas, de modo que la repulsión electrostática evita el aumento de los agregados. Si se le añade a la nanopartícula una cantidad de BSA se produce una reducción de la carga superficial de las TiO_2 NPs, al estar cargada la BSA más o menos negativamente en su interacción al formar recubrimientos superficiales. Esto puede provocar un desplazamiento en las gráficas de los anteriores autores, presentando el punto isoelectrico más desplazado hacia la izquierda. Es decir, si una partícula tienen una carga neta nula, al adsorberse sobre su superficie la BSA ésta produce un aumento de la carga negativa del conjunto, por lo que impide que en ese pH se agreguen. De manera similar, en condiciones más ácidas, cuando la nanopartícula de por sí presenta una carga positiva no presenta síntomas de agregación por repulsiones de cargas superficiales. No obstante al formarse las coronas, su carga se reduce pudiendo quedar anulada

al ser negativa la de la BSA. En tal caso se produciría un pico de agregación en dicha zona. Esta explicación concuerda con los resultados de la celda potenciométrica en el primer rango de pH que comprende de 4 a 7. No obstante, la tendencia continúa hacia unos potenciales más negativos conforme aumenta la alcalinidad del medio, y por tanto los tamaños de partícula deberían permanecer estables en unos diámetros bajos. Esto no ocurre sino que aumenta de forma constante.

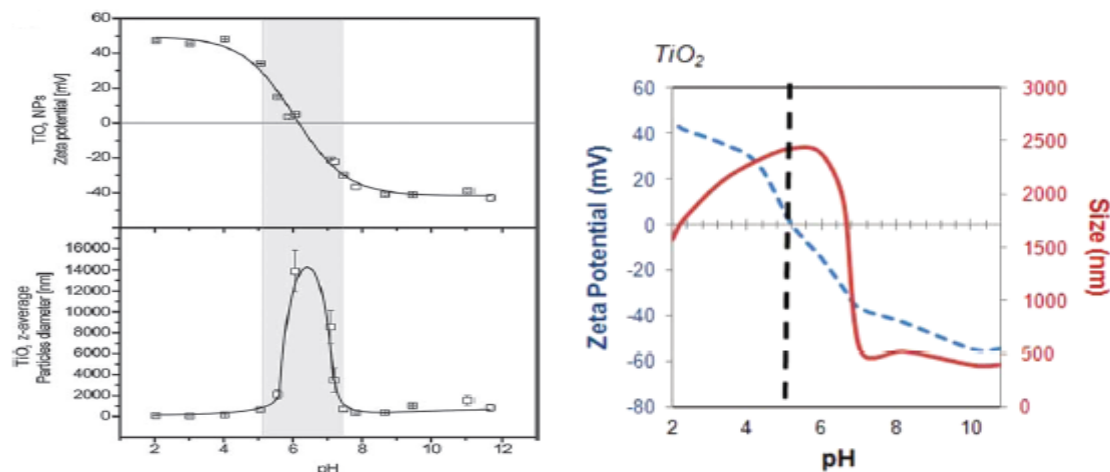


Figura 25. Representaciones de la variación de tamaños y potenciales zeta de TiO₂ NPs en función del pH en dos estudios distintos. A la izda. Loosli & Stoll (2012); a la dcha. Berg et al (2009).

La explicación para este comportamiento podría ser la ofrecida por Sasidharan et al (2013), para quienes pese a que los potenciales son muy negativos, el pH tiene una influencia sobre los procesos de adsorción de la BSA con las nanopartículas. Conforme las condiciones son más básicas las cantidades adsorbidas de BSA sobre la superficie de ZnO NPs disminuye hasta alcanzar sus niveles mínimos. Es debido a que las cargas superficiales ofrecen sus niveles más negativos tanto para la BSA como para las nanopartículas, que impide una correcta interacción entre ambas, traduciéndose en que no se producen coronas proteicas. Esto mismo podría ocurrir en el caso de las TiO₂ NPs, afectando en el proceso de agregación por el hecho de que la interacción de BSA con las nanopartículas se ve afectada, y por tanto su estabilidad también ofreciendo unos resultados de diámetros mucho mayores. Esta influencia del pH en la interacción de las nanopartículas con la MO se profundizará en el apartado correspondiente a las isotermas de adsorción, donde se podrá comprobar esta relación de descenso conforme aumenta la basicidad.

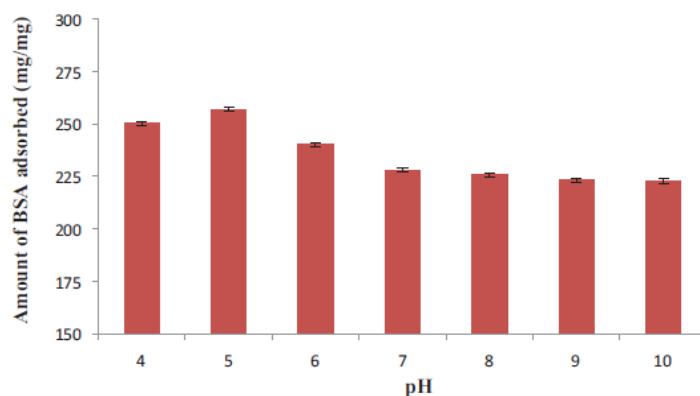


Figura 26. Representación de las cantidades de BSA adsorbidas sobre la superficie de ZnO NPs y su relación respecto al pH (Sasidharan et al, 2013).

3. Cinéticas de agregación

El estudio de las cinéticas consiste en el análisis de los procesos de interacción entre nanopartículas y materia orgánica en función del tiempo. Sirven para la comparación entre diferentes resultados para ver cómo influyen factores específicos en la interacción entre componentes y si se han producido fenómenos de agregación. En caso de que se produzcan, los diferentes estudios en que se subdivide esta experimentación permiten esclarecer la relevancia que pueden tener el tipo de medio en el que se encuentra la solución, los reactivos empleados y su orden, el pH o la concentración de nanopartículas. A lo largo de las distintas cinéticas realizadas se han empleado unos mismos reactivos, que pueden variar únicamente en su orden de utilización o su concentración. Estos reactivos son las nanopartículas de TiO_2 como sistema coloidal, BSA o HA como materia orgánica con la que interactuar y NaNO_3 1M para aportar al sistema una determinada fuerza iónica. Para el ajuste de pH a unos determinados valores, se han empleado stocks tanto de HNO_3 como de NaOH 0.1M.

La duración de la recogida de datos de los tamaños suele ser de una hora, donde ya se puede apreciar si hay agregación para unas determinadas condiciones o si se ha estabilizado en un tamaño determinado. La toma de datos comprende valores desde que se añade la nanopartícula en el medio con carácter inmediato, puesto que unos segundos de diferencia pueden suponer la agregación de las mismas, sin poder apreciar parte de la evolución de los diámetros hidrodinámicos desde los tamaños primarios. El equipo Zetasizer es programado para que la toma de datos sea de una medida por minuto.

- Estudio según el medio de trabajo

Inicialmente se comparan los dos medios de trabajo más empleados a lo largo de las experimentaciones, no solo para la caracterización de las nanopartículas que en él se encuentran sino también para otros procesos como las celdas de potenciometría o las isothermas de adsorción. El medio de caracterización corresponde con las nanopartículas de TiO_2 en agua MilliQ en una concentración de 1 g/L, sin ningún tipo de aporte para dotarla de fuerza iónica. El segundo contiene, además de las NPs, BSA (100 mg/L) y una fuerza iónica 0.1M; representante del más característico de los medios empleados para estudiar la interacción NP-materia orgánica.

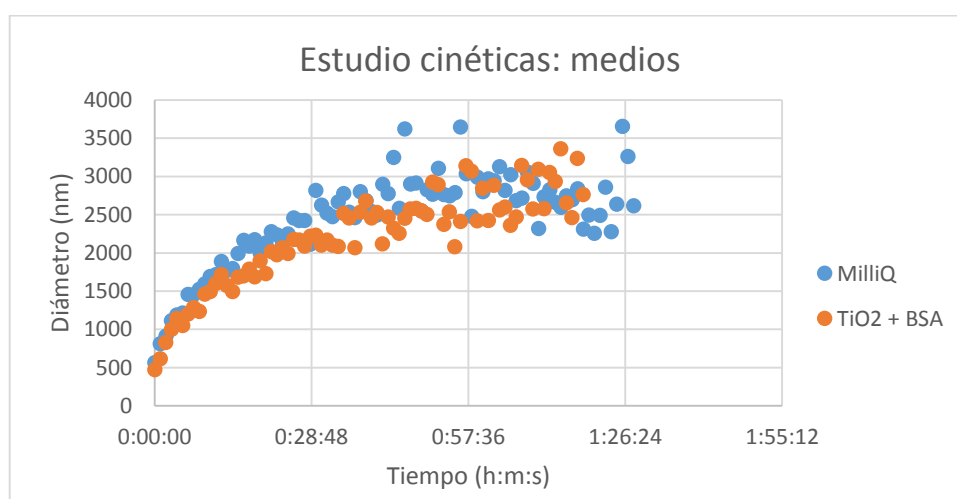


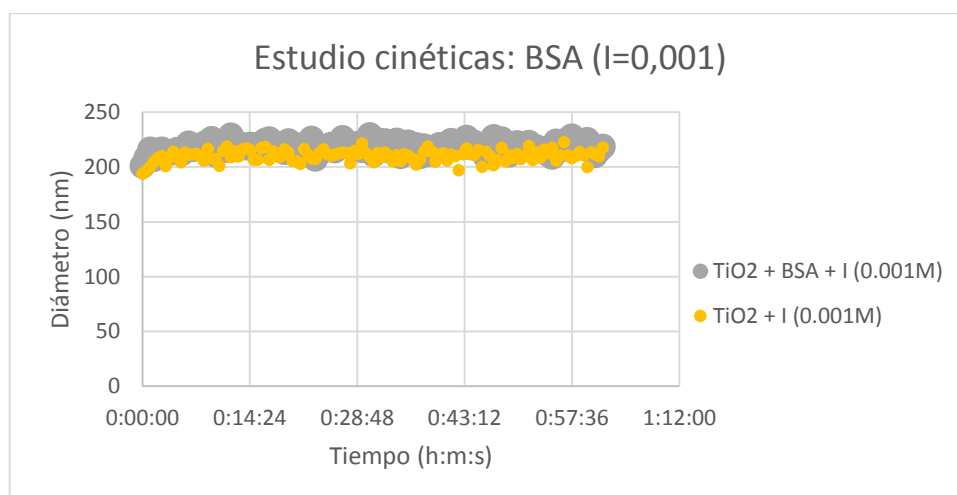
Figura 27. Comparación de las cinéticas en dos medios diferentes de trabajo. Uno con la NP en agua MilliQ sin fuerza iónica. El segundo con BSA en interacción con las NPs a una fuerza iónica de 0.1M.

En la figura 27 se muestra como se produce una evolución desde los tamaños primarios obtenidos, en torno a 500 nm, hasta unos estados de agregación bastante avanzados. En ambos casos la tendencia exponencial es evidente, con unos tamaños finales registrados con unos diámetros en torno a 3000 nm. La duración de la cinética alcanza en este caso la hora y media, hasta que se estabilizan los resultados obtenidos por el equipo. El tamaño inicial es tan grande en las primeras medidas respecto a los medidos en las caracterizaciones iniciales porque los sistemas son poco estables, tendiendo rápidamente a la agregación. Por ello se hace énfasis en la medición inmediata de las muestras una vez son preparadas.

En el caso de la muestra en agua MilliQ parece mostrar una tendencia a la formación de agregados de mayor tamaño durante los primeros 45 minutos de medida, aunque finalmente en ambos los tamaños sean similares. Sí que parece que la BSA puede afectar en una disminución muy ligera de los agregados por su interacción con las nanopartículas al producirse su adsorción superficial, aunque no obstante no es suficiente para evitar la agregación final de las mismas. Ello puede estar ocasionado por la fuerza iónica del medio, de 0.1M, que es una cantidad a considerar respecto a casos posteriores de estudio, y que puede producir un apantallamiento de las cargas de tal manera que no se produzcan repulsiones electrostáticas entre partículas o coronas formadas, impidiendo así su estabilidad en el medio. De cualquier forma, la concentración de TiO_2 es de 1g/L, lo cual hace pensar que puede ser una cantidad muy grande frente a la concentración de BSA (100 mg/L). Al haber poca cantidad de MO respecto de la nanopartícula, resulta difícil poder ver una capacidad de la BSA para estabilizar las nanopartículas al haber mucha superficie específica libre de éstas. Para solucionarlo, en posteriores cinéticas se rebaja la concentración de NPs hasta 100 mg/L, unas cantidades acordes a las empleadas en otros experimentos.

- Estudio según la presencia de BSA

Siguiendo con las condiciones acordadas, se realizan diversas cinéticas en función de la presencia o no de BSA en el medio. Las concentraciones empleadas son de 100 mg/L tanto para las nanopartículas de TiO_2 como para la BSA, para poder observar una relación de interacción entre ambos reactivos mucho más equilibrada. En ambos casos se analizan dos escenarios distintos, aplicando una mayor o menor fuerza iónica al sistema (0.1 o 0.001M) y así añadir este factor como posible agente influyente en fenómenos de agregación.



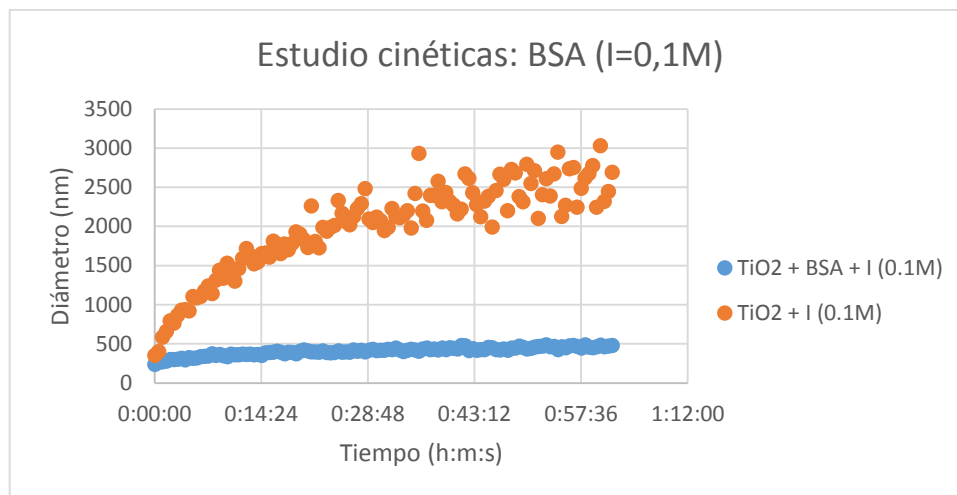


Figura 28. Comparación de cinéticas en función de si hay presencia o no de BSA en la solución. En la gráfica de arriba la fuerza iónica es de 0.001M, mientras que en la de abajo es de 0.1M.

En estos casos de estudio, la primera incidencia es la de que los tamaños de partícula primarios conseguidos son mucho menores (en torno a 200 nm) que en el caso del estudio de los medios (500 nm). El cambio de concentración de las nanopartículas de 1 g/L a 100 mg/L parece que provoca que las dispersiones coloidales sean en principio más estables, aunque eso no impide que pueda producirse agregación a lo largo del tiempo. Para el caso de la fuerza iónica 0.001M, ambas cinéticas son prácticamente similares, sin producirse un aumento en los diámetros hidrodinámicos registrados, que en ningún momento sobrepasan los 250 nm. Representan, por tanto, sistemas perfectamente estabilizados en los que no se ha producido ningún fenómeno de agregación, sin importar la presencia o ausencia de BSA que interactúe con la nanopartícula. Este fenómeno es debido a que la fuerza iónica es tan baja que las propias cargas superficiales (negativas) provoca una repulsión que actúa de barrera e impide la agregación de las mismas.

Cuando la fuerza iónica aumenta hasta un valor de 0.1M, sí que se observan variaciones entre el caso que contiene la BSA y el que no. Cuando no hay presencia de BSA, se observa una tendencia de agregación exponencial a lo largo del tiempo, llegando hasta unos tamaños de agregación de 3000 nm como máximo. Comparándolo con el caso de estudio de los medios de trabajo, donde la situación era similar pero con una concentración mayor de TiO_2 NPs, el comportamiento es el mismo, pero sin producirse unos agregados de tal tamaño. Si se emplea BSA en estas condiciones la tendencia cambia drásticamente. Se produce un aumento de los tamaños de agregados hasta unos valores cercanos a 500 nm, aunque nunca se observan unos tamaños como cuando no hay BSA. A pesar de que se produce ese aumento desde los tamaños primarios (250 nm), el sistema se ha estabilizado al interactuar la BSA con las nanopartículas, formando las coronas a su alrededor y modificando su carga neta superficial hacia estados donde todavía hay repulsión entre partículas, por lo que no se agregan de forma ostensible. De forma similar se muestran los resultados de Sasidharan et al (2013), en el cual emplean BSA en diferentes concentraciones para comprobar que los tamaños de agregados de ZnO NPs disminuyen constantemente conforme aumenta la concentración de proteína en el medio. Comparando ambos casos en los que hay BSA a diferentes fuerzas iónicas, ya se percibe que la cantidad de electrolito afecta a la inhibición de las cargas y, por tanto, a la desestabilización para forzar la agregación.

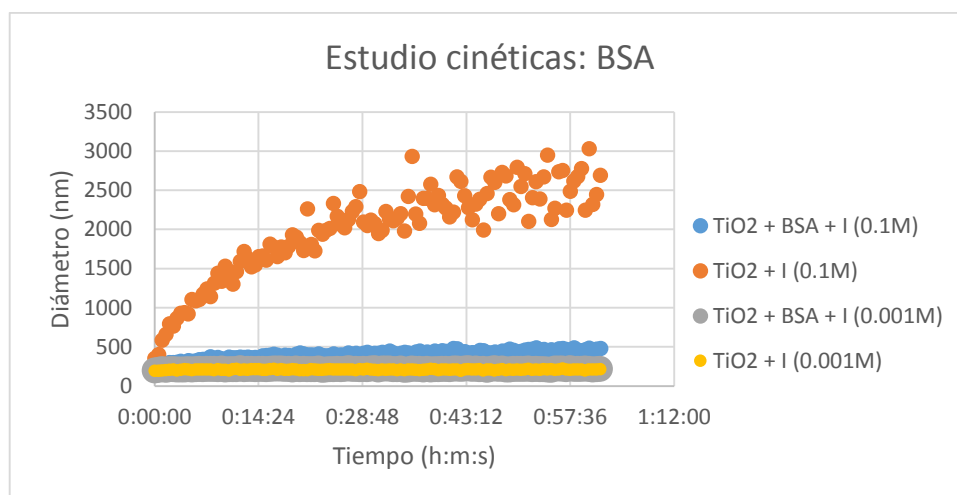


Figura 29. Conjunto de cinéticas para estudio de relevancia de la presencia de BSA en la estabilización de nanopartículas de TiO_2 en función de dos valores de fuerza iónica, 0.1 y 0.001M.

Otro trabajo que emplea materia orgánica para estudiar la estabilidad de colides es el de Han et al (2014). En este caso emplean HA en unas determinadas concentraciones en interacción con nanopartículas de ZnO , mostrando sus resultados en función de factores de sedimentación, los cuales también indican si hay situación de estabilidad. En ellos se observa que conforme aumenta la concentración de ácido húmico los fenómenos de sedimentación disminuyen hasta alcanzar una constante en sus valores. Hu et al (2010) también demuestran esta tendencia en sus resultados en función de la cantidad de HA que interactúa con nanopartículas de magnetita. Bian et al (2011) muestran la relación entre sus coeficientes de sedimentación en el tiempo para nanopartículas de ZnO al añadir concentraciones de HA con las variaciones en el potencial zeta del sistema, acompañándolo además de unos cálculos de interacciones energéticas para explicar la situación de estabilidad de acuerdo con la teoría DLVO (figura 30).

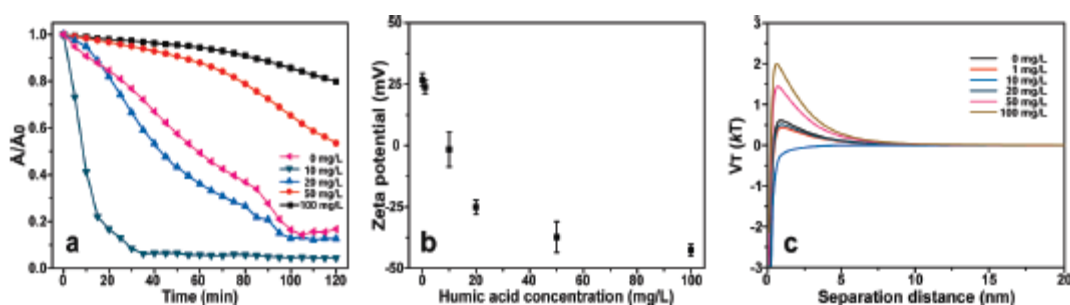


Figura 30. a) Sedimentación de nanopartículas de ZnO en función del tiempo para distintas concentraciones de HA, a pH constante y a una fuerza iónica 0.02M (NaCl). b) Medidas de los potenciales zeta en función de la concentración de húmico en el medio. c) Cálculos de interacciones de acuerdo con la teoría DLVO para explicar las variaciones energéticas en función de las concentraciones de HA (Bian et al, 2011).

- Estudio según la fuerza iónica

Lo que comenzaba a vislumbrarse en el estudio de la presencia de BSA sobre la relevancia de la fuerza iónica, se vuelve a mostrar con la comparación de cinéticas para casos con fuerzas iónicas diferentes. Bajo las mismas condiciones que casos anteriores, con concentraciones de TiO_2 de 100 mg/L pero sin BSA, se analizan cuatro tipos de escenarios: con fuerza iónica 0.1, 0.05, 0.01 y 0.001M.

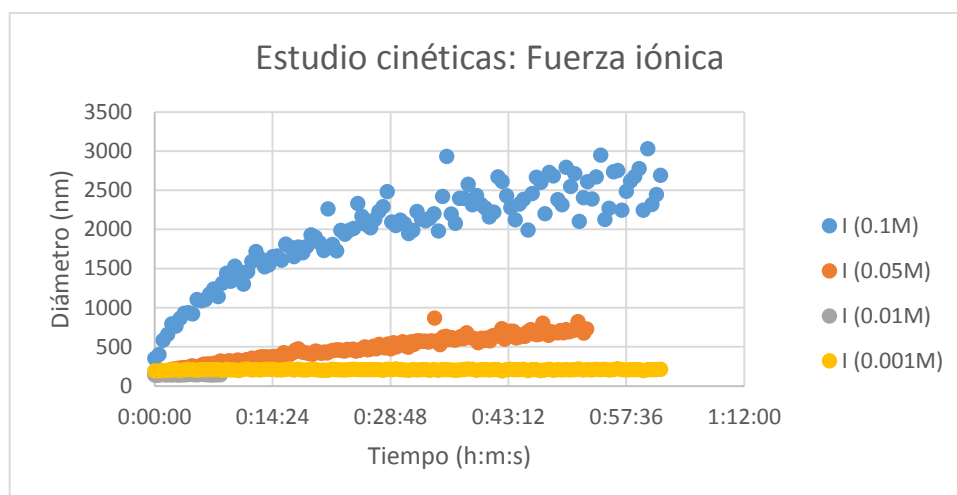


Figura 31. Conjunto de representación de cinéticas de agregación para estudiar la relevancia de la fuerza iónica en los procesos de agregación. Cuatro casos de estudio: 0.1, 0.05, 0.01 y 0.001M.

Se observa una clara relación entre el tamaño de los agregados en función del tiempo respecto de la fuerza iónica del medio. Cuanto más aumenta la concentración de electrolito (NaNO_3) las tendencias de agregación son cada vez mayores. Entre los dos casos de menor fuerza iónica, de 0.001 y 0.01M, no hay prácticamente diferencia puesto que mantienen al final de la cinética considerada los mismos tamaños que los registrados inicialmente, siempre en torno a 250 nm. Si se aumenta la fuerza a 0.05M se observa un incremento en los agregados hasta unas cifras de 800 nm de diámetro. Ya en la situación de máxima fuerza iónica considerada, 0.1M, los agregados vuelven a formarse con unos tamaños finales cercanos a 3000 nm.

La influencia de la fuerza iónica está representada por el efecto de apantallamiento que produce en las cargas superficiales de las nanopartículas, reduciendo las barreras energéticas que inhiben la agregación de los sistemas coloidales, produciéndose fenómenos de asociación como la floculación o la coagulación. Según parece en los resultados en los que se empleaba la BSA (figura 29), este factor tiene una mayor influencia que la presencia de materia orgánica, puesto que para los casos de mayor concentración de electrolito, se fomentaban los procesos de agregación hubiera o no interacción con materia orgánica presente. Jiang et al (2010) muestra gráficamente la variación del potencial zeta de las nanopartículas de ZnO en función de la fuerza iónica, observándose que es la variación de las cargas por los apantallamientos los que reducen la estabilidad de los coloides. Han et al (2014) y Hu et al (2010) muestran estas mismas conclusiones de sus estudios en función de la fuerza iónica que apliquen para nanopartículas de ZnO y magnetita, respectivamente.

- Estudio según el orden de los reactivos

Otro factor que puede ser determinante en los fenómenos de agregación entre nanopartículas es el orden en que los reactivos interactúan con la nanopartícula. Los tres casos considerados se diferencian en la forma de preparación de la muestra, y se corresponden con: primer caso, añadiendo a la nanopartícula la BSA y el electrolito a la vez; segundo caso, añadiendo solo fuerza iónica a la nanopartícula sin añadir MO, de modo que se compruebe su efecto sin haber formación de coronas; y por último, añadiendo primero la BSA con la nanopartícula, dejando un tiempo de interacción (1-2 minutos) y añadiendo posteriormente el electrolito. Todo ello en unas condiciones para el medio preparado con BSA y TiO_2 NPs en una concentración de 100 mg/L y una fuerza iónica 0.1M.

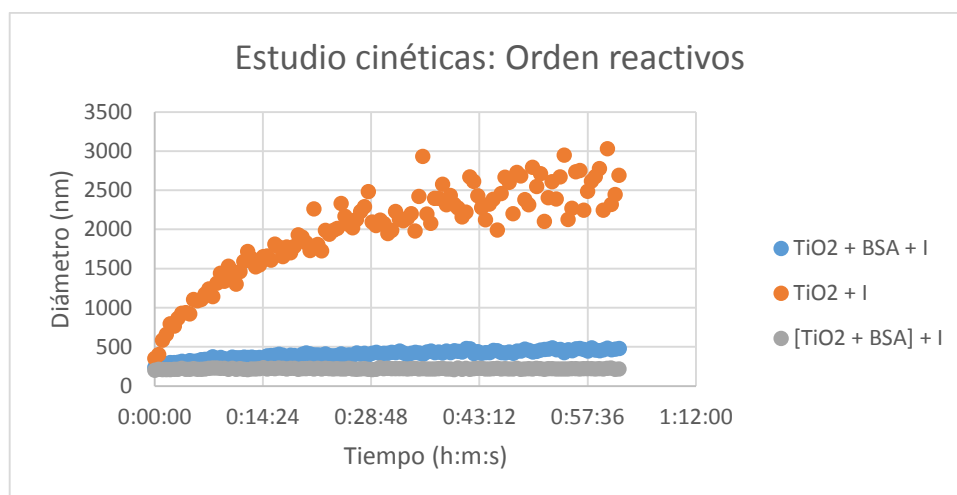


Figura 32. Estudio de cinéticas de agregación en función del orden seguido de los reactivos. Los tres factores a considerar son las TiO₂ NPs (100 mg/L), la BSA (100 mg/L) y la fuerza iónica (0.1M).

Según se muestran en la figura 31, los datos en naranja representan cuando no se ha añadido BSA, el caso azul cuando los tres reactivos se han añadido simultáneamente, y en gris cuando primero se ha añadido las nanopartículas con la BSA y posteriormente se ha añadido la fuerza iónica correspondiente. Los resultados muestran que si no hay materia orgánica en la muestra, se produce una agregación en las nanopartículas, hasta unos tamaños de 3000 nm al cabo de una hora. Si se añade BSA, pero a su vez con el electrolito, se produce una reducción de la agregación, que no llega a constituir una estabilización del sistema coloidal, pero que reduce bastante los tamaños de los agregados respecto a si no hubiera BSA. No obstante, si se añade a la solución con coloides la BSA y se deja un breve periodo de interacción (1 o 2 minutos) se observa que aunque se añada posteriormente una fuerza iónica considerable (0.1M), donde en casos anteriores siempre ha mostrado agregación, se produce una estabilización de los tamaños de forma constante en toda la cinética de 1 hora de duración.

Esto indica que no solo las concentraciones de los reactivos son importantes para estudiar el comportamiento que puede tener un sistema de nanopartículas en un medio, sino que las jerarquizaciones en su orden de interacción también pueden determinar su destino. Si hay un tiempo de interacción entre nanopartícula y materia orgánica, se producen las adsorciones superficiales que forman las coronas proteicas. Éstas, una vez constituidas, pese a la fuerza iónica del medio, que puede ser bastante grande como el caso 0.1M, mostrará un sistema coloidalmente estable que no sufrirá fenómenos de agregación. Por tanto, una vez formadas el apantallamiento de las cargas puede afectar a su carga superficial, pero no es indicativo de la formación de agregados, puesto que la corona actúa de tal forma que impide sus asociaciones. A su vez, estos resultados indican que el principal obstáculo para la interacción entre nanopartícula y materia orgánica es la fuerza iónica del medio, puesto que si es lo suficientemente grande tienen un tiempo de actuación más rápido que el de la propia proteína, por ello una vez comience a el proceso de agregación entre partículas, se dificulta la formación de coronas por reducción de los centros activos libres para su adsorción. Jiang et al (2010) ya mostraban esta jerarquización en sus resultados (ver figura 33), donde empleaban ZnO NPs para estudiar las eficiencias de sedimentación en función de la fuerza iónica aplicada, distinguiendo los casos en los que utilizaba recubrimientos con HA de los que no. En ellos se ve como el recubrimiento de materia orgánica provoca unas disminuciones en la sedimentación, aunque no puede evitar el aumento de este fenómeno con el incremento de la concentración de electrolito.

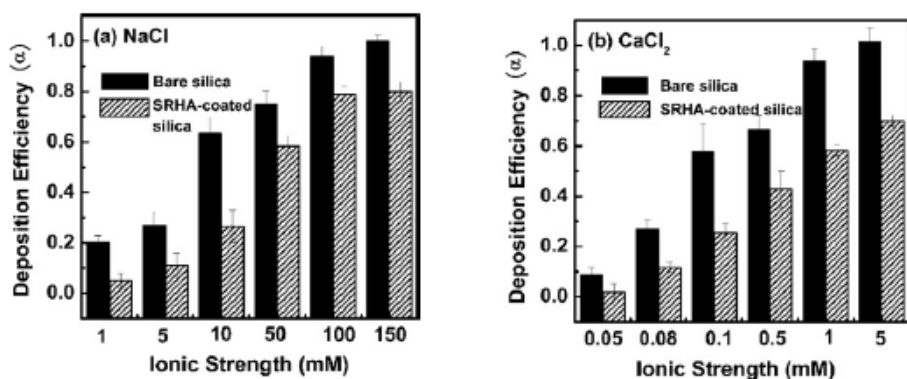


Figura 33. Eficiencias de sedimentación de ZnO NPs, con o sin recubrimientos de HA en dos medios de NaCl y de CaCl_2 , ajustados a pH 7.8. Representaciones en función de unos niveles crecientes de fuerza iónica (Jiang e al, 2010).

- Estudio según el pH

Para analizar la influencia que puede tener el pH en los procesos de agregación de los sistemas coloidales con nanopartículas de dióxido de titanio, se comparan las cinéticas realizadas a tres niveles de pH: 4, 7 y 10. Además, para cada pH considerado se han realizado dos cinéticas en función de la fuerza iónica, 0.1 y 0.001M. En este caso las muestras contienen TiO_2 (100 mg/L) pero no con BSA sino con HA (100 mg/L).

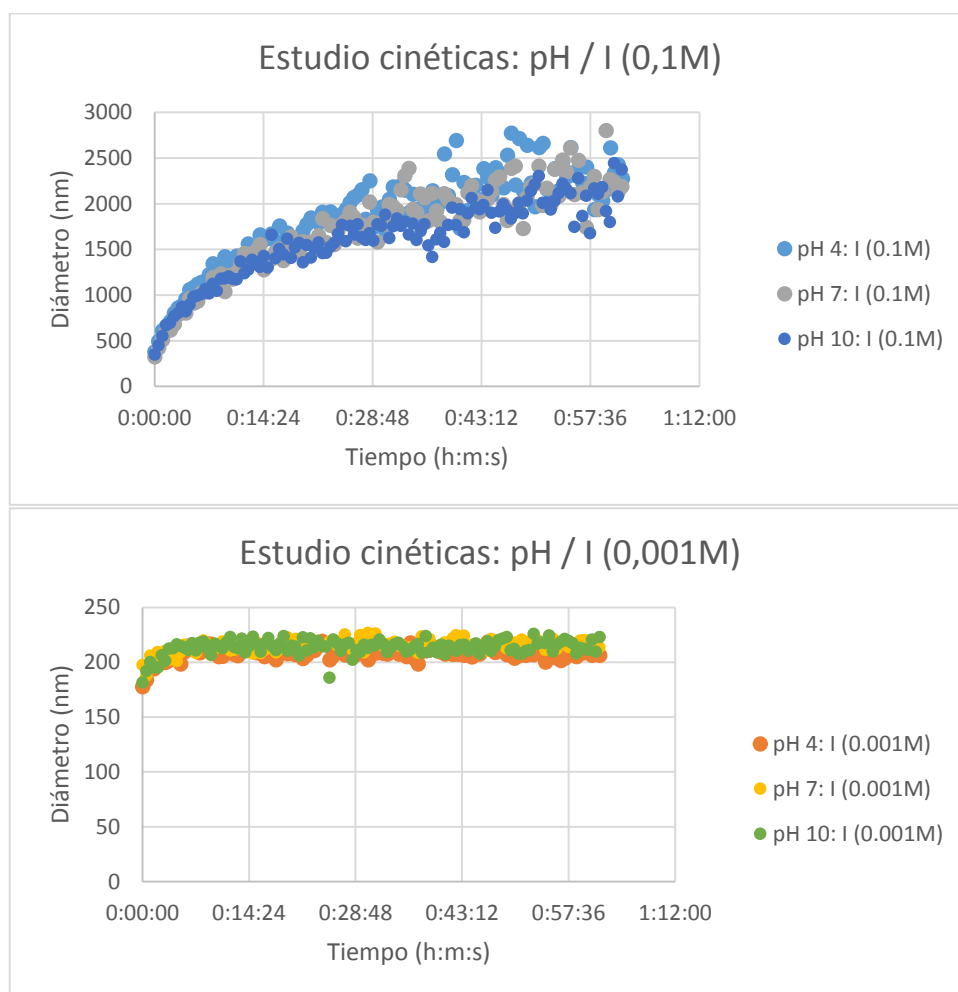
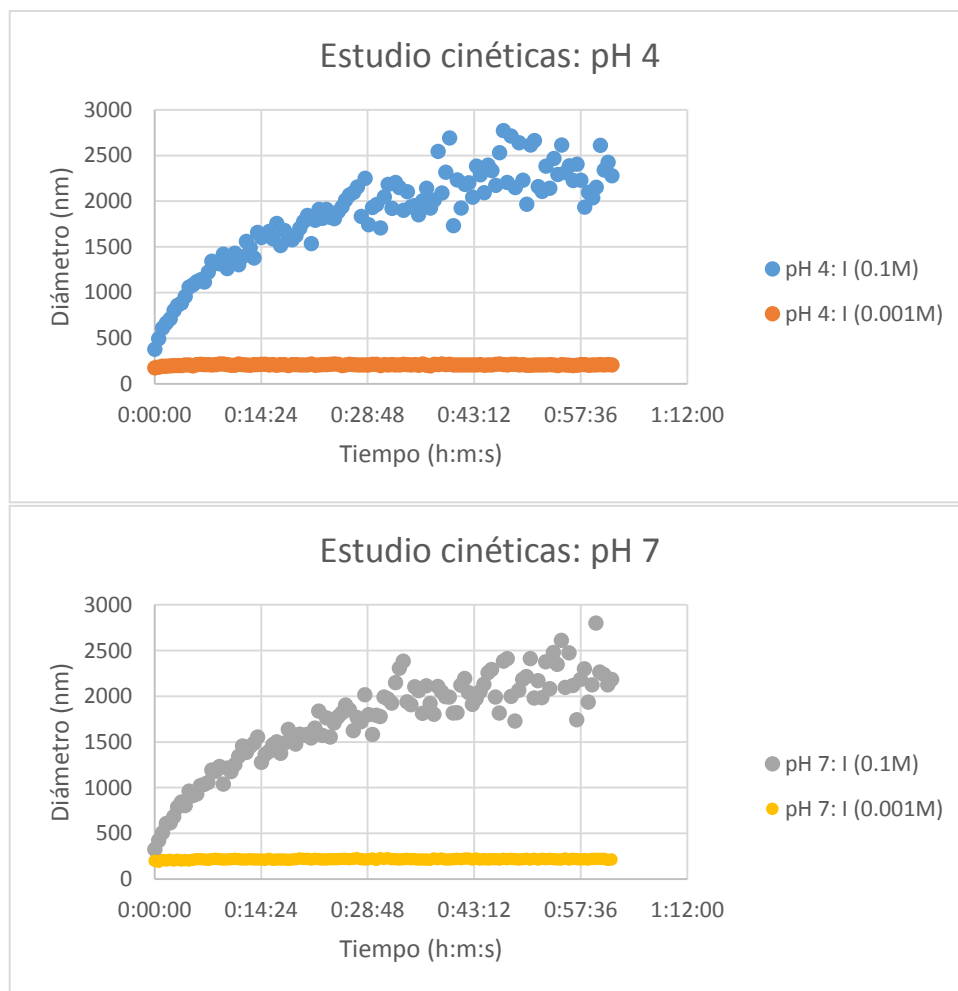


Figura 34. Comparativa de cinéticas en función del pH del medio para dos casos: arriba, a una fuerza iónica 0.1M, abajo, 0.001M. Todo ello para las muestras con TiO_2 NPs (100 mg/L) con HA (100 mg/L).

Si se observan las gráficas de las cinéticas en función de los dos tipos de fuerzas iónicas, se observa que no hay una diferencia en los resultados del tamaño de agregados entre los diferentes pH's. En el caso de que la fuerza sea 0.1M se produce siempre una desestabilidad en el sistema coloidal que provoca la inhibición de las repulsiones entre sí por cargas, sin importar el pH, llegando a producirse agregados en torno a 2500 nm al cabo de una hora de cinética. Al contrario ocurre para los resultados con una fuerza iónica de 0.001M, donde no se producen fenómenos de agregación en los tres niveles de pH. Si los tamaños primarios registrados son algo inferiores a 200 nm, se mantienen estables a partir de los 10 primeros minutos, donde se han incrementado hasta unos valores de 220 nm, a partir de los cuales se mantendrán constantes. En ambos casos no se observa que el pH influya en la agregación de las nanopartículas, sino que es la fuerza iónica quien se muestra como agente decisivo para establecer las condiciones de estabilidad en los coloides. Este comportamiento se observa en las cinéticas para cada pH, mostrado en la figura 35.



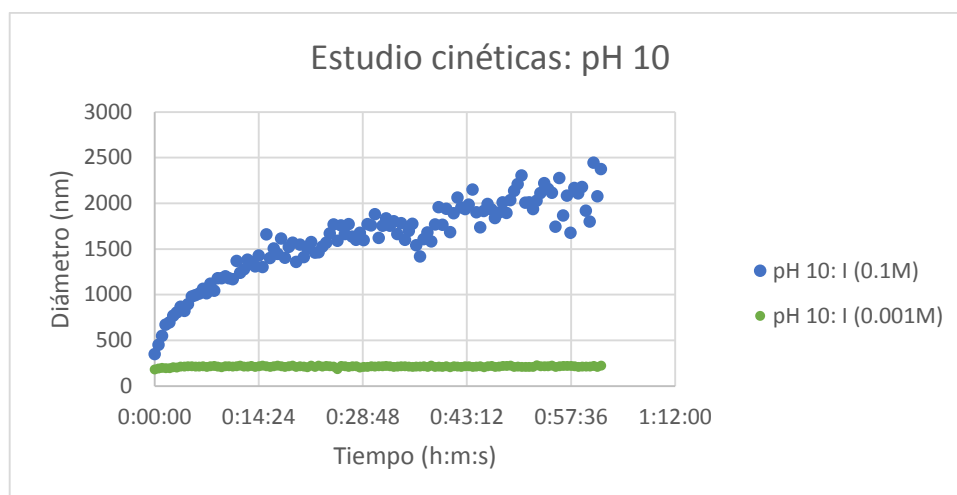


Figura 35. Comparación de cinéticas para cada uno de los pH's de estudio, en función de la fuerza iónica del medio.

- Estudio según la concentración de TiO₂ NPs

Al igual que en el caso anterior, se emplea HA en lugar de BSA para el estudio de las cinéticas, en una concentración de 100 mg/L. La fuerza iónica aplicada en todas las muestras es de 0.1M, siendo la variable en este caso el pH y la concentración de nanopartículas empleada. Los pH's considerados son 4 y 7, y las concentraciones de NPs son de 50 y 100 mg/L. Como se observa en las primeras caracterizaciones de las cinéticas de los diferentes medios de trabajo, también se empleó una concentración de 1 g/L, aunque en este caso se descarta porque en los resultados ya se registró una completa agregación de las nanopartículas para los dos casos.

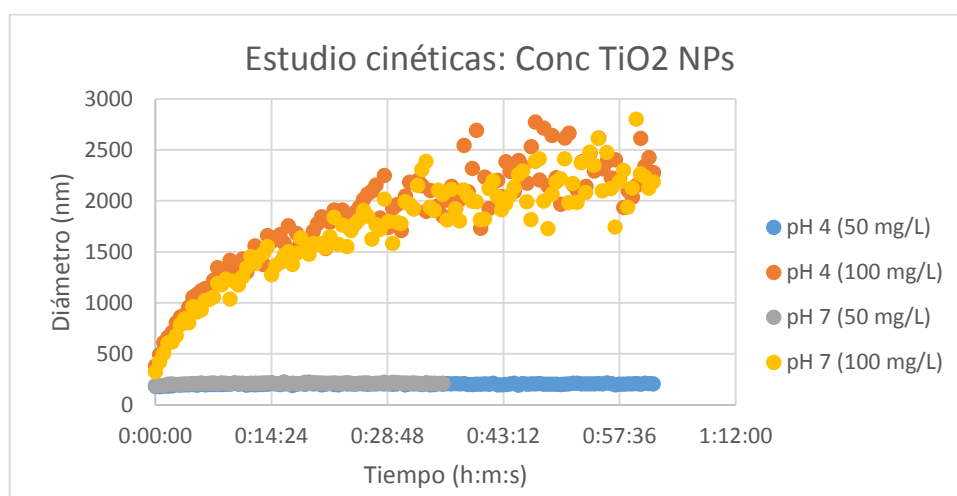


Figura 36. Comparación de cinéticas en función de la concentración de TiO₂ NPs para pH 4 y 7.

Los resultados muestran de nuevo algo similar que en el estudio del pH, donde no había diferencias debidas al propio pH, sino que se deben más a la concentración en la que se encuentran las nanopartículas en la muestra. El caso de la cinética a pH 7 con una concentración de 50 mg/L se concluyó a los 35 minutos puesto que se observó que no había agregación y los tamaños registrados para las partículas permanecían constantes. La tendencia es exactamente similar para las cinéticas con la misma concentración, siendo una situación de estabilidad cuando la concentración es menor, mientras que se produce agregación cuando aumenta la concentración.

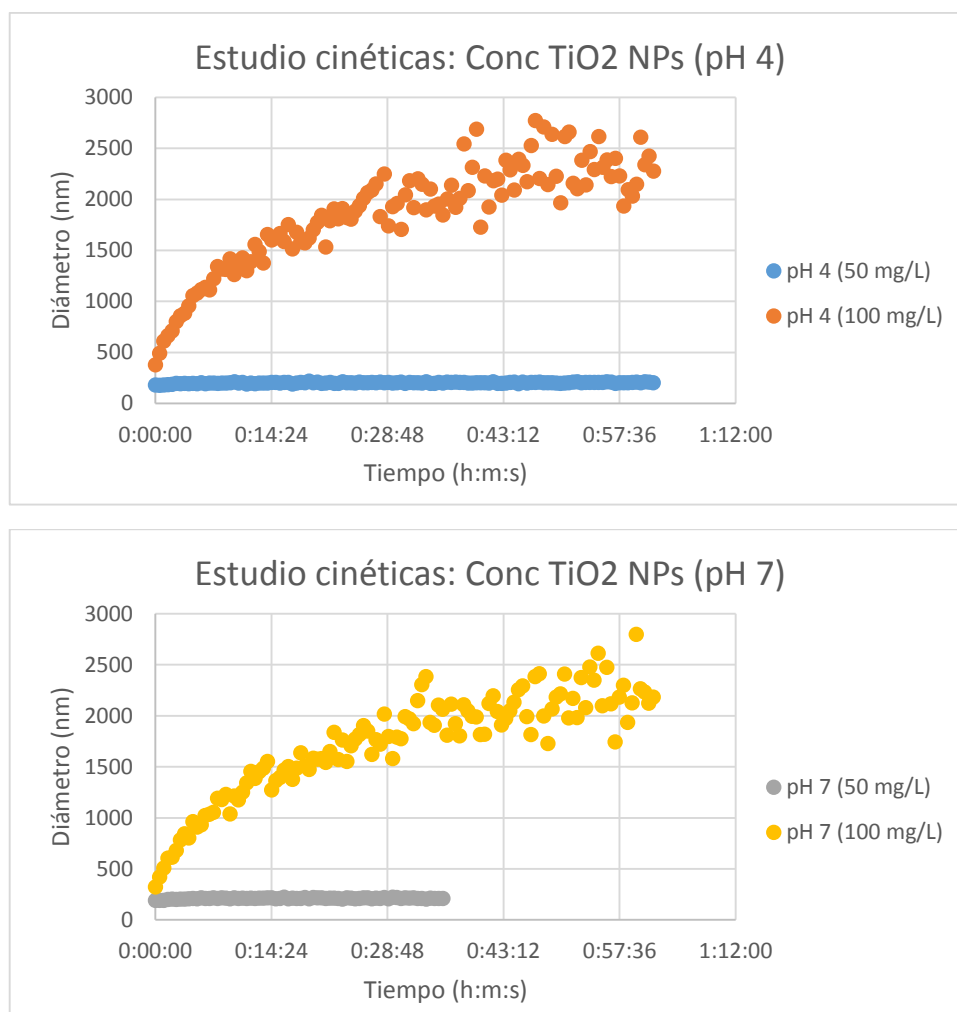


Figura 37. Estudio de cinéticas en función de la concentración de TiO₂ NPs para dos casos: arriba, para pH 4; abajo para pH 7.

La explicación para este comportamiento es similar a la que se empleó cuando se obtuvieron los datos de la cinética con una concentración de nanopartículas de 1g/L. Cuando aumenta la concentración, la superficie específica libre para la adsorción del HA es mucho mayor. Dado que el factor limitante en este caso parece ser la cantidad de HA en el medio, con una mayor concentración todavía queda mucha superficie libre para poder tener lugar la agregación entre partículas. En caso de que la concentración sea menor, 50 mg/L, parece que la proporción de superficie respecto a HA está más equilibrada, por lo que no quedan centros activos libres que es donde se puede dar la interacción con otras nanopartículas, resultando en una situación de estabilidad donde los tamaños de los agregados se mantienen constantes respecto a los tamaños primarios. Sasidharan et al (2013) muestran esta relación con la estabilidad de los tamaños de nanopartículas de ZnO en función de la concentración de BSA en el medio. En este caso, el aumento de las concentraciones de nanopartículas es como una disminución de la cantidad de BSA al disminuir la relación de concentraciones NP-BSA.

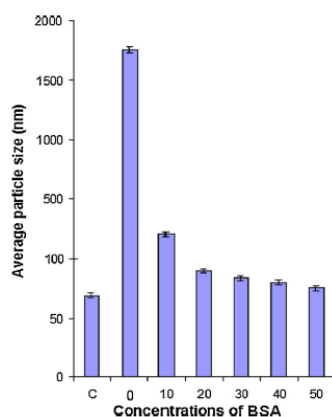


Figura 38. Relación de tamaños de nanopartícula (ZnO) en función de la concentración de BSA en el medio (mg/L), medidos tras cuatro horas de interacción (Sasidharan et al, 2013).

4. Isotermas de adsorción

El objetivo es el estudio de la adsorción de materia orgánica en la superficie de las nanopartículas a una temperatura constante de 25°C. Las isotermas representan la cantidad de soluto que queda ligado en la superficie del sólido coloidal formando un recubrimiento (coronas) frente a su concentración total en la fase acuosa. Para conseguir que se formen tales recubrimientos es necesario un tiempo de interacción entre ambos compuestos, que será de 48 horas en incubadora (Labnet 211DS) en agitación orbital. Cada muestra preparada tiene unas condiciones únicas, puesto que pese a que las concentraciones de nanopartículas son constantes, otros factores como la concentración de MO, la fuerza iónica del medio en que se encuentran o el pH son variables. Durante el periodo de incubación se realiza un control del pH de cada muestra para observar si se han producido variaciones, y si es así poder añadir unas cantidades de ácido o base (HNO_3 o NaOH , 0.001M) para corregirlo a un valor determinado. Tras su interacción, son medidas de nuevo en pHmetro y tomadas unas alícuotas de cada muestra para su posterior centrifugación. Este proceso se realiza para que en el sobrenadante quede la materia orgánica libre, que no ha quedado adsorbida sobre la superficie coloidal, siendo cuantificada mediante las medidas en el equipo multi N/C® 3100. Comparando los datos entre las concentraciones iniciales añadidas y las de MO libre en cada muestra se puede calcular la cantidad que está adsorbida formando los recubrimientos proteicos. Ésta fracción de MO no ha quedado en el sobrenadante porque está fuertemente ligado a la nanopartícula, lo que se conoce como “hard coronas”. En función de las variables de estudio se analizarán cómo influyen diferentes factores al fenómeno de adsorción.

Las isotermas realizadas son tres, en función del tipo de nanopartícula o materia orgánica empleadas que formaran las coronas. La primera de ellas está conformada por la interacción entre ZnO NPs y BSA. Las condiciones experimentales son una concentración fija de NPs (100 mg/L), una variable de BSA de 20, 100 o 500 mg/L y una fuerza iónica fija de 0.1M en un rango de pH que comprende de 7 a 10. La segunda isoterma se realiza con nanopartículas de TiO_2 en interacción con BSA. En este caso la concentración tanto de las NPs como de la BSA es fija, siendo en ambos casos de 100 mg/L. En esta isoterma se analizará el efecto de la fuerza iónica, puesto que para cada tipo de muestra se prepara una fuerza iónica distinta de 0.1 y 0.001M, para un rango de pH entre 5 y 10. Por último, la tercera isoterma se realiza de nuevo con NPs de TiO_2 pero con ácido húmico, ambos con concentraciones de 100 mg/L. La principal variable de análisis junto con el pH es la fuerza iónica, siendo variable para dos casos de 0.1 y 0.001M, en un rango de 4 a 10.

- Calibraciones de materia orgánica

Como paso previo a la realización de las isothermas es necesario calibrar el equipo de medida multi N/C® 3100, para los estándares preparados tanto para la BSA como para el HA. El procedimiento de medida será exactamente igual que en el caso de las muestras para las isothermas pertinentes, con la recogida de datos en forma de señal en unidades de área (UA). Estas calibraciones servirán para relacionar las UA de cada muestra posterior con unas concentraciones de MO específicas, que permitirán determinar la cantidad que queda libre sin adsorción sobre la superficie de las nanopartículas.

En el caso de la BSA, se parte de un preparado en polvo de concentración 10.000 mg/L. A partir de éste se preparan unos determinados estándares en forma de solución que tan solo contienen BSA en concentraciones conocidas. Para una mayor exactitud se determinaron las concentraciones reales por pesada, mostrándose los resultados en la siguiente tabla:

Estándares BSA		
Conc teórica (mg/L)	Conc real BSA (mg/L)	UA NPOC
100	97,13	39068,69
50	47,77	18083,06
25	24,32	9582,97
10	9,88	4176,66
2	1,95	1073,81
1	1,07	848,33
0,5	0,47	732,83

Figura 39. Resultados de los estándares de BSA preparados para su calibración en el equipo, mediante el método NPOC, que servirán para el tratamiento de datos posterior en las isothermas de adsorción.

Los resultados se muestran en unidades de área medidas por el método NPOC (Carbono Orgánico No Purgable) descrito en el apartado de Materiales y Métodos. Los resultados se presentan como una media de las dos medidas realizadas por el equipo durante el procedimiento. Relacionando los resultados de las señales obtenidas con las concentraciones reales calculadas para cada estándar, la recta de calibración obtenida muestra una relación lineal con una muy buena regresión.

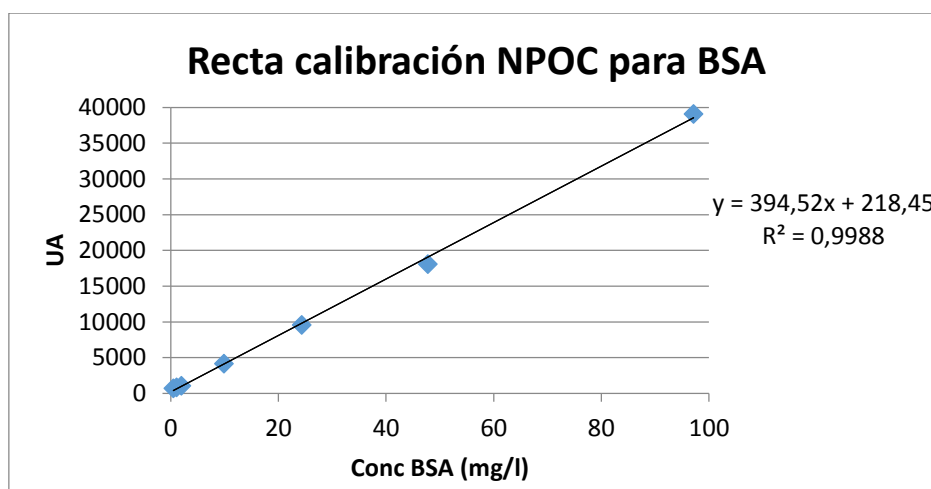


Figura 40. Recta de calibración para los estándares de BSA mediante el método NPOC.

La calibración de los estándares de HA se realizó mediante la preparación de soluciones a partir de un stock de 3.6 g/L. En este caso los estándares cuentan con una solución más que en el caso de la BSA, con un preparado de 5 mg/L. Las mediciones se realizan de forma análoga con el método NPOC en el equipo multi N/C® 3100.

Estándares de HA		
Conc teórica (mg/L)	Conc real HA (mg/L)	UA NPOC
100	88,09	39524,10
50	44,81	19693,81
25	22,08	9930,49
10	8,91	4327,51
5	4,43	2457,27
2	1,77	1483,48
1	0,93	820,60
0,5	0,43	866,59

Figura 41. Tabla de concentraciones de los estándares preparados para la calibración de HA, con sus resultados en UA tras su medición en el equipo.

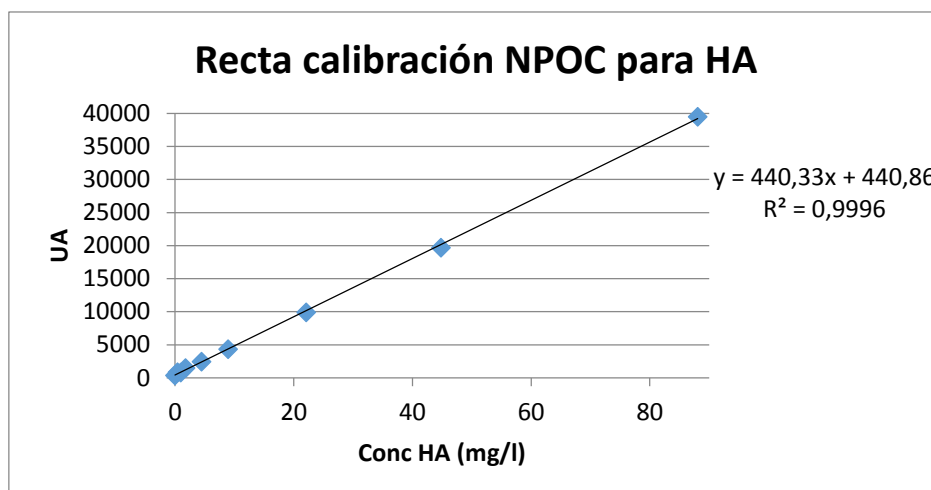


Figura 42. Recta de calibración para los estándares de HA mediante el método NPOC.

- Isoterma de adsorción de BSA en ZnO NPs

Como se ha explicado anteriormente, el objetivo de esta isoterma es el estudio de la adsorción de BSA en la superficie de nanopartículas de ZnO a diferentes concentraciones de proteína. Las concentraciones (20, 100 y 500 mg/L) son preparadas para diferentes muestras en un rango de pH que comprende de 7 a 10. En este caso, los ajustes se realizan mediante unas adiciones de NaOH (0.001 o 0.1M) calculadas previamente para obtener valores escalonados en función del volumen empleado. Todas las muestras fueron preparadas con una fuerza iónica 0.1M a partir de NaNO₃ 1M. La figura 43 muestra tabuladas las condiciones de cada una de las muestras preparadas, que posteriormente se medirían en el equipo multi N/C® 3100 para analizar su contenido en carbono orgánico no purgable (NPOC).

ISOTERMA ZnO NPs – BSA					
Muestra	Conc BSA (mg/L)	Conc ZnO NPs (mg/L)	Fuerza iónica (M)	Vol NaOH (μl)	pH final
ZnO – BSA #1	20	100	0.1	-	7.48
ZnO – BSA #2	20	100	0.1	1 (0.001M)	7.36
ZnO – BSA #3	20	100	0.1	2 (0.001M)	7.34
ZnO – BSA #4	20	100	0.1	10 (0.001M)	7.82
ZnO – BSA #5	20	100	0.1	50 (0.001M)	7.93
ZnO – BSA #6	20	100	0.1	500 (0.001M)	8.64
ZnO – BSA #8	20	100	0.1	10 (0.1M)	9.00
ZnO – BSA #9	20	100	0.1	20 (0.1M)	9.54
ZnO – BSA #10	100	100	0.1	-	7.37
ZnO – BSA #11	100	100	0.1	1 (0.001M)	8.41
ZnO – BSA #12	100	100	0.1	2 (0.001M)	8.09
ZnO – BSA #13	100	100	0.1	5 (0.001M)	7.78
ZnO – BSA #14	100	100	0.1	20 (0.1M)	9.33
ZnO – BSA #15	500	100	0.1	-	7.37
ZnO – BSA #16	500	100	0.1	5 (0.001M)	7.22
ZnO – BSA #17	500	100	0.1	10 (0.001M)	7.28
ZnO – BSA #18	500	100	0.1	200 (0.001M)	8.13
ZnO – BSA #19	500	100	0.1	500 (0.001M)	8.25
ZnO – BSA #20	500	100	0.1	10 (0.1M)	8.83

Figura 43. Tabla recopilatoria de las muestras preparadas para la isoterma de adsorción de BSA en ZnO NPs.

Se observa que en las adiciones de NaOH para aumentar el pH del medio se muestra una molaridad entre paréntesis, en función de cuál era la concentración del stock base del que se añadía. La variación responde a una cuestión de necesidad de aumentar más o menos el pH en unas cantidades lo menor posibles. Se realizó un control de pH tras las primeras 24 horas de incubación, puesto que las condiciones pueden variar bastante respecto de las deseadas inicialmente. Por ello se miden tras este periodo de tiempo y si es necesario se corrigen añadiendo ácido o base (HNO_3 o NaOH , 0.1M), volviendo a dejarlas en incubación tras este control. Los volúmenes añadidos han sido tenidos en cuenta para los cálculos finales de concentraciones tanto de BSA como de nanopartícula, puesto que una gran adición de ácido o base puede diluir sus concentraciones de forma significativa. El proceso de control intermedio de pH se decidió que era necesario tras una primera experimentación en donde se mostraban unos resultados muy fragmentados entre dos niveles de pH. Estos resultados se muestran en la figura 44, donde se observa que los valores de pH dan un gran salto desde pH 7 a 10, sin puntos intermedios. Las condiciones de las muestras son las mismas que para las de la presente isoterma con una concentración de BSA de 100 mg/L.

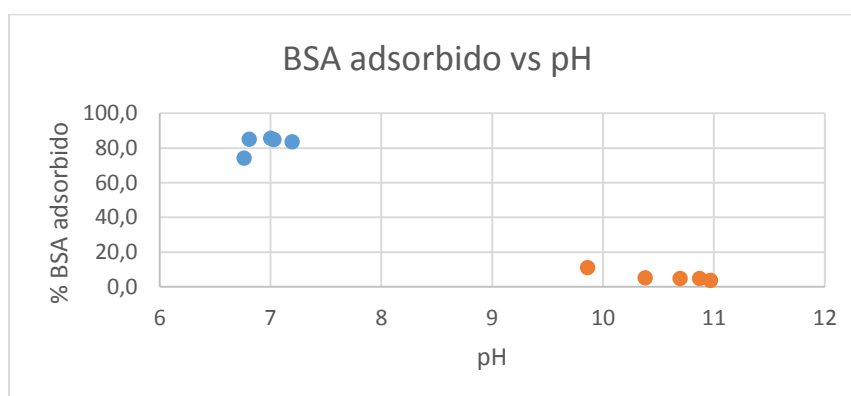


Figura 44. Resultados gráficos de una experiencia previa a la isoterma, donde se observa el salto de pH en la adsorción de las muestras si no hay un control intermedio de pH.

Con las correcciones pertinentes los pH finales se muestran en la gráfica 43, donde se aseguran unos resultados con una mayor variedad de rangos y con puntos representativos para valores intermedios. Una vez realizado todo el procedimiento de medidas de las muestras y su determinación de señales del equipo para el carbono orgánico no purgable, se emplean los resultados de la calibración de estándares de BSA para los cálculos de la concentración de BSA libre. Mediante las concentraciones iniciales se calculan en concentraciones las cantidades que han quedado adsorbidas. Como durante el proceso de retirada del sobrenadante puede lugar a errores en los cálculos por pérdidas de BSA libre en la solución, se preparan para cada una de las tres concentraciones de BSA en las muestras un blanco que no contiene nanopartículas, de modo que permita corregir los valores finales al conocer en ellos qué cantidades se pierden durante el procedimiento experimental.

Resultados Isoterma ZnO - BSA				
Muestra	pH	Conc BSA libre (ppm)	Conc BSA ads (ppm)	Conc BSA total (ppm)
20 ppm BSA	7,48	8,22	11,70	19,93
20 ppm BSA	7,37	6,13	13,76	19,89
20 ppm BSA	7,34	5,76	14,13	19,88
20 ppm BSA	7,92	8,08	11,82	19,90
20 ppm BSA	7,82	9,80	10,10	19,90
20 ppm BSA	8,64	13,68	6,16	19,84
20 ppm BSA	9,00	15,82	4,06	19,88
20 ppm BSA	9,54	16,38	3,51	19,90
100 ppm BSA	7,38	63,35	35,07	98,42
100 ppm BSA	8,42	71,90	26,49	98,39
100 ppm BSA	8,09	68,80	29,63	98,43
100 ppm BSA	7,78	66,92	30,85	97,77
100 ppm BSA	9,33	103,51	0,00	98,38
500 ppm BSA	7,37	353,49	134,51	488,01
500 ppm BSA	7,22	314,95	171,85	486,80
500 ppm BSA	7,28	331,36	155,05	486,41
500 ppm BSA	8,13	388,11	99,76	487,87
500 ppm BSA	8,25	393,65	94,58	488,23
500 ppm BSA	8,83	414,53	73,52	488,05

Figura 45. Resultados de isoterma de adsorción de BSA en nanopartículas de ZnO, mostrando los resultados en forma de concentración de BSA libre (sin adsorber) y adsorbido.

Los resultados muestran las concentraciones libres determinadas mediante las medidas del equipo multi N/C® 3100, que se relaciona directamente con los contenidos de carbono de la BSA presente en las muestras. La figura 46 representa todos estos resultados gráficamente en función del pH para cada uno de los casos de estudio, las diferentes concentraciones de BSA con que pueda interactuar la nanopartícula.

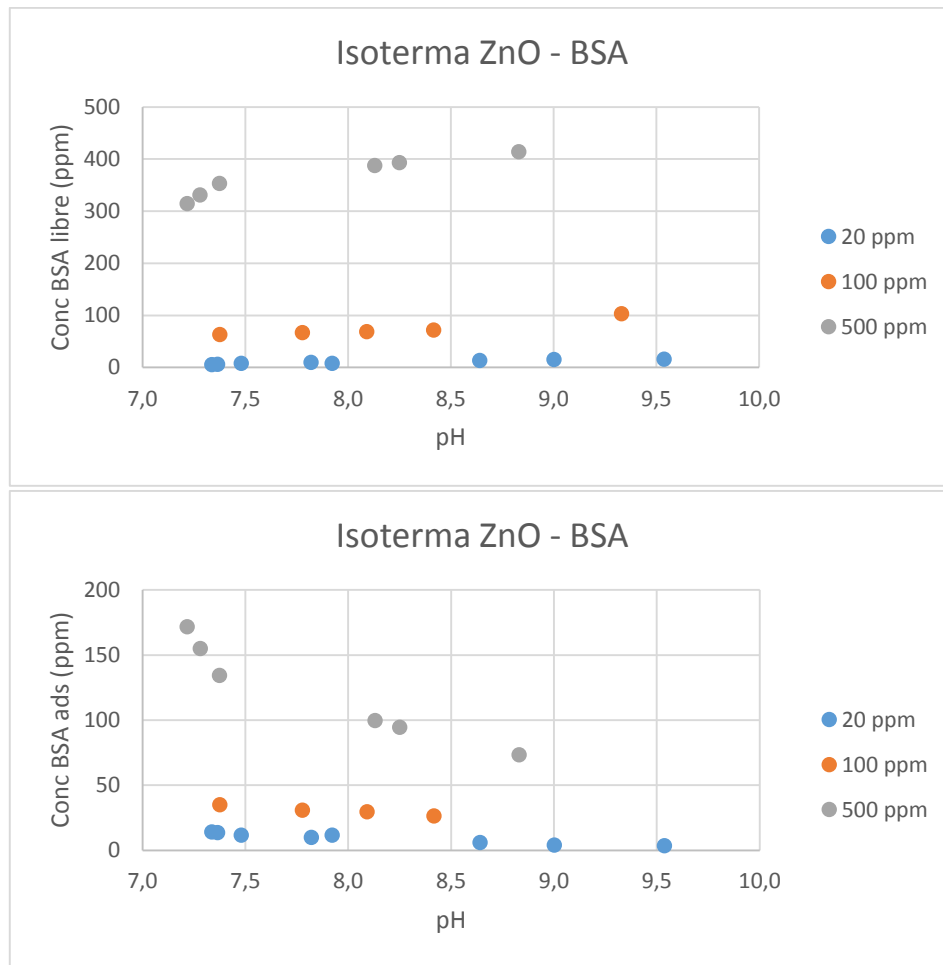


Figura 46. Representación gráfica de resultados de la isoterma de adsorción de BSA sobre nanopartículas de ZnO. Arriba se muestran los resultados de BSA libre en función del pH, mientras que abajo se muestra las concentraciones de proteína adsorbida sobre ZnO NPs.

En los resultados se observa un evidente escalonamiento para las diferentes concentraciones de BSA total empleadas. No obstante, lo interesante reside en la tendencia que siguen los tres casos conforme aumenta el pH del medio, siguiendo un orden ascendente en las concentraciones de BSA libre hasta alcanzar el máximo para las condiciones más básicas. A su vez, las concentraciones de BSA adsorbido sobre las nanopartículas de ZnO tienen una tendencia decreciente, siendo el caso de 500 ppm el más visible. Para observar mejor las tendencias que siguen para cada una de las concentraciones añadidas de BSA en las muestras, se ofrecen en las figuras 47 y 48 las representaciones para cada uno de estos subconjuntos individualmente.

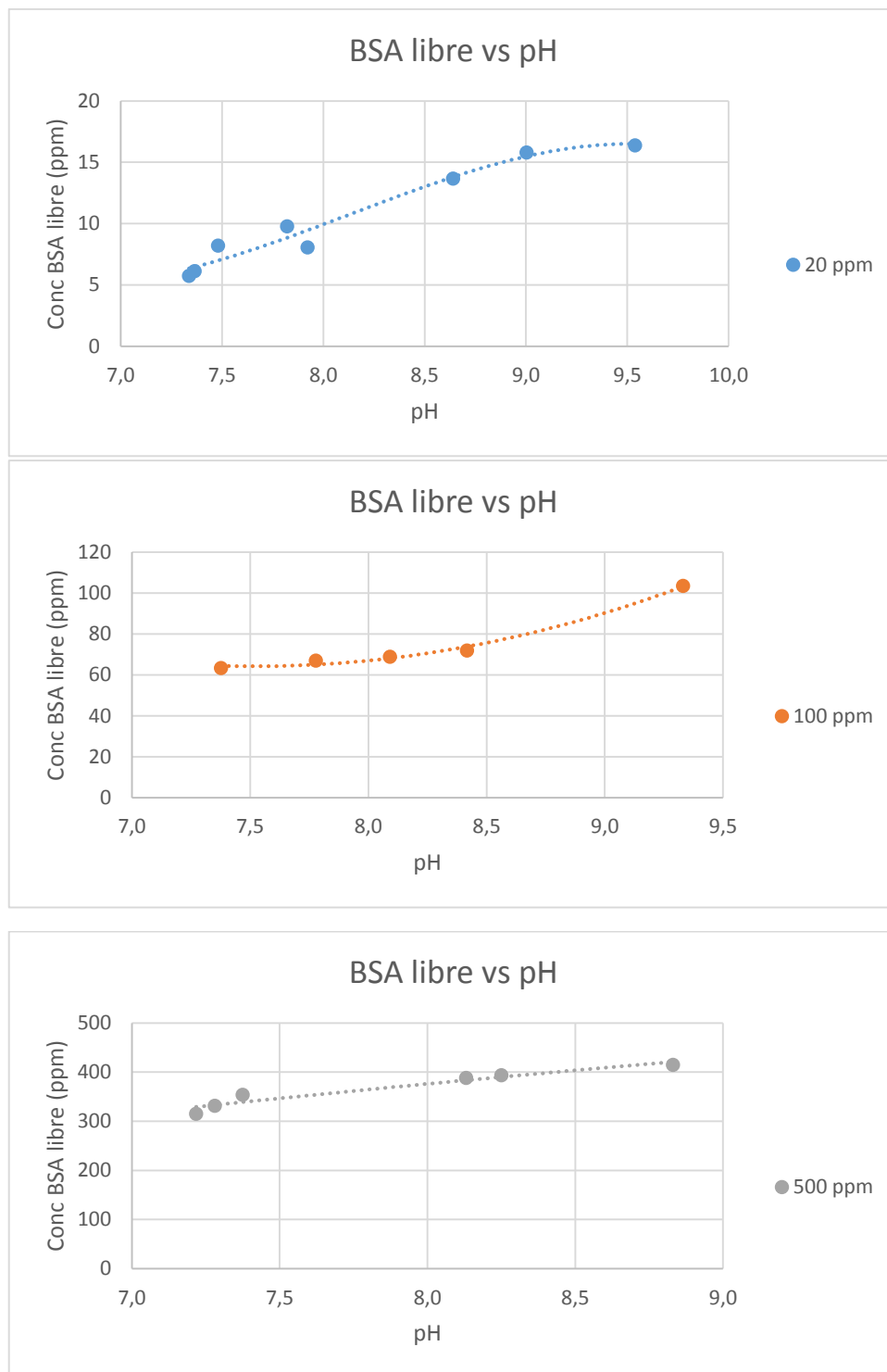


Figura 47. Representaciones de las concentraciones de BSA libres en función del pH para cada uno de los tres tipos de muestras, en función de la concentración total de BSA presente inicialmente en las muestras.

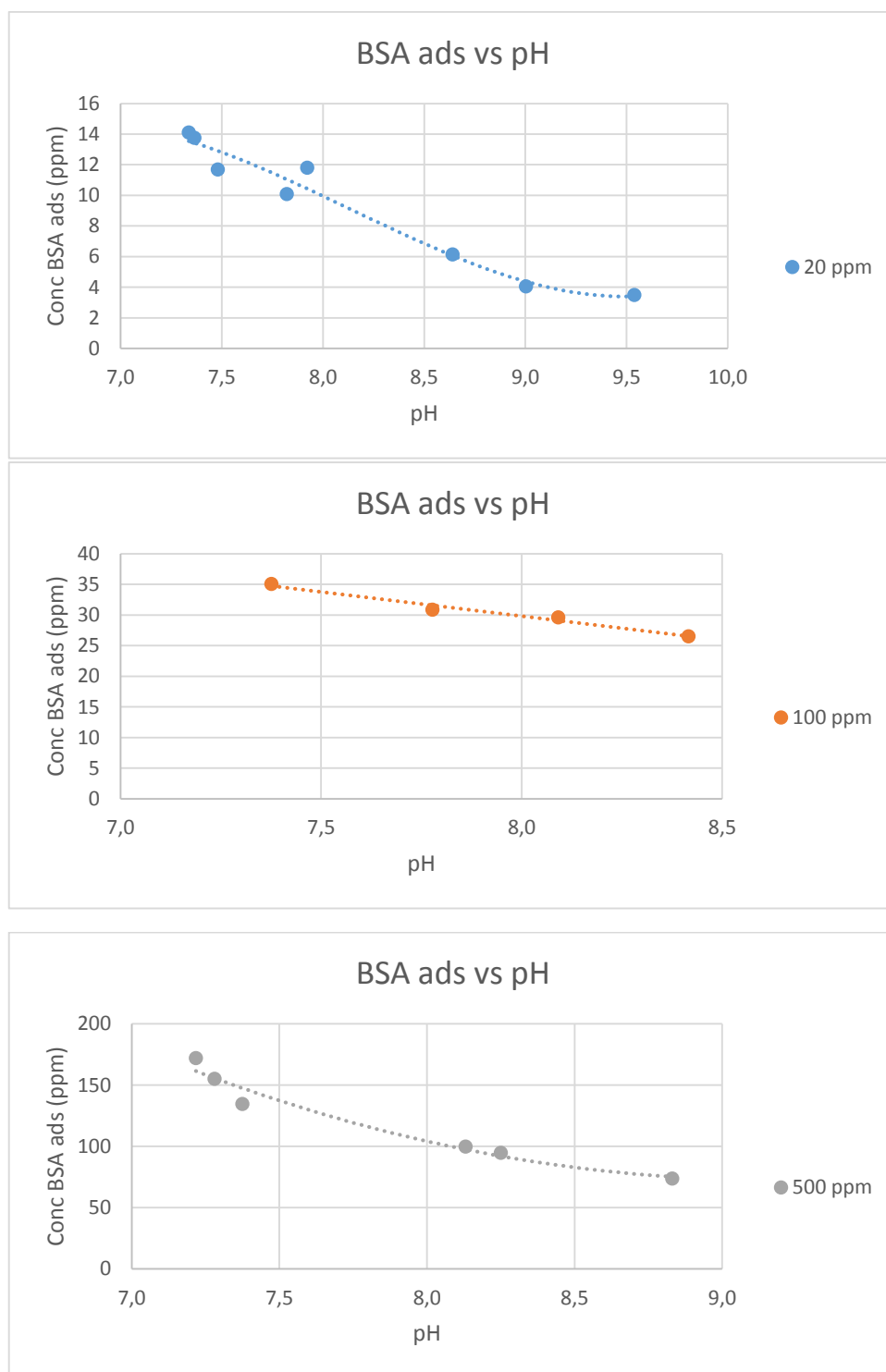


Figura 48. Representaciones de las concentraciones de BSA adsorbidas en función del pH para cada uno de los tres tipos de muestras, en función de la concentración total de BSA presente inicialmente en las muestras.

Comparando entre sí, en el caso de 20 ppm a un pH de 7.3 la cantidad de BSA adsorbida es de unos 13 ppm, lo que supone que un 70% del total queda adsorbido durante el proceso de incubación en la superficie de las nanopartículas. En cambio, cuando el pH asciende hasta 9.5 la cantidad adsorbida disminuye hasta 3.5 ppm, lo que es un 17% del total de BSA. Para las muestras con una concentración de 100 ppm de BSA iniciales, el descenso es algo menor aunque no se hayan obtenido datos a pH tan básicos como en otros ejemplos. Para un valor de pH de 7.3 la concentración adsorbida es un 35% respecto al total, descendiendo hasta un 26% cuando

el pH es de 8.5. Finalmente, en el caso de muestras con una concentración inicial de 500 ppm, el descenso obtenido representa unos valores de un 15% del total (73 ppm) a un pH de 8.8 desde el 35% (171 ppm) que se da a 7.2. Los resultados no varían si son representadas las cantidades adsorbidas en función de la cantidad de nanopartículas, puesto que para todos los casos ha sido más o menos constante (100 mg/L), como puede observarse en la figura 49.

Es decir, que pese a que en los resultados la tendencia parece más marcada conforme aumenta la concentración total de BSA, la mayor disminución de concentraciones adsorbidas se presenta en el caso de 20 ppm, con unas diferencias que van desde un 70% adsorbido hasta un 17% en las condiciones más básicas. Los porcentajes de adsorción indican que no por haber una mayor cantidad de BSA en el medio se vayan a obtener unos mejores ratios de adsorción, sino que dependerá de las condiciones del medio como el pH que determinarán dicho proceso. Por supuesto, los tres casos indican que el proceso de adsorción para la formación de coronas con las nanopartículas de ZnO se ve muy influenciado por el pH del entorno, siendo mejor el proceso en condiciones de pH neutro, y dificultándose conforme aumenta el pH hasta alcanzar unos valores mínimos en las cantidades adsorbidas. Esto es debido principalmente a la influencia de las cargas superficiales en función del pH, que determinará una mayor o menor situación de repulsión electrostática entre el sistema proteína-nanopartícula y mejorará o impedirá la correcta situación de interacción entre ambas.

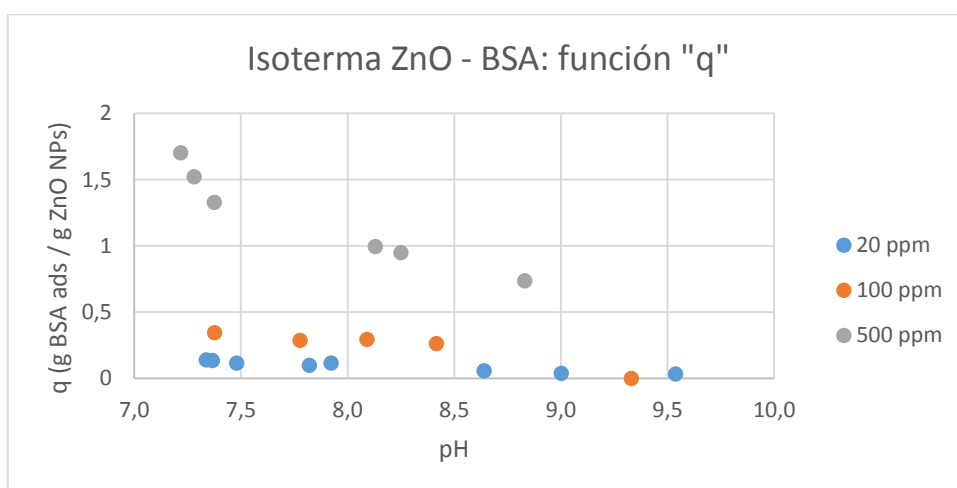


Figura 49. Representación de los valores obtenidos en la isoterma para las cantidades adsorbidas en función de las cantidades de nanopartículas de ZnO para cada muestra, para cada pH determinado.

Además de las cantidades adsorbidas, se analiza tanto el tamaño como el potencial zeta de cada una de las muestras de la isoterma entre BSA y ZnO NPs, donde se pueden observar cómo influye el proceso de adsorción determinado por el pH en la estabilidad coloidal del sistema.

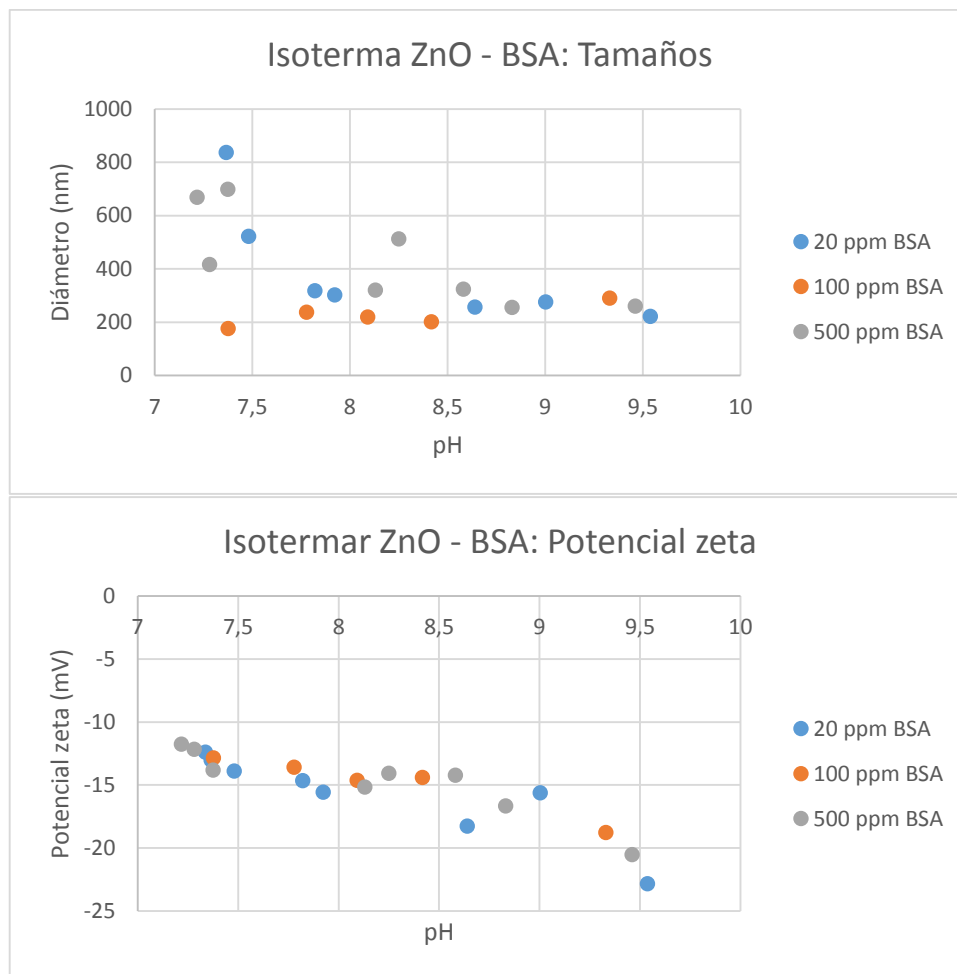


Figura 50. Representación de tamaños y potenciales zeta para las muestras de la isoterma de adsorción de BSA sobre nanopartículas de ZnO, en función del pH del medio.

En cuanto a los potenciales zeta de la muestras, se observa que el comportamiento es el mismo para los tres casos estudiados, sin importar la concentración de BSA inicial. Las cargas superficiales disminuyen conforme el pH aumenta, alcanzando los valores máximos (en valor absoluto) para la condición más básica. Esto se correlaciona con los datos de Sasidharan et al (2013) de la figura 22 para los potenciales zeta de la BSA, y con los datos para las nanopartículas de ZnO, figura 51. En ellos se muestra como en unas condiciones cada vez más alcalinas, el potencial zeta tanto de la BSA como de las nanopartículas de ZnO se vuelve más negativo.

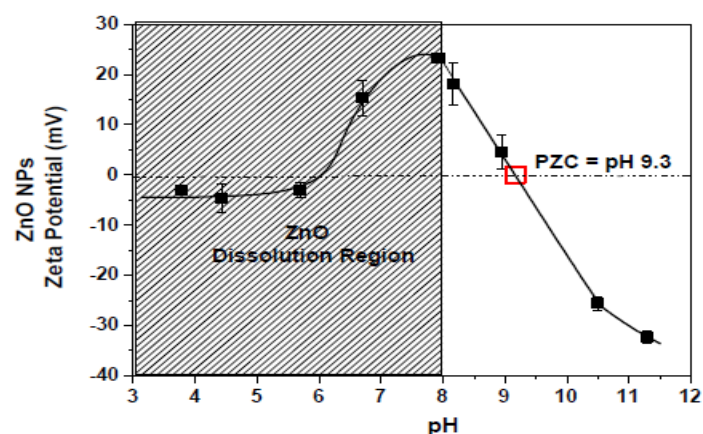


Figura 51. Variaciones de potencial zeta para ZnO NPs en función del pH (Mohd Omar, 2014).

Como se ha comprobado anteriormente en los experimentos de las celdas de potenciometría y las cinéticas de adsorción, la carga superficial de los elementos en interacción puede influir sobre la estabilidad del sistema coloidal. En los casos en los que mayor es la carga negativa, suele representar sistemas de mayor estabilidad en los que no se producen fenómenos de agregación de las nanopartículas debido a la alta repulsión electrostática entre partículas, lo cual impide la formación de agregados. Este fenómeno se observa en los tamaños para los rangos de condiciones más básicas, donde sin importar la concentración inicial de BSA los diámetros hidrodinámicos medidos con el equipo Zetasizer se mantienen constantes en unos tamaños inferiores a 300 nm, aun siendo para estos parámetros más complicado el proceso de adsorción de la BSA y la formación de las coronas. Es en las condiciones de neutralidad de pH donde se observan diferencias entre los resultados, e incluso agregación en algunos casos. Teóricamente, y con respecto a los resultados mostrados por Sasidharan et al (2013) y por Mohd Omar et al (2014), para unas condiciones cercanas a pH neutro se puede producir una anulación de las cargas superficiales, puesto que la nanopartícula está cargada positivamente y la BSA negativamente. Que la carga neta esté cercana al punto isoelectrico propicia que las repulsiones por cargas superficiales no existan, y por tanto se puedan producir fenómenos de agregación. Aunque si atendemos a resultados de estabilidad de Bian et al (2011), la mera presencia de la BSA puede resultar clave en la formación de recubrimientos que impidan la agregación entre nanopartículas. En los casos analizados, ocurren ambas tendencias. Para una concentración de 100 ppm de BSA en el medio, se muestra una estabilidad constante en los tamaños de nanopartículas sin importar el pH, con unos tamaños que oscilan entre 200 y 300 nm. No obstante, este comportamiento no se reproduce en el caso de 20 y 500 ppm. En el primer caso, se obtienen los diámetros más altos, por encima de 800 nm, a pH 7.3, disminuyendo conforme aumenta la basicidad del medio. Para esta concentración parece claro que el comportamiento de agregación es debido a que por atracción de cargas se produce un favorecimiento de los procesos de adsorción superficial. Sin embargo, la cantidad de BSA no es suficiente para ocupar todos los centros activos de las nanopartículas, por lo que se produce agregación entre ZnO NPs. El caso de mayor concentración, 500 ppm, puede que el fenómeno de agregación sea debido a que al ser tan alta la cantidad de proteína en el medio y en unas condiciones en las que su carga no es tan negativa, las propias moléculas orgánicas interaccionan entre sí, produciendo sus propios agregados. Este aumento de agregados de la BSA impide su correcta adsorción con las nanopartículas, por lo que los coloides tienen gran cantidad de centros activos libres para la agregación. Este fenómeno disminuye conforme aumenta el pH puesto que la proteína adquiere una mayor carga negativa y no forma agregados, produciéndose una estabilización por repulsión de cargas.

- Isoterma de adsorción de BSA en TiO₂ NPs

El objetivo de esta isoterma es el estudio de la influencia de la fuerza iónica en los procesos de adsorción de BSA sobre la superficie de nanopartículas de TiO₂, en un rango específico de pH comprendido entre 5 y 10. Las concentraciones de NPs así como de BSA son fijas para todas las muestras (100 mg/L). La variación de la fuerza iónica representa dos tipos de muestras: 0.1 o 0.001M. El procedimiento de medida y preparación de las muestras es similar al caso de la isoterma anterior, solo que el ajuste de pH en esta ocasión no se realiza con unos volúmenes de adiciones predeterminados, sino que se ajustan in situ tras su preparación mediante pHmetro. Los dos tipos de muestras cuentan también con blancos, en los que no hay nanopartículas, para corregir los datos finales de acuerdo a posibles pérdidas de BSA no adsorbida en el proceso de extracción de sobrenadante tras su centrifugación. Las muestras se someten de nuevo a un

control de pH tras 24 horas en incubación, midiéndose finalmente tras 48 horas previamente a su análisis de NPOC en el equipo multi N/C® 3100.

ISOTERMA TiO ₂ - BSA				
Muestra	Fuerza iónica (M)	Vol NaOH 0.1M (μl)	Vol HNO ₃ 0.1M (μl)	pH final
TiO ₂ – BSA #1	0,1	130	-	10,21
TiO ₂ – BSA #2	0,1	70	-	9,87
TiO ₂ – BSA #3	0,1	40	-	9,03
TiO ₂ – BSA #4	0,1	30	-	7,66
TiO ₂ – BSA #5	0,1	20	-	7,27
TiO ₂ – BSA #6	0,1	20	-	6,99
TiO ₂ – BSA #7	0,1	15	-	6,65
TiO ₂ – BSA #8	0,1	20	-	7,04
TiO ₂ – BSA #9	0,1	12	4	6,49
TiO ₂ – BSA #10	0,1	3	-	6,01
TiO ₂ – BSA #11	0,1	-	2	5,59
TiO ₂ – BSA #12	0,001	100	-	10,58
TiO ₂ – BSA #13	0,001	70	-	9,99
TiO ₂ – BSA #14	0,001	40	-	9,69
TiO ₂ – BSA #15	0,001	30	-	8,66
TiO ₂ – BSA #16	0,001	20	-	7,26
TiO ₂ – BSA #17	0,001	18	5	7,00
TiO ₂ – BSA #18	0,001	14	-	6,93
TiO ₂ – BSA #19	0,001	10	-	6,80
TiO ₂ – BSA #20	0,001	10	-	6,56
TiO ₂ – BSA #21	0,001	-	-	6,20
TiO ₂ – BSA #22	0,001	-	-	5,97

Figura 52. Tabla recopilatoria de muestras para la isoterma de adsorción de BSA en TiO₂ NPs.

En principio el pH alcanzado era algo superior al que se muestra tabulado como valor final, puesto que experimentalmente se observó que tras un tiempo de interacción entre la proteína y la nanopartícula se produce algo de descenso en el pH, seguramente debido a la solubilidad de la nanopartícula.

Tras su medida final de pH y extracción del sobrenadante donde se encuentre la fracción de BSA libre de adsorción con la nanopartícula, se procede a sus medidas para el carbono orgánico no purgable. Los resultados se muestran en función de concentraciones de la BSA libre y la adsorbida, así como la total en la solución teniendo en cuenta los volúmenes tras las adiciones de ácido o base para el ajuste de su pH. Además, se calcula la cantidad de BSA adsorbida en función de la cantidad de nanopartículas presente en la muestra (valor q).

Resultados Isoterma TiO ₂ - BSA						
Muestra	pH	Conc BSA libre (ppm)	Conc BSA ads (ppm)	Conc BSA total (ppm)	Conc TiO ₂ NPs (ppm)	q (g BSA ads/g TiO ₂)
0,1M	10,21	89,81	3,28	93,09	103,05	0,03
0,1M	9,03	94,52	3,84	98,36	103,70	0,04
0,1M	7,66	88,84	6,23	95,07	103,97	0,06
0,1M	7,27	91,89	6,53	98,42	105,01	0,06

0,1M	6,99	90,13	4,88	95,01	102,27	0,05
0,1M	6,65	88,35	6,08	94,43	105,37	0,06
0,1M	7,04	85,76	11,40	97,16	105,41	0,11
0,1M	6,49	86,41	11,16	97,57	103,39	0,11
0,1M	6,01	78,48	13,32	91,80	104,26	0,13
0,1M	5,59	78,40	16,31	94,70	103,95	0,16
0,001M	10,58	103,32	0,00	103,32	114,11	0,00
0,001M	9,99	102,56	0,00	102,56	114,09	0,00
0,001M	9,69	103,54	0,00	103,54	114,95	0,00
0,001M	8,66	98,04	1,90	99,94	114,75	0,02
0,001M	7,26	96,74	6,09	102,82	113,38	0,05
0,001M	7,00	96,73	7,21	103,93	114,03	0,06
0,001M	6,93	89,96	13,15	103,11	114,74	0,11
0,001M	6,80	94,93	10,16	105,08	114,34	0,09
0,001M	6,56	92,56	11,32	103,88	114,44	0,10
0,001M	6,20	78,12	25,56	103,68	114,99	0,22
0,001M	5,97	79,78	23,65	103,43	114,78	0,21

Figura 53. Resultados de isoterma de adsorción de BSA en nanopartículas de TiO_2 , mostrando los resultados en forma de concentración de BSA libre, adsorbida y en función de las cantidades de nanopartícula en cada muestra.

Se observa gráficamente que los resultados son muy similares para las concentraciones de BSA libre, teniendo la misma tendencia de un crecimiento desde unas cantidades iniciales de en torno a 80 ppm en condiciones ácidas hasta unos valores cercanos al máximo, superiores a 90 ppm, en las condiciones más básicas de pH 9-10. En términos de concentraciones de proteína adsorbida, en las condiciones más ácidas sí que muestra diferencia, con unos valores de 25 ppm de BSA para una fuerza iónica de 0.001M, mientras que a ese pH de valor 6 para fuerza iónica 0.1M se muestran unos valores más bajos de en torno a 15 ppm. El descenso de las cantidades adsorbidas es similar en ambos casos en cuanto a intervalos de pH se refiere, con unas caídas constantes conforme aumenta el pH hasta alcanzar los mínimos en torno a pH 9-11, hasta que no hay nada adsorbido para una fuerza iónica de 0.001M frente a unos valores cercanos a 3 ppm en el caso de mayor fuerza. Este mismo fenómeno se observa en los estudios de Kopac et al (2008) y Wassell & Embery (1996), los cuales también estudian el efecto del pH en la adsorción de BSA sobre nanopartículas de TiO_2 . En el caso del primero, su estudio analiza el descenso es progresivo conforme aumenta el pH, alcanzando los niveles de máxima adsorción en las condiciones más ácidas (en su caso pH 4). Los porcentajes de adsorción son bastante similares en ambos casos, donde en condiciones ácidas oscilan en torno al 20% respecto a la cantidad total inicial en las muestras (100 mg/L de BSA) hasta alcanzar valores del 0 o 5% para fuerza iónica 0.001 y 0.1M, respectivamente. Pese a que las tendencias son similares, parece más marcado el descenso para una fuerza iónica menor, puesto que consigue unas mayores cantidades de proteína adsorbida formando recubrimientos en las nanopartículas en condiciones ácidas, aunque los valores que alcanza en condiciones básicas son nulos, mientras que a una fuerza iónica mayor todavía se observa un pequeño porcentaje de adsorción (figura 54).

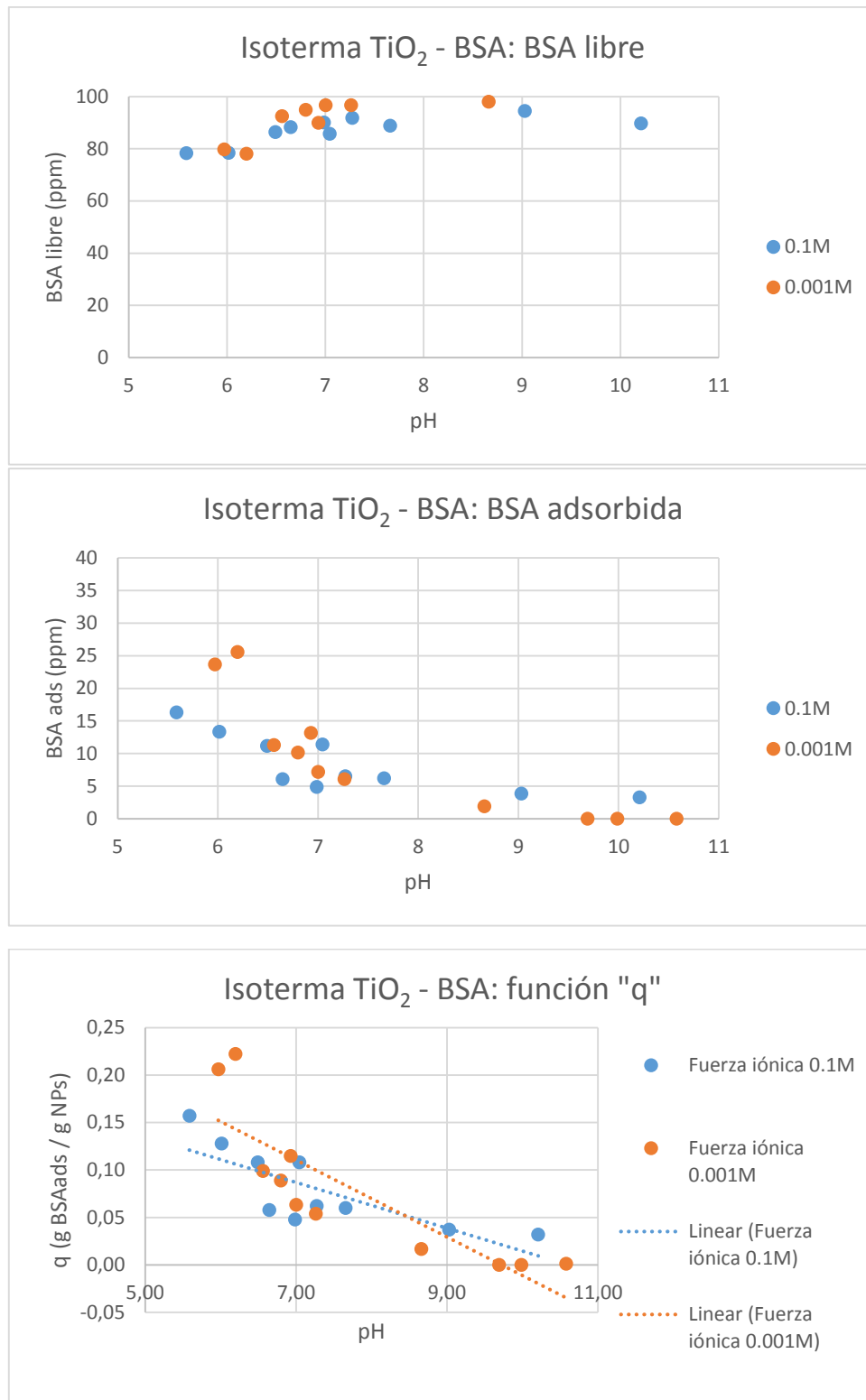


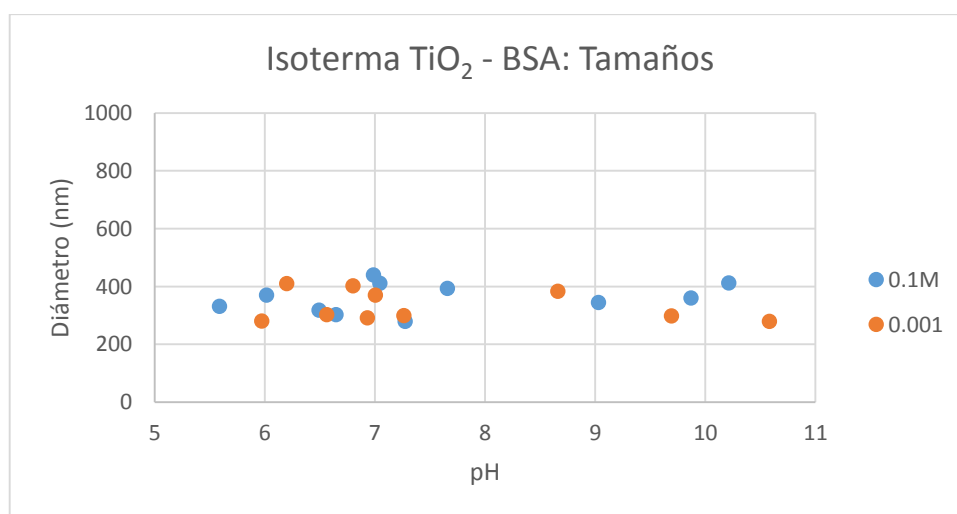
Figura 54. Representaciones de los resultados de isoterma de adsorción de BSA en nanopartículas de TiO_2 en función de la cantidad de BSA libre, la adsorbida y la adsorbida en función de la masa de nanopartículas presentes en cada muestra.

Las diferencias entre las dos fuerzas iónicas empleadas son debidas al efecto de apantallamiento de cargas superficiales que producen en el medio. Ya se vio en las cinéticas de agregación que pueden afectar a la estabilidad coloidal del sistema, mediante la inhibición de las barreras energéticas que suponen las repulsiones electrostáticas, de modo que fenómenos de agregación

se podrían ver favorecidos. De forma similar puede afectar al proceso de adsorción superficial de la proteína sobre las nanopartículas. Cuando la fuerza iónica es baja (0.001M) no se producen impedimentos por parte del electrolito sobre la formación de las coronas, puesto que no hay un apantallamiento de las cargas. Esto significa que el proceso de adsorción dependerá fundamentalmente en tal caso del pH del entorno, que determinará las cargas de las nanopartículas y la proteína. Por ello, a pH ácido se produce un favorecimiento de la adsorción puesto que las nanopartículas de TiO_2 tendrán una carga positiva o, al menos cercana al punto isoelectrónico (figura 25) de acuerdo con los resultados de Loosli & Stoll (2012). A su vez, la proteína tiene una carga negativa (figura 22), por lo que se produce una atracción de las cargas que favorece el proceso de interacción. En cambio, conforme aumenta el pH se produce una variación de las cargas para la nanopartícula y para la BSA hacia valores más negativos, por lo que por repulsiones se dificulta la interacción entre sí. Esto conlleva a unas disminuciones de la BSA adsorbida en los resultados y un aumento de las cantidades libres en las muestras hasta que los valores alcanzan unas condiciones de basicidad que producen la inhibición total del proceso de adsorción.

Cuando la fuerza iónica es superior, valor de 0.1M, sí que tiene una influencia sobre los resultados de adsorción en función del pH. El propio pH del medio tiene una clara influencia en la disminución de los ratios de adsorción conforme las condiciones son más básicas, pero es un factor que no influye con carácter aislado, sino que también la fuerza iónica produce unos efectos sobre la formación de coronas proteicas. Respecto al pH, el comportamiento de la disminución se explica de la misma manera que para el caso de la fuerza iónica 0.001M, de hecho se muestran con tendencias similares para ambos casos. No obstante, las diferencias entre sí son debidas a la fuerza iónica, puesto que en los casos más ácidos del rango de estudio se muestran unos valores de adsorción menores que cuando la fuerza iónica es menor. Es debido a que el apantallamiento de las cargas disminuye la atracción que pudiera existir por la existencia de cargas opuestas entre nanopartículas y la proteína. Su inhibición provoca esta disminución en los ratios de adsorción.

En cambio, cuando el pH alcanza las condiciones más básicas las cargas de ambos compuestos son negativas, lo que dificultaba su interacción. Debido a la influencia del electrolito, se produce el apantallamiento de nuevo para que esa repulsión entre cargas sea menor, y aunque los ratios de adsorción hayan disminuido, aún mantienen unas cantidades de proteína adsorbida, en lugar de inhibirse totalmente.



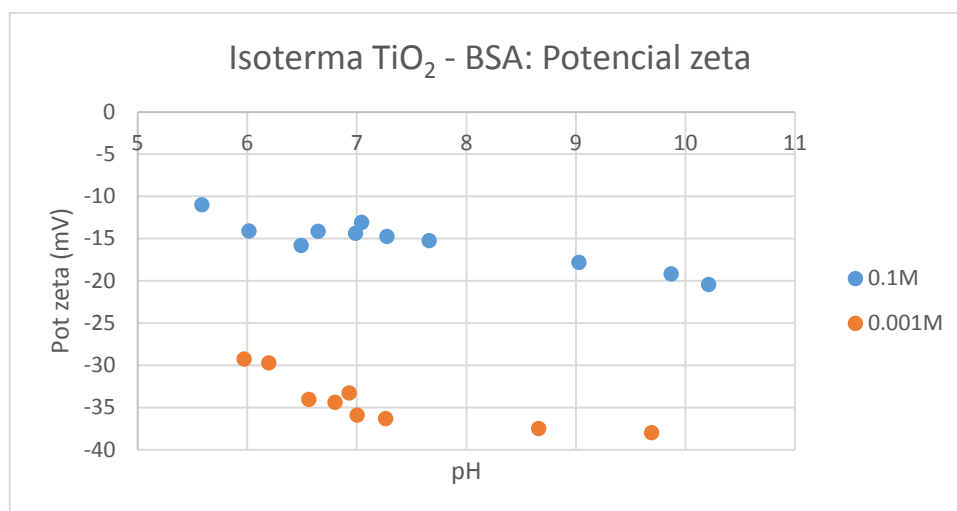


Figura 55. Representación de tamaños y potenciales zeta para las muestras correspondientes a la isoterma de adsorción de BSA en nanopartículas de TiO_2 en función del pH para dos fuerzas iónicas.

Este comportamiento también se observa en las representaciones de diámetros hidrodinámicos y los potenciales zeta de las muestras. En estos últimos, se observa el efecto de la fuerza iónica sobre las cargas superficiales de las muestras y su apantallamiento. Los resultados para una fuerza iónica mayor se muestran mucho menores en valor absoluto respecto al caso de 0.001M. En la determinación de los diámetros hidrodinámicos, se observa que para los dos casos de fuerzas iónicas no se producen apenas variaciones a lo largo del rango de pH estudiado. Los tamaños siempre oscilan entre 300 y 400 nm, sin cambios significativos. Estos resultados parecen indicar que el factor de la fuerza iónica tiene mucha relevancia en cuanto a los procesos de adsorción, pero no para la estabilidad coloidal en tamaños de agregación. Representan el mismo caso que en la isoterma entre ZnO NPs y la BSA a una concentración de 100 mg/L de ambos compuestos. En él tampoco se producían variaciones a lo largo del pH, puesto que tanto en condiciones ácidas se favorecía la adsorción proteica y así se estabilizaban las nanopartículas, en condiciones básicas las propias repulsiones electrostáticas, al estar ambos componentes cargados negativamente, producían que no se dieran fenómenos de agregación. En estos casos ocurre exactamente lo mismo, indicando una supremacía de las variaciones de las cargas superficiales por el pH como factor determinante sobre la fuerza iónica del medio, tanto en la estabilidad de los coloides como en los procesos de adsorción. Filius et al (1997) ya observaron la relevancia del pH por encima de la fuerza iónica en su representación de isotermas para la adsorción de ciertos ácidos orgánicos en goethita.

- Isotherma de adsorción de HA en TiO_2 NPs

El objetivo es de nuevo comparar los fenómenos de adsorción en una isoterma para el caso de interacción entre nanopartículas de TiO_2 y ácido húmico (HA), entre dos casos a fuerzas iónicas distintas (0.1 y 0.001M) en un rango de pH que comprende de 4 a 10. Las concentraciones tanto de nanopartículas como de HA son fijas para todas las muestras, de 100 mg/L. El procedimiento de medida y el ajuste de pH son similares al caso anterior, la isoterma de BSA en TiO_2 NPs. En ambas fuerzas iónicas se emplean blancos, sin NPs, para la corrección de los datos por posibles pérdidas de analito durante la extracción de sobrenadante tras centrifugación.

ISOTERMA TiO ₂ - HA				
Muestra	Muestra (Fuerza iónica)	Vol NaOH 0.1M (μl)	Vol HNO ₃ 0.1M (μl)	pH final
TiO ₂ – HA #1	0,001M	-	50	4,55
TiO ₂ – HA #2	0,001M	-	35	5,10
TiO ₂ – HA #3	0,001M	-	15	6,01
TiO ₂ – HA #4	0,001M	-	5	6,50
TiO ₂ – HA #5	0,001M	10	-	6,80
TiO ₂ – HA #6	0,001M	20	-	7,40
TiO ₂ – HA #7	0,001M	30	-	7,95
TiO ₂ – HA #8	0,001M	80	-	9,85
TiO ₂ – HA #9	0,1M	-	50	4,20
TiO ₂ – HA #10	0,1M	-	35	4,61
TiO ₂ – HA #11	0,1M	-	25	4,93
TiO ₂ – HA #12	0,1M	-	20	5,08
TiO ₂ – HA #13	0,1M	-	10	5,67
TiO ₂ – HA #14	0,1M	-	10	6,22
TiO ₂ – HA #15	0,1M	-	-	6,62
TiO ₂ – HA #16	0,1M	10	-	7,24
TiO ₂ – HA #17	0,1M	40	-	8,63
TiO ₂ – HA #18	0,1M	60	-	9,48

Figura 56.. Tabla recopilatoria de muestras para la isoterma de adsorción de HA en TiO₂ NPs.

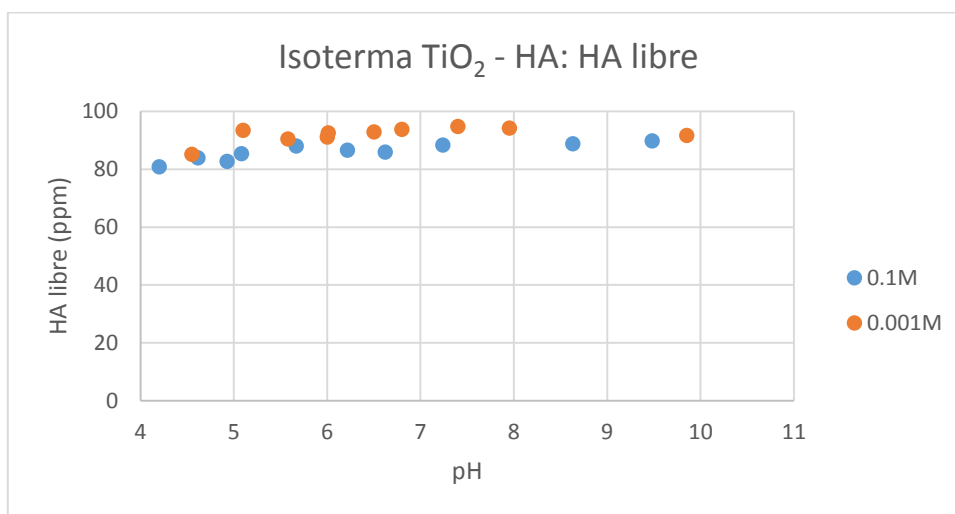
Tras su medida final de pH y extracción del sobrenadante donde se encuentre la fracción de HA libre de adsorción con la nanopartícula, se procede a sus medidas para el carbono orgánico no purgable. Los resultados se muestran en función de concentraciones de la HA libre y la adsorbida, así como la total en la solución teniendo en cuenta los volúmenes tras las adiciones de ácido o base para el ajuste de su pH. Además, se calcula la cantidad de HA adsorbida en función de la cantidad de nanopartículas presente en la muestra.

Resultados Isoterma TiO ₂ - HA						
Muestra	pH	Conc HA libre (ppm)	Conc HA ads (ppm)	Conc HA total (ppm)	Conc TiO ₂ NPs (ppm)	q (g HA ads/g TiO ₂)
0,001	4,55	89,56	9,19	98,76	102,20	0,09
0,001	5,10	98,33	1,77	100,10	101,24	0,02
0,001	6,01	97,40	1,25	98,65	101,06	0,01
0,001	6,50	97,72	1,69	99,41	100,61	0,02
0,001	6,80	98,63	1,13	99,76	101,10	0,01
0,001	7,40	99,67	0,09	99,76	101,63	0,00
0,001	7,95	98,92	0,00	98,92	100,81	0,00
0,001	9,85	96,45	0,69	97,14	100,54	0,01
0,1	4,20	87,88	11,38	99,26	101,81	0,11
0,1	4,62	91,32	7,76	99,08	101,54	0,08
0,1	4,93	90,00	9,86	99,85	102,09	0,10
0,1	5,08	92,79	6,24	99,04	107,86	0,06
0,1	5,67	95,72	4,40	100,12	101,40	0,04
0,1	6,22	94,20	4,91	99,11	101,50	0,05
0,1	6,62	93,38	4,63	98,01	102,03	0,05

0,1	7,24	96,07	4,24	100,31	96,33	0,04
0,1	8,63	96,60	2,25	98,86	99,23	0,02
0,1	9,48	97,59	0,54	98,14	98,68	0,01

Figura 57. Resultados de isoterma de adsorción de HA en nanopartículas de TiO_2 , mostrando los resultados en forma de concentración de HA libre, adsorbida y en función de las cantidades de nanopartícula en cada muestra.

Se observa en los resultados que las diferencias entre las fuerzas iónicas son muy pequeñas. Se observa gráficamente que las tendencias (figura 58) son de incremento de las cantidades de BSA libres, sin interacción con las nanopartículas, conforme aumenta el pH de estudio. Las cantidades libres son ligeramente superiores cuando la fuerza iónica es mayor, del mismo modo que ocurriera en el estudio con BSA. Las cantidades adsorbidas son muy pequeñas, incluso menores que en el caso de la BSA (figura 54), cuyo máximo corresponde con la condición más ácida, con una concentración de HA de unos 10 ppm en ambos casos, lo que corresponde con un 10% del total de HA presente inicialmente en la muestra. En los pH's más básicos (9-10) los valores son mínimos llegando incluso al valor de cero para una fuerza iónica de 0.001M. Una vez más, se observa que cuando las condiciones son más ácidas se favorece el proceso de adsorción, mientras que conforme aumenta el pH del medio los ratios disminuyen hasta que no se produce interacción. Estudios como los de Weng et al (2006) y (2007) corroboran estos comportamientos de adsorción respecto al pH del medio. El estudio de Weng et al (2006) observa la misma relación respecto a la influencia del pH para otro tipo de materia orgánica natural, los ácidos fúlvicos, en su representación de isotermas para su adsorción sobre goethita, mientras que en 2007 lo hace para ácido húmico. En ambos los valores mínimos son observados en torno a pH 10.



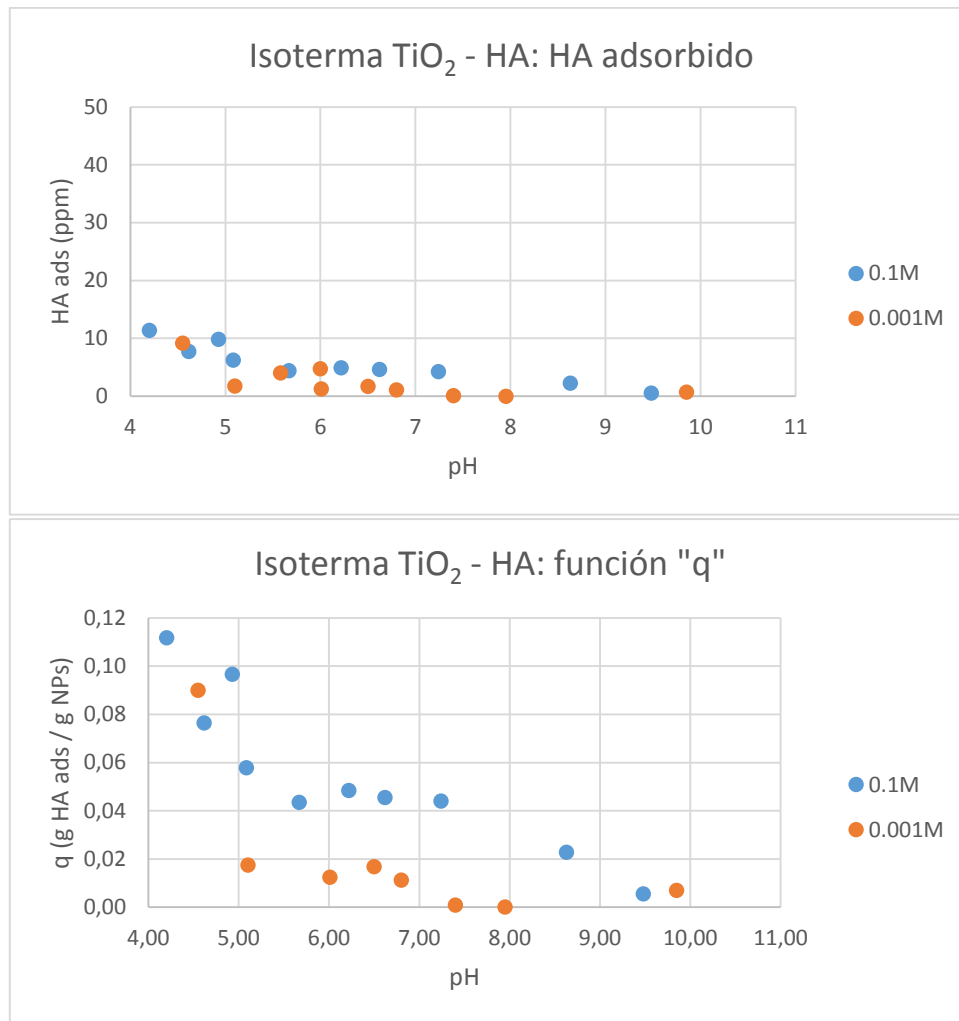


Figura 58. Representaciones de los resultados de la isoterma de adsorción de HA en TiO_2 NPs, en función de la cantidad de HA libre, adsorbida y adsorbida en función de las cantidades de NPs en las muestras, para los dos casos de estudio de diferentes fuerzas iónicas.

Si se representan los resultados de las cantidades de HA adsorbidas en función de las cantidades de nanopartícula añadida, sí que se observan mejor las sutiles diferencias entre una fuerza iónica frente a la otra. En el caso de mayor fuerza iónica se muestran para todos los pH, a excepción de las condiciones más básicas, unos valores superiores frente al caso de 0.001M. Este comportamiento no se producía para la BSA con el mismo tipo de nanopartícula, donde se mostraba que en condiciones ácidas tenían unos mejores ratios de adsorción cuanto menor fuera la fuerza iónica y viceversa cuando se aumentaba el pH. En este caso la diferencia puede ser que al tratarse de otro tipo de materia orgánica con la que interactúa, por su propia naturaleza y estructura morfológica (Zara et al, 2006), el proceso de adsorción sea peor que con BSA. Además en las mismas condiciones de pH el ácido húmico presenta una carga mucho más negativa que la proteína, como se muestra en la figura 22 con la comparación de datos de potenciales zeta entre Mohd Omar et al (2014) y Sasidharan et al (2013). Esta mayor carga neta puede dificultar la adsorción puesto que aunque en pH 5, la nanopartícula de TiO_2 presenta una carga positiva, siendo demasiado grande respecto a la del coloide. Por ello los resultados de adsorción son de por sí muy bajos, incluso respecto a los de BSA, aun en condiciones ácidas, cuando se ve más favorecido el proceso por atracción de las cargas. Conforme aumenta el pH, la interacción se ve menos favorecida puesto que la carga de ambos componentes es más negativa, produciendo unos ratios de adsorción mínimos o nulos en caso de pH 10. En cambio,

si la fuerza iónica es mayor (0.1M) el apantallamiento de las cargas produce una disminución de la relevancia de las mismas para la interacción, puesto que la barrera energética entre ambas es menor. Por ello los ratios de adsorción son mayores aunque también sufran descensos cuando aumenta el pH. En este caso, donde la adsorción es escasa, un factor como la fuerza iónica puede aumentar de forma relativa la interacción de materia orgánica con las nanopartículas de dióxido de titanio, aunque esté principalmente influenciado por el pH del medio. La relación de dependencia entre HA con nanopartículas tanto de ZnO como de TiO₂ fue estudiada por Yang et al (2009), comprobando la misma relación que en este trabajo se muestra. El estudio determina que el proceso de adsorción esta principalmente determinado por atracciones electrostáticas y por intercambios de ligandos.

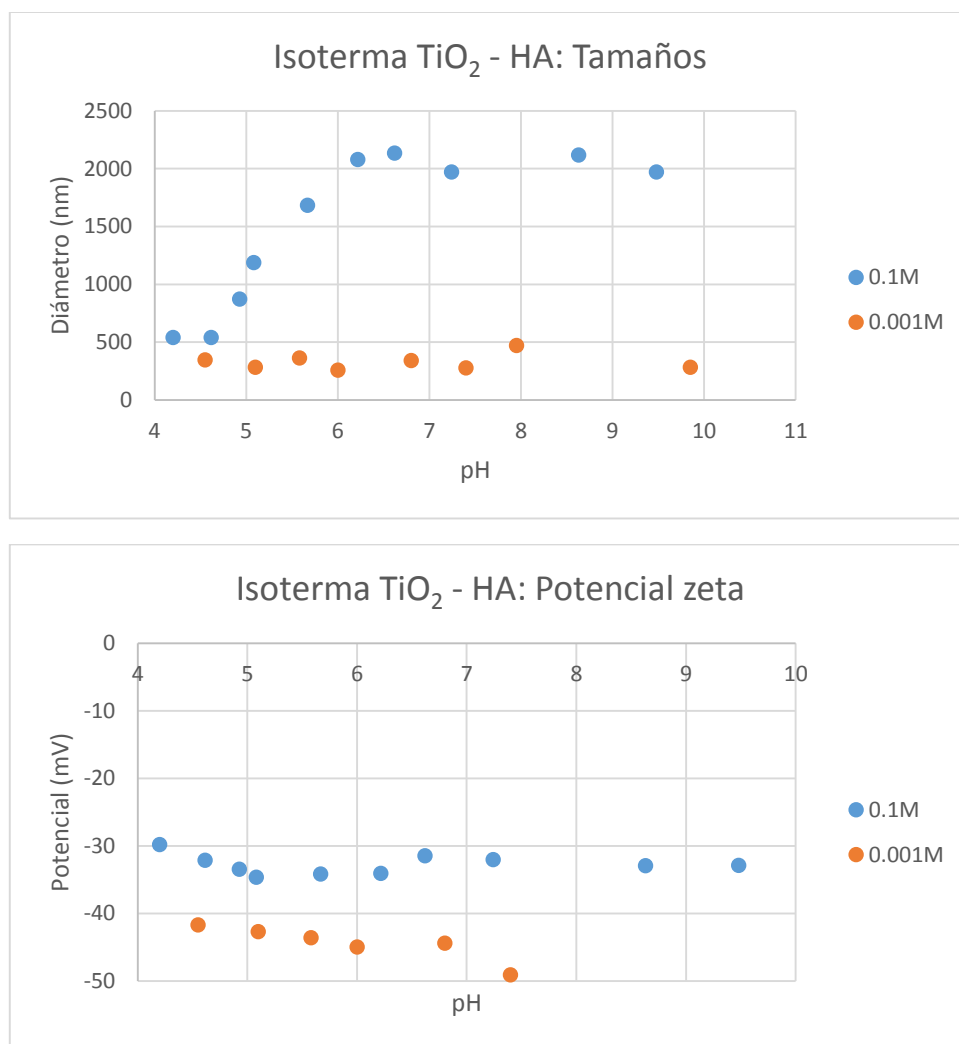


Figura 59. Representación de tamaños y potenciales zeta de las muestras de la isoterma de adsorción de HA en TiO₂ NPs en función del pH del medio.

Observando los resultados de los potenciales zeta para las muestras de la isoterma, se comprueba que las cargas netas son más negativas por parte del HA que en el caso de la BSA (figura 55). Este fenómeno se observa no solo para una fuerza iónica baja, como el caso de 0.001M, sino que incluso cuando hay una fuerza iónica considerable (0.1M) las diferencias son aún mayores. Con la BSA las muestras presentaban valores alrededor de -15 mV, con el HA presentan el doble de carga neta. Esto puede influir como se ha visto en las interacciones entre materia orgánica y nanopartícula al aumentar las repulsiones entre componentes e impedir su adsorción. En cuanto al estudio de diámetros hidrodinámicos para analizar si hay agregados, se

observan dos tendencias muy diferentes en función de la fuerza iónica empleada. En el caso de la fuerza iónica de 0.001M, se muestran unos valores constantes por debajo de 500 nm a lo largo de todo el rango de pH estudiado. Pese a que hay unos valores de potencial zeta muy negativos, se muestra que siempre hay estabilidad coloidal. Este hecho ya fue observado por Yang et al (2009), puesto que la adsorción de HA provoca unos descensos en los potenciales zeta de las coronas formadas, indicando que éstas serán más fácilmente dispersadas y suspendidas que si no hubiera recubrimientos, puesto que aumentan sus repulsiones electrostáticas. La interacción para la formación de recubrimientos con materia orgánica no parece ser un proceso influenciado por un apantallamiento de las cargas ante una fuerza iónica tan baja, sino que dependerá más del pH. En condiciones ácidas, la propia atracción debida a la naturaleza contraria de las cargas de uno y otro componente produce un favorecimiento de la adsorción, que de esta manera produce su estabilidad al impedir que se agregue con otras partículas. Cuando el pH aumenta, las cargas son más negativas, hasta un punto en que puede no producirse interacción entre HA y NP, como se ha visto en los resultados de las isothermas. Illés & Tombácz (2006) muestran también esta relación entre cantidades de adsorción de HA pero con nanopartículas de magnetita en función del pH. No obstante, debido a que son tan negativas las cargas superficiales tampoco se producen fenómenos de agregación entre partículas. Si la fuerza iónica del medio aumenta hasta 0.1M, la principal variación consiste en el apantallamiento de las cargas que antes dominaban el proceso de estabilidad coloidal. En tal caso la propia situación de estabilidad estará determinada por si se produce interacción entre el ácido húmico con la nanopartícula. En condiciones ácidas ya se ha observado que está favorecido por el carácter opuesto de sus cargas, aunque conforme se aumenta la basicidad del medio las cargas son negativas en ambos componentes, luego ya no se favorece este proceso de adsorción, y ante un apantallamiento tan grande de las cargas, se fomenta que se produzca la agregación entre partículas por encima de la adsorción con HA. En este caso, donde la naturaleza de la MO ha cambiado respecto a la BSA, al ser más electronegativa, sí que parece tener un rol clave la fuerza iónica, puesto que cuando no se produzca la formación de coronas por el pH del medio se verán incrementados los procesos de agregación entre partículas.

CONCLUSIONES

Estabilidad coloidal

En la estabilidad coloidal, parece afectar más la acción de la fuerza iónica del medio que la del propio pH del sistema. Su efecto se basa en un apantallamiento de las cargas superficiales de las nanopartículas, que conlleva una reducción de la situación de estabilidad de los coloides.

Se demuestra una estabilización en los diámetros hidrodinámicos cuando hay interacción de HA o BSA con la nanopartícula. Cuando la fuerza iónica del medio es alta, parece tener una gran influencia para inhibir procesos de agregación. No obstante, cuando las fuerzas iónicas son bajas las situaciones de estabilidad suelen darse tanto con presencia de BSA como sin ella.

Para comprender el efecto que el pH puede tener en la estabilidad coloidal de un sistema es importante la consideración del punto isoeléctrico. Debido a que la interacción de la MO produce cambios en las cargas superficiales de las nanopartículas, el punto isoeléctrico de las coronas formadas también varía. En función del pH las cargas de ambos componentes cambian, y aunque se produzcan los recubrimientos esto no es sinónimo de estabilidad si se encuentran cerca del punto isoeléctrico.

La concentración de MO en el medio respecto de la de los coloides sí que puede influir en su comportamiento, puesto que esta relación determinará la cantidad de centros activos libres que quedarán en la superficie de las nanopartículas. Aunque este proceso también este limitado por otros factores del medio.

Las concentraciones de los componentes como la BSA o HA, las nanopartículas o la presencia de electrolito son relevantes para el estudio de la estabilidad coloidal. No obstante, el orden de interacción entre compontes puede determinar el comportamiento de las nanopartículas al establecerse diferentes tiempos de actuación. La interacción MO con la nanopartícula para formar los recubrimientos parece necesitar de mayor cantidad de tiempo que la que precisa la fuerza iónica del medio para apantallar las cargas de los componentes.

Adsorción de MO sobre NPs

Se observa en las isothermas que el principal factor que influye sobre la adsorción es el pH del medio, por encima de la fuerza iónica o la concentración de MO. Las relaciones entre las cargas superficiales determinan los ratios de cantidades de MO adsorbida sobre la superficie de las nanopartículas. No obstante, esto no asegura la estabilidad del sistema coloidal, donde otros factores como la fuerza iónica sí que mostrarán su influencia en los fenómenos de agregación por su acción en el apantallamiento de las cargas superficiales.

Conforme aumenta la basicidad del medio, la carga neta de las nanopartículas y de la propia MO es cada vez más negativa, lo que provoca un aumento de las repulsiones electrostáticas.

En todas las isothermas realizadas se observa que la adsorción se ve favorecida contra más ácidas sean las condiciones, disminuyendo los ratios de cantidades adsorbidas por cantidad de nanopartícula conforme aumenta el pH del medio. Los ratios de adsorción mínimos se encuentran en las condiciones más básicas, llegando en muchas ocasiones a inhibirse el proceso en su totalidad. La explicación se basa en la relación de las cargas superficiales entre MO y NPs.

La mayor o menor concentración de MO en el medio no es indicativo de unos mayores ratios de cantidades adsorbidas en NPs. Sí parece que en última instancia la propia naturaleza de la materia orgánica determinará si se produce una mejor interacción entre MO y NPs, aunque siempre limitado por otras condiciones del medio como el pH o la fuerza iónica.

BIBLIOGRAFÍA

1. V. Aruoja, H. Dubourguier, K. Kasemets, A. Kahru, Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Sci. Total Environ.* **407**, 1461-1468 (2009).
2. M. Baalousha, Aggregation and disaggregation of iron oxide nanoparticles: influence of particle concentration, pH and natural organic matter. *Sci. Total Environ.* **407**, 2093-2101 (2009).
3. A. M. E. Badawy *et al.*, Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 1260-1266 (2010).
4. J. M. Berg, A. Romoser, N. Banerjee, R. Zebda, C. M. Sayes, The relationship between pH and zeta potential of ~ 30 nm metal oxide nanoparticle suspensions relevant to in vitro toxicological evaluations. *Nanotoxicology.* **3**, 276-283 (2009).
5. S. Bian, I. A. Mudunkotuwa, T. Rupasinghe, V. H. Grassian, Aggregation and dissolution of 4 nm ZnO nanoparticles in aqueous environments: influence of pH, ionic strength, size, and adsorption of humic acid. *Langmuir.* **27**, 6059-6068 (2011).
6. I. Blinova, A. Ivask, M. Heinlaan, M. Mortimer, A. Kahru, Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. *Environmental Pollution.* **158**, 41-47 (2010).
7. S. H. Brewer, W. R. Glomm, M. C. Johnson, M. K. Knag, S. Franzen, Probing BSA binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces. *Langmuir.* **21**, 9303-9307 (2005).
8. J. O. Carneiro *et al.*, The evaluation of the thermal behaviour of a mortar based brick masonry wall coated with TiO₂ nanoparticles: An experimental assessment towards energy efficient buildings. *Energy Build.* **81**, 1-8 (2014).
9. C. A. David *et al.*, Dissolution Kinetics and Solubility of ZnO Nanoparticles Followed by AGNES. *J. Phys. Chem. C.* **116**, 11758-11767 (2012).
10. J. D. Filius, T. Hiemstra, W. H. Van Riemsdijk, Adsorption of small weak organic acids on goethite: Modeling of mechanisms. *J. Colloid Interface Sci.* **195**, 368-380 (1997).
11. A. P. Gondikas *et al.*, Release of TiO₂ nanoparticles from sunscreens into surface waters: a one-year survey at the old Danube recreational Lake. *Environ. Sci. Technol.* **48**, 5415-5422 (2014).
12. A. Hajdú, E. Illés, E. Tombácz, I. Borbáth, Surface charging, polyanionic coating and colloid stability of magnetite nanoparticles. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects.* **347**, 104-108 (2009).
13. Y. Han *et al.*, Aggregation and dissolution of ZnO nanoparticles synthesized by different methods: Influence of ionic strength and humic acid. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects.* **451**, 7-15 (2014).
14. J. Hu *et al.*, Effect of dissolved organic matter on the stability of magnetite nanoparticles under different pH and ionic strength conditions. *Sci. Total Environ.* **408**, 3477-3489 (2010).
15. J. Hu *et al.*, Effect of dissolved organic matter on the stability of magnetite nanoparticles under different pH and ionic strength conditions. *Sci. Total Environ.* **408**, 3477-3489 (2010).
16. M. Hull, D. Bowman, Nanotechnology environmental health and safety. *Risks, Regulation and Management.* (2009).

17. E. Illés, E. Tombácz, The effect of humic acid adsorption on pH-dependent surface charging and aggregation of magnetite nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **295**, 115-123 (2006).
18. E. Illés, E. Tombácz, The role of variable surface charge and surface complexation in the adsorption of humic acid on magnetite. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects.* **230**, 99-109 (2003).
19. X. Jiang, M. Tong, H. Li, K. Yang, Deposition kinetics of zinc oxide nanoparticles on natural organic matter coated silica surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **350**, 427-434 (2010).
20. T. Kopac, K. Bozgeyik, Effect of surface area enhancement on the adsorption of bovine serum albumin onto titanium dioxide. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* **76**, 265-271 (2010).
21. T. Kopac, K. Bozgeyik, J. Yener, Effect of pH and temperature on the adsorption of bovine serum albumin onto titanium dioxide. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects.* **322**, 19-28 (2008).
22. J. R. Lead, E. Valsami-Jones, *Nanoscience and the Environment* (Elsevier, , 2014).
23. M. Li *et al.*, Stability, bioavailability, and bacterial toxicity of ZnO and iron-doped ZnO nanoparticles in aquatic media. *Environ. Sci. Technol.* **45**, 755-761 (2010).
24. M. Li, D. Lin, L. Zhu, Effects of water chemistry on the dissolution of ZnO nanoparticles and their toxicity to Escherichia coli. *Environmental Pollution.* **173**, 97-102 (2013).
25. F. Loosli, S. Stoll, Adsorption of TiO₂ nanoparticles at the surface of micron-sized latex particles. pH and concentration effects on suspension stability. *Journal of Colloid Science and Biotechnology.* **1**, 113-121 (2012).
26. G. V. Lowry, K. B. Gregory, S. C. Apte, J. R. Lead, Transformations of nanomaterials in the environment. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 6893-6899 (2012).
27. H. Ma, P. L. Williams, S. A. Diamond, Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles—a review. *Environmental Pollution.* **172**, 76-85 (2013).
28. S. M. Majedi, B. C. Kelly, H. K. Lee, Role of combinatorial environmental factors in the behavior and fate of ZnO nanoparticles in aqueous systems: A multiparametric analysis. *J. Hazard. Mater.* **264**, 370-379 (2014).
29. A. A. Markus, J. R. Parsons, E. W. M. Roex, P. de Voogt, R. W. P. M. Laane, Modeling aggregation and sedimentation of nanoparticles in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* **506–507**, 323-329 (2015).
30. F. Mohd Omar, H. Abdul Aziz, S. Stoll, Aggregation and disaggregation of ZnO nanoparticles: Influence of pH and adsorption of Suwannee River humic acid. *Sci. Total Environ.* **468–469**, 195-201 (2014).
31. Q. Mu *et al.*, Systematic Investigation of the Physicochemical Factors That Contribute to the Toxicity of ZnO Nanoparticles. *Chem. Res. Toxicol.* **27**, 558-567 (2014).
32. I. A. Mudunkotuwa, T. Rupasinghe, C. -. Wu, V. H. Grassian, Dissolution of ZnO nanoparticles at circumneutral pH: A study of size effects in the presence and absence of citric acid. *Langmuir.* **28**, 396-403 (2012).
33. Z. Peng, K. Hidajat, M. Uddin, Adsorption of bovine serum albumin on nanosized magnetic particles. *J. Colloid Interface Sci.* **271**, 277-283 (2004).

34. A. Ravindran, A. Singh, A. M. Raichur, N. Chandrasekaran, A. Mukherjee, Studies on interaction of colloidal Ag nanoparticles with bovine serum albumin (BSA). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **76**, 32-37 (2010).
35. G. Trefalt, M. Borkovec, Overview of DLVO Theory. (2014).
36. C. Tso *et al.*, Stability of metal oxide nanoparticles in aqueous solutions. (2010).
37. D. T. H. Wassell, G. Embery, Adsorption of bovine serum albumin on to titanium powder. *Biomaterials*. **17**, 859-864 (1996).
38. L. Weng, W. H. Van Riemsdijk, T. Hiemstra, Adsorption of humic acids onto goethite: Effects of molar mass, pH and ionic strength. *J. Colloid Interface Sci.* **314**, 107-118 (2007).
39. L. Weng, W. H. Van Riemsdijk, L. K. Koopal, T. Hiemstra, Ligand and charge distribution (LCD) model for the description of fulvic acid adsorption to goethite. *J. Colloid Interface Sci.* **302**, 442-457 (2006).
40. H. Xu, H. Jiang, Effects of cyanobacterial extracellular polymeric substances on the stability of ZnO nanoparticles in eutrophic shallow lakes. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*. **197**, 231-9 (2015).
41. K. Yang, D. Lin, B. Xing, Interactions of humic acid with nanosized inorganic oxides. *Langmuir*. **25**, 3571-3576 (2009).
42. K. Yang, B. Xing, Sorption of phenanthrene by humic acid-coated nanosized TiO₂ and ZnO. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 1845-1851 (2009).
43. L. F. Zara, A. H. Rosa, I. A. Toscano, J. C. Rocha, A structural conformation study of aquatic humic acid. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **17**, 1014-1019 (2006).
44. Y. Zhang, Y. Chen, P. Westerhoff, J. Crittenden, Impact of natural organic matter and divalent cations on the stability of aqueous nanoparticles. *Water Res.* **43**, 4249-4257 (2009).
45. X. Zhu *et al.*, Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. **43**, 278-284 (2008).
46. "Zetasizer Nano User Manual. Malvern Instruments". Man0317 issue 3.0 January 2007