



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

Detección de nanopartículas de óxido de zinc
en tejidos vegetales

Autor

Emilio Castro Otero

Director

Francisco Laborda García

Facultad de Ciencias

Año 2016

Índice

1	Introducción	4
1.1	Nanopartículas de óxido de zinc y plantas	4
1.2	Técnicas para la detección de nanopartículas de óxido de zinc en muestras medioambientales complejas	10
1.2.1	Preparación de las muestras	11
1.2.1.1	Digestión.....	12
1.2.1.2	Ultrafiltración	12
1.2.1.3	Centrifugación	13
1.2.2	Técnicas de detección	13
1.2.2.1	Dispersión de luz dinámica.....	14
1.2.2.2	Espectroscopia de absorción UV-Vis	14
1.2.2.3	Espectrometría de absorción atómica en llama.....	15
1.2.2.4	Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo.....	15
1.2.2.5	Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo en modo de detección de partículas individuales (SP-ICP-MS).....	16
2	Objetivos	19
3	Experimental	20
3.1	Instrumentación y materiales	20
3.1.1	Instrumentos	20
3.1.2	Nanopartículas de óxido de zinc	20
3.1.2.1	Io-li-tec Nanomaterials.....	20
3.1.2.2	Sigma-40.....	21
3.1.2.3	Sigma-100.....	21

3.1.3	Muestras vegetales	22
3.1.4	Macerozima R-10	22
3.1.5	Reactivos	23
3.2	Preparación de las muestras	23
3.2.1	Digestión ácida de suspensiones de nanopartículas de ZnO	23
3.2.2	Digestión enzimática de muestras vegetales	24
3.3	Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS).....	24
3.3.1	Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo en modo de partículas individuales (SP-ICP-MS).....	24
3.3.2	Límites de detección en tamaño y concentración de la técnica de detección para nanopartículas de óxido de zinc.....	26
3.3.3	Análisis de los datos experimentales	26
4	Resultados y discusión	27
4.1	Detección de nanopartículas de óxido de zinc en suspensión acuosa.....	27
4.1.1	Optimización de la dilución para incrementar la capacidad de detección de nanopartículas mediante SP-ICP-MS.....	27
4.2	Detección de nanopartículas de óxido de zinc en el medio de la digestión enzimática	29
4.2.1	Reproducibilidad del método de preparación de las muestras	30
4.2.2	Distribuciones de tamaño y agregación de las nanopartículas de óxido de zinc mediante DLS	31
4.3	Detección de nanopartículas de óxido de zinc añadidas a tejidos vegetales sometidos a digestión enzimática.....	33
5	Conclusiones	36
6	Bibliografía	38

1 Introducción

Las plantas actúan como una interfase crucial entre los seres humanos y el medio ambiente. El uso cada día más amplio de las nanopartículas (NP) ha levantado una preocupación cada vez mayor en su potencial impacto en la salud de los cultivos comestibles y en la seguridad alimentaria, surgiendo una rama muy activa de investigación en la actualidad en torno a la interacción de las nanopartículas con las plantas. Sin embargo, a día de hoy se desconoce o no están claros incluso aspectos básicos relativos al destino y características de las nanopartículas tras su internalización en las plantas, debido en gran medida a la falta de técnicas bien establecidas para la cuantificación de nanopartículas en tejidos vegetales¹.

1.1 Nanopartículas de óxido de zinc y plantas

La probabilidad de entrar en contacto una planta con nanopartículas se ha incrementado mucho en los últimos años con el aumento de la producción y uso de nanomateriales en gran variedad de bienes y productos de consumo. Los nanomateriales pueden alcanzar a las plantas por aplicación directa, emisión accidental, contaminación de suelos y sedimentos o precipitación atmosférica. Poco se sabe del impacto de los nanomateriales en los cultivos alimenticios y sus posibles efectos en la cadena alimentaria se desconocen. A día de hoy se han empezado a realizar algunos estudios sobre la toxicología de los nanomateriales en plantas de cultivo como la colza (*Brassica napus*), el rábano (*Raphanus sativus*), la lechuga (*Lactuca sativa*), el maíz (*Zea mays*) o el pepino (*Cucumis sativus*), entre otras².

El estudio de la internalización de las nanopartículas por las plantas es un campo de estudio muy reciente. La mayoría de los datos experimentales con los que se cuenta actualmente corresponden con estudios de la fase de germinación de las plantas, lo que proporciona una información muy limitada ya que tanto el sistema vascular como la raíz no están completamente desarrollados. Hay muy pocos artículos publicados que incluyan el ciclo de vida completo de las plantas³. De hecho, la discusión de los resultados en la literatura científica se orienta más en el efecto de las nanopartículas en

las plantas que en la cuantificación de las nanopartículas en los distintos tejidos biológicos de las plantas, pues los protocolos para su detección y medida no están todavía bien definidos. Entre los nanomateriales que más se estudiado su interacción con plantas nos encontramos al fullereno C₇₀, los nanotubos de carbono (CNT) y las nanopartículas de ZnO, TiO₂, CeO₂ y Fe₃O₄². Los estudios publicados muestran que la internalización, traslocación y bioacumulación de las nanopartículas depende mucho tanto de la especie de la planta como del tamaño, tipo, funcionalización, composición química y estabilidad de la nanopartícula. Mientras que entre los nanomateriales basados en carbono sólo se ha observado que el fullereno se bioacumule fácilmente en los tejidos vegetales de las plantas, casi todas las nanopartículas de óxidos de metálicos se han visto que entran y se acumulan en distinto grado en el interior de las plantas con las que interaccionan.

Se han propuesto varias vías para la entrada de nanopartículas en las células de las plantas. La pared celular de las plantas actúa como una barrera que impide la entrada de cualquier agente externo en las células de las plantas. Estas propiedades de actuar como tamiz están determinadas por el diámetro del poro de la pared celular que está comprendido entre 5 y 20 nm⁴. De tal manera que sólo las nanopartículas o sus agregados con dimensiones menores que los poros de la pared celular podrán atravesarla fácilmente y alcanzar la membrana plasmática.

También se puede producir internalización de las nanopartículas durante la endocitosis, gracias a la ayuda de una estructura en forma de cavidad que forma la membrana plasmática en torno a las nanopartículas, o embebidas en alguna de las proteínas que se encargan del transporte a través de la membrana o a través de los canales de transporte iónico. Ya en el citoplasma, las nanopartículas pueden interaccionar con los distintos orgánulos citoplasmáticos provocan interferencias en los procesos metabólicos⁴.

La germinación de las semillas y el crecimiento de la raíz de calabacín en cultivo hidropónico con nanopartículas de óxido de zinc no mostraron efectos negativos, mientras que en el cultivo de maíz las nanopartículas de óxido de zinc entre 15 y 25 nm inhibieron la germinación de las semillas. Tampoco se detectó esta inhibición en la germinación de las semillas de rábanos y colza regados con suspensiones de nanopartículas de óxido de zinc, debido probablemente a la selectividad de la permeabilidad del recubrimiento de las semillas. Cuando se cultivó centeno con

nanopartículas de óxido de zinc y Zn^{+2} iónico disuelto como nutrientes, se observó que a concentraciones altas ambos eran tóxicos para las plantas. Más los iones Zn^{+2} que las nanopartículas de ZnO, pero provocando en ambos casos la muerte de la plantas tras su amarillamiento⁴.

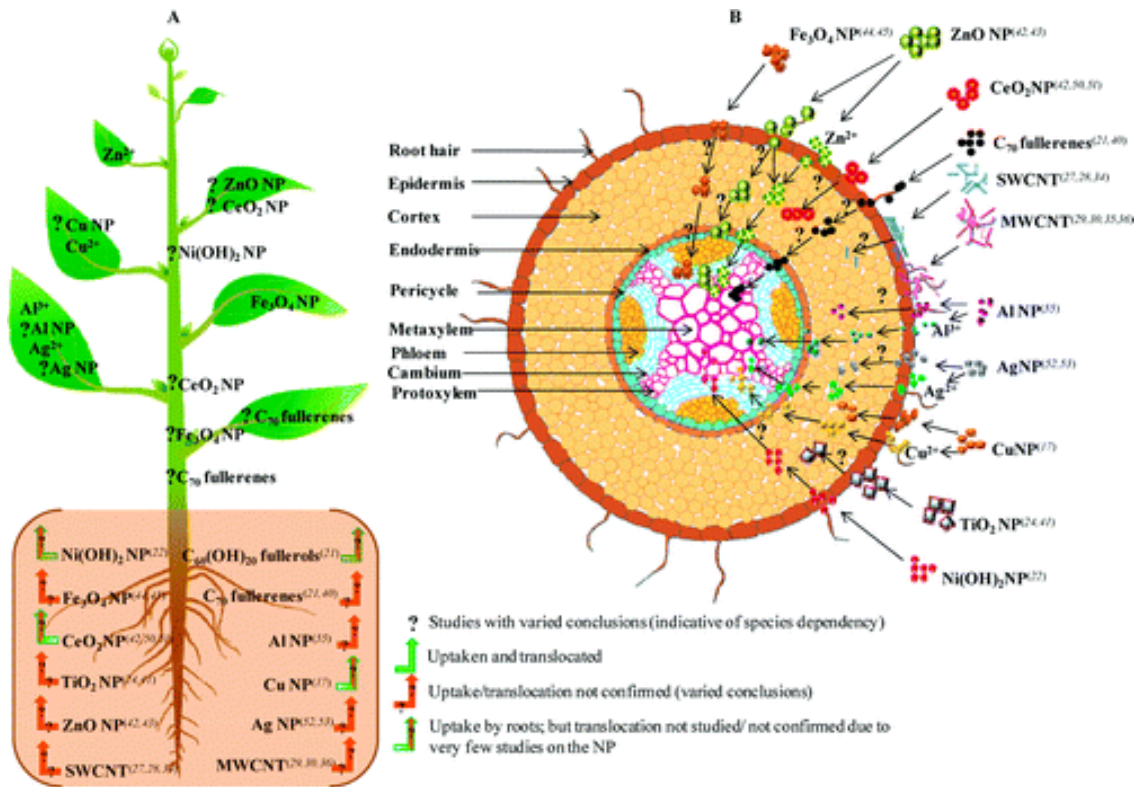


Figura 1. Vías de entrada, translocación y biotransformación de distintos tipos de nanopartículas en una planta: (A) Una planta que muestra la entrada selectiva y la translocación de los diversos tipos de nanopartículas y (B) sección transversal de la raíz de una planta mostrando las diferentes interacciones de las nanopartículas con la planta².

Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica muestran la internalización de las nanopartículas de ZnO y el daño que ésta causa en las células corticales y epidermales. Las lesiones que causan las nanopartículas de óxido de zinc en las células vasculares y endodermales inhiben el crecimiento de las plantas de centeno. Una vez dentro de la célula, de unas células a otras, las nanopartículas se transportan a través

delos plasmodesmos. En algunos casos se ha observado la formación de agregados de las nanopartículas que bloquean los poros y canales iónicos.

Al cultivar en semillero plantas de soja con suspensiones de nanopartículas de óxido de zinc de 8 nm de diámetro en un rango de concentraciones entre 500 y 4000 mg · L⁻¹, se vio que se producía una mayor internalización de las nanopartículas en las plantas a concentraciones bajas que altas, lo que se atribuyó a que a estas concentraciones las nanopartículas estarían menos agregadas. Cuando la concentración superaba los 1000 mg · L⁻¹, se comprobó que la probabilidad de formación de agregados aumentaba considerablemente, lo que dificultaba el paso de las nanopartículas (y sus agregados) a través de los poros de la pared celular de las plantas, reduciendo su internalización y bioacumulación en los distintos tejidos de la planta².El análisis mediante espectroscopia de absorción de rayos X de estos tejidos mostró la presencia de Zn⁺² en los tejidos vegetales estudiados, pero no así de nanopartículas de ZnO, aunque sí se detectó la presencia de ciertos acetatos y nitratos de zinc².Se piensa que las nanopartículas de óxido de zinc por disolución serán una fuente de este Zn⁺² detectado en los tejidos de las plantas por rayos X². Junto a los efectos en el crecimiento de las plantas cultivadas en semilleros, se ha asociado las nanopartículas de ZnO al aumento de vacuolas y colapso en las células corticales y a la contracción y muerte de células vasculares⁵.

Mediante microscopía electrónica de barrido se ha visto en las plantas de centeno cómo las nanopartículas de óxido de zinc están adsorbidas y agregadas en la superficie de las raíces de las plantas, hipotizándose que los exudados de estas raíces provoquen y favorezcan la disolución de las nanopartículas y se transformen en el zinc iónico disuelto que se detectó por rayos X dentro de las plantas.

Las imágenes de alta resolución obtenidas por microscopía electrónica de transmisión más recientemente sin embargo si muestran nanopartículas de óxido de zinc en los cortes transversales de las raíces de las plantas de centeno cultivados utilizando nanopartículas de óxido de zinc como nutriente, tanto en el apoplasto, como en el citoplasma, como en el núcleo de las células endodermales y del cilindro vascular.

Los resultados experimentales muestran que hasta concentraciones tan altas como 4000 mg · L⁻¹, las semillas de soja no se ven afectadas por el uso de nanopartículas de óxido de zinc como nutriente. Es más, se ha observado un aumento de la longitud de la raíz de las plantas de soja al cultivarlas en presencia de 500 mg · L⁻¹ de nanopartículas de óxido

de zinc (aunque este efecto positivo desaparece a concentraciones más altas). La explicación de este mayor crecimiento se atribuye al exceso de iones Zn^{+2} provocado por la disolución de las nanopartículas de ZnO o a la interacción de las nanopartículas de óxido de zinc con la superficie de las raíces de las plantas.

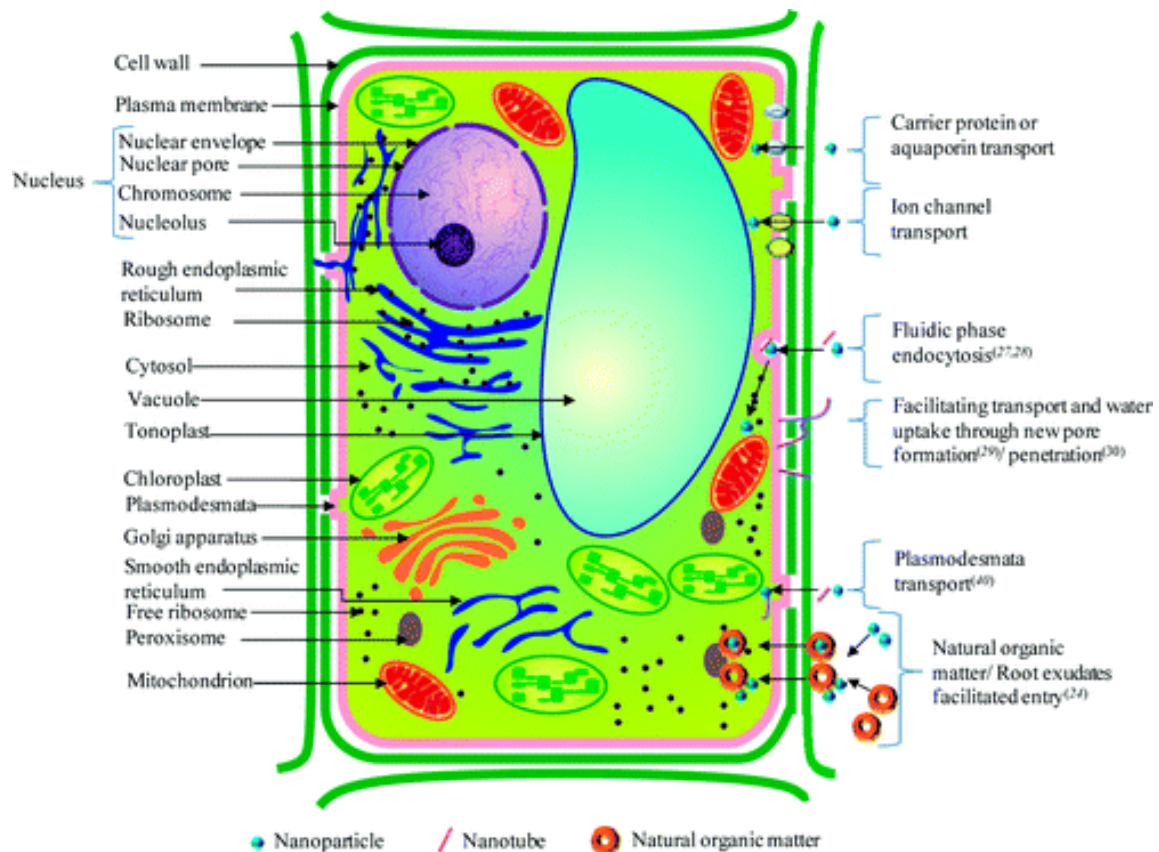
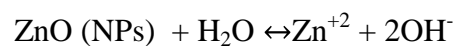


Figura 2. Modos más probables de entrada de las nanopartículas en las células vegetales².

A partir de la definición de nanomaterial como aquel material con al menos una dimensión comprendida entre 1 y 100 nm de tamaño, se define un nanofertilizante como aquel nanomaterial capaz de suministrar a la planta uno o varios nutrientes (tanto macro como micronutrientes) de tal manera que favorezca su crecimiento y el rendimiento de su cosecha⁶. En comparación con los fertilizantes convencionales, los nanofertilizantes se esperan que junto a aumentar significativamente las cosechas de las plantas cultivadas y su crecimiento, mejore la eficiencia en el uso de los fertilizantes, reduzca

las pérdidas de nutrientes en el suelo al no alcanzar todo el fertilizante aportado al suelo las plantas y minimizar el impacto medioambiental adverso del uso de los fertilizantes convencionales. Según los resultados de un estudio de 289 muestras de suelos de países de todo el mundo, la deficiencia de zinc y óxido de zinc es la que más ampliamente se detecta entre los micronutrientes y el cuarto nutriente limitante en el crecimiento de las plantas después del nitrógeno, fósforo y potasio⁷.

El uso de nanopartículas de óxido de zinc como nanofertilizantes pasa por su incorporación en el agua de riego aportada al terreno de cultivo de las plantas liberando los iones Zn^{+2} que son los que actúan como nutrientes de zinc para los vegetales a ser absorbidos como los nutrientes de los fertilizantes convencionales:



Debido al pequeño tamaño de las nanopartículas de óxido de zinc y a su gran área superficial, se espera que la velocidad de disolución del zinc sólido en zinc iónico sea muy superior y en un mayor grado que con el uso de sales de zinc solidas a las que recurren los fertilizantes convencionales.

Para el crecimiento saludable de las plantas hay nutrientes necesarios en grandes cantidades, por ello llamadas macronutrientes, como son el nitrógeno, fósforo o potasio, y otros sólo necesarios a nivel de elementos traza, llamados micronutrientes, entre ellos el zinc, pero también el hierro, el manganeso y el cobre, entre otros. Los micronutrientes se añaden por lo general a los fertilizantes compuestos que contienen los macronutrientes (N, P y K) en cantidades inferiores a $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y en forma de sales sólidas. La aplicación en forma de fertilizantes compuestos de los nutrientes a las plantas asegura su accesibilidad a las plantas para su correcto crecimiento y minimiza los riesgos medioambientales de su uso. Pero no siempre la cantidad de micronutrientes biodisponibles para las plantas en el suelo en que se cultivan al aplicar estos fertilizantes compuestos es suficiente, en concreto si el suelo tiene pH alcalino, poco contenido en materia orgánica o no está bien estructurado, la cantidad de micronutrientes que llegan a la planta puede ser bajo⁸. Si hablamos del zinc como micronutriente, la mayoría de las plantas no necesitan aplicar al terreno de cultivo una disolución acuosa que contenga menos de $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de zinc para su normal crecimiento, provocando niveles superiores de zinc en el terreno de cultivo y fitotoxicidad en las plantas cultivadas⁶.

Se ha observado como el empleo de las nanopartículas de óxido de zinc en bajas concentraciones como nanofertilizante incrementa el crecimiento tanto de las judías como de los garbanzos (*Cicer arietinum*) cultivados en semilleros. En la planta de judía que se obtuvo una mejor respuesta a una concentración de $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de las nanopartículas de óxido de zinc se llegó a observar un incremento de la longitud de las raíces de un 42% y de un 98% en la longitud del tallo con respecto a la planta control sin fertilizar con nanopartículas. Para las plantas de garbanzo, el uso como fertilizante de una concentración de nanopartículas de ZnO de tan sólo $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ produjo un aumento significativo en la longitud de las raíces (de un 53%) y algo menor del tallo (un 6%), comparados siempre con las plantas de control sin fertilizar con nanopartículas. Sin embargo, para ambas plantas se observa una disminución en las velocidades de crecimiento cuando se aplican concentraciones de nanopartículas de óxido de zinc como nanofertilizantes por encima de las concentraciones óptimas anteriores.

En un estudio en invernadero se observó que la aplicación al suelo de cultivo de pepinos de una concentración de nanopartículas de óxido de zinc entre 400 y $800 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ como nanofertilizante mejora sensiblemente su crecimiento. Los resultados muestran un incremento del peso seco de las raíces de las plantas de pepino frente al control de 1.6 veces, aumento que en el caso del peso seco de los frutos fue de un 6%. La aplicación de las nanopartículas de ZnO como nanofertilizante también produjo un aumento de almidón (1.6 veces), de glutelina (2 veces) y de zinc (2.5 veces) en los pepinos cosechados. También se ha probado los efectos del uso de nanopartículas de óxido de zinc con otras plantas, obteniéndose que una concentración de $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ también aumenta significativamente la longitud de las raíces de las plantas germinadas a partir de semillas de rábano y colza. Sin embargo, en todos los estudios realizados a concentraciones mucho mayores de nanopartículas de óxido de zinc en el fertilizante de las plantas (entre 400 y $2000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) se verifica una elevada fitotoxicidad para los cultivos⁶.

1.2 Técnicas para la detección de nanopartículas de óxido de zinc en muestras medioambientales complejas

La internalización de nanopartículas por las plantas comienza cuando las nanopartículas entran en contacto con la pared celular semipermeable de las plantas, que actúa como un tamiz con tamaño de poro nanométrico restringiendo selectivamente el paso de partículas foráneas a las células de las plantas.

A día de hoy los estudios de interacción de nanopartículas con plantas centrados en la fitotoxicidad y bioacumulación de nanopartículas en las plantas han precedido a los estudios más recientes de detección y cuantificación de nanopartículas en tejidos vegetales, siendo estos últimos de vital importancia en la gestión de riesgos medioambientales y alimentarios⁹.

El primer reto analítico que implica la investigación de nanomateriales en plantas recae en la detección de las nanopartículas en las matrices complejas que constituyen los tejidos vegetales de las plantas, y la medida posterior de sus características específicas, como son el tamaño de las nanopartículas, su concentración en número o su distribución de tamaños de partícula.

Para la detección de nanopartículas en tejidos vegetales se han explorado varias técnicas analíticas, como la espectroscopia Raman, la espectroscopia de absorción de rayos X o la microscopía electrónica de transmisión (TEM). Pero, desafortunadamente, todas estas técnicas cuentan con ciertas limitaciones de cara a este tipo de estudios. Así se ha encontrado que en estas espectroscopias la presencia de impurezas o la formación de complejos de las nanopartículas con la planta pueden enmascarar la firma característica de las nanopartículas y en microscopía se ha obtenido que al analizar una pequeña porción de tejido, no siempre los resultados obtenidos son representativos del conjunto de la planta¹.

1.2.1 Preparación de las muestras

El trabajo con muestras medioambientales complejas que contengan nanomateriales requiere un tratamiento previo al análisis mediante algún método que permita eliminar la matriz o separar las nanopartículas de ella.

1.2.1.1 Digestión

Con la digestión de muestras sólidas que contienen nanopartículas (como tejidos, alimentos, sedimentos o microorganismos) podemos conseguir tanto la disolución de las nanopartículas como la degradación de la matriz. En la digestión de matrices orgánicas se utilizan ácidos concentrados muy oxidantes, como el ácido nítrico, sólo o junto a peróxido de hidrógeno o ácido clorhídrico, empleando una placa calefactora u horno para calentar y a presión atmosférica o un horno microondas y a presiones mayores. En medio ácido, algunas nanopartículas se disuelven (como la plata y los óxidos de zinc o cobre)¹⁰. Por este motivo, se lleva a cabo una digestión ácida de las muestras que contienen las nanopartículas cuando el objetivo del análisis es determinar la concentración total del elemento en cuestión en la muestra.

Una alternativa a las digestiones ácidas es el uso de reactivos alcalinos. Así el hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) se usa para la degradación de matrices orgánicas con nanomateriales¹¹. También se emplean digestiones enzimáticas utilizando proteasas o pectinasas para solubilizar materiales biológicos mediante la degradación de las proteínas o la digestión de las paredes celulares de las plantas. De esta manera preservamos las nanopartículas inorgánicas en las muestras en su tratamiento previo al análisis, de tal manera que podremos detectarlas, cuantificarlas y caracterizarlas.

1.2.1.2 Ultrafiltración

La ultrafiltración (UF) se basa en el uso de membranas nanoporosas de distintos materiales y pesos moleculares de corte. Se han utilizado para separar el zinc disuelto de las nanopartículas de óxido de zinc en las suspensiones acuosas. Para forzar a atravesar la membrana a las especies con peso molecular por debajo del corte del filtro se utiliza la fuerza centrífuga. Existen comercialmente membranas con cortes en pesos moleculares de hasta 1000 Da que permiten separar especies de disueltas de nanopartículas tan pequeñas como 1 nm¹². Sin embargo, y aunque por ultrafiltración resulta relativamente sencillo separar las nanopartículas de óxido de zinc del zinc disuelto, no ocurre lo mismo con las nanopartículas primarias y sus agregados y

complejos, donde los resultados de la separación por ultrafiltración varían mucho en función de su peso molecular y tamaño. Por otra banda, hay que señalar que dependiendo de las nanopartículas de óxido de zinc y sus grupos funcionales superficiales la recuperación de nanopartículas por ultrafiltración es variable debido a la interacción de las nanopartículas con la membrana de los filtros.

1.2.1.3 Centrifugación

Alternativamente, también se puede usar la centrifugación como una técnica sencilla para separar y concentrar partículas en una suspensión acuosa. Las centrífugas con las que habitualmente se trabaja en laboratorio pueden separar partículas de hasta unos 500 nm de tamaño, mientras que por ultra-centrifugación podemos alcanzar a separar nanopartículas de hasta 1 nm de diámetro¹². Sin embargo para obtener buenas separaciones son necesarios tiempos muy largos y fuerzas centrífugas elevadas, con lo que no se considera la técnica de separación más eficiente.

1.2.2 Técnicas de detección

El segundo paso en el análisis de muestras medioambientales complejas es la detección de las nanopartículas inorgánicas que contienen. Para conseguir este objetivo las técnicas analíticas específicas para cada elemento, en el caso de las nanopartículas de óxido de zinc aquellas específicas al zinc, son la herramienta más valiosa. Hablando de técnicas de detección indirectas de nanopartículas, esto es, cuando detectamos las nanopartículas en suspensión acuosa tras su digestión ácida mediante espectroscopia de masas de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) o por espectroscopia de absorción atómica de llama (FAAS) perdemos información del tamaño de las nanopartículas o su estado de agregación tras el pretratamiento de las muestras. Aunque hay que tener presente que estas técnicas no permiten detectar la presencia de nanopartículas en la muestra, sino de los elementos que las componen, excepto en el caso de la detección de partículas individuales mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (SP-ICP-MS).

1.2.2.1 Dispersión de luz dinámica

De las distintas técnicas de dispersión de luz, la dispersión de luz dinámica (DLS) es la más empleada en la caracterización del tamaño de nanopartículas en suspensión acuosa. Mediante DLS se miden y monitorizan las fluctuaciones dinámicas de la intensidad de luz dispersada por las nanopartículas debidas al movimiento browniano, ajustándolas a una función de autocorrelación a partir de la cual podemos obtener un coeficiente de difusión de la nanopartícula. Y aplicando la ecuación de Stokes-Einstein se convierte ese coeficiente de difusión en un diámetro hidrodinámico equivalente de las nanopartículas¹³.

La dispersión de luz dinámica es más sensible a las partículas de mayor tamaño que a las más pequeñas, debido a que la intensidad de la luz dispersada depende de la sexta potencia del diámetro de la partícula. Esto le resta capacidad para resolver la presencia de distintas poblaciones de nanopartículas en las muestras medioambientales (caracterizadas por su polidispersidad). Además se necesita conocer el índice de refracción y la viscosidad de las muestras, dato que en el caso de muestras medioambientales complejas no siempre se dispone o se puede medir. A pesar de todas estas limitaciones que presenta la dispersión de luz dinámica en la caracterización de nanopartículas en muestras medioambientales complejas, se ha utilizado por considerarla una vía rápida y sencilla de monitorizar la agregación de las nanopartículas de óxido de zinc en suspensión acuosa.

1.2.2.2 Espectroscopia de absorción UV-Vis

El análisis mediante espectroscopia de absorción UV-Vis de las suspensiones acuosas de las nanopartículas de óxido de zinc tras sonicarlas muestra un máximo de absorción a una longitud de onda cercana a 380 nm. El ZnO es un material semiconductor con un ancho de banda de 3.2 eV, con lo que el pico de absorción teórico sería en una longitud de onda de 388 nm¹⁴.

1.2.2.3 Espectrometría de absorción atómica en llama

Para la determinación del contenido total en un metal como el zinc en una muestra que contenga nanopartículas de óxido de zinc en suspensión acuosa, las técnicas espectroscópicas atómicas son una buena opción. Aunque la espectroscopia de emisión óptica de acoplamiento de plasma inductivo (ICP-OES) ha sido la más usada por permitir una detección multielemental, nosotros elegimos la espectroscopia de absorción atómica en llama (FAAS) ya que lo que buscamos es un análisis monoelemental (del zinc elemental) en muestras formadas por suspensiones acuosas de nanopartículas de óxido de zinc. Se trata de una técnica de bajo coste, simple, robusta y precisa, aunque, en cambio, no tiene un límite de detección (LOD) muy bajo.

1.2.2.4 Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo

Tanto las técnicas de espectroscopia de absorción atómica por llama (FAAS) como la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo como fuente de ionización (ICP-MS) se han usado para la detección y cuantificación de la cantidad de zinc en las muestras que contienen nanopartículas de óxido de zinc. ICP-MS es la que más se ha empleado y con la que se han obtenido límites de detección más bajos (de hasta $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)¹¹. Hay que puntualizar que estas técnicas espectroscópicas aunque sensibles a la presencia de un elemento en las muestras que contienen nanopartículas no permiten obtener información sobre las características fisicoquímicas de ese elemento, esto es si está en forma de nanopartícula o disuelto, ni de las nanopartículas en sí (como su tamaño, agregación, etc.). Es por ello que la aplicación en la que se han utilizado básicamente ha consistido en determinar la concentración total elemental de zinc en las distintas muestras que contienen nanopartículas de óxido de zinc, de cara a estudiar la biodistribución y bioacumulación de las nanopartículas en los distintos tejidos vegetales de las plantas.

Las técnicas de ICP-MS requieren el uso de muestras en fase líquida, lo que hará necesario un pretratamiento de las muestras sólidas conteniendo nanopartículas de óxido

de zinc mediante una digestión de la matriz, como hemos visto, mientras que las suspensiones de las nanopartículas de óxido de zinc se pueden analizar directamente.

1.2.2.5 Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo en modo de detección de partículas individuales (SP-ICP-MS)

Las muestras se introducen en el equipo de ICP-MS como líquidos mediante el uso de un sistema de nebulización que produce un aerosol de gotas polidispersas. Una vez que las gotas del aerosol alcanzan el plasma, el disolvente se evapora y las partículas que resultan se volatilizan, se atomizan y después se ionizan. Los iones se extraen mediante una interface para introducirlos en el espectrómetro de masas, donde son separadas según su relación masa/carga y detectadas.

Las formas de un elemento que son solubles se distribuyen homogéneamente dentro de la disolución, y por lo tanto en las gotas del aerosol. Así es que el flujo del elemento que atraviesa el plasma y viaja hasta el detector como iones se puede considerar que es constante, produciendo una señal continua durante el periodo de tiempo de adquisición de datos. Por el contrario, si se nebuliza una suspensión de partículas, el elemento no se distribuye homogéneamente, estando presente sólo en las partículas discretas. Entonces, si se nebuliza en el plasma una suspensión de partículas suficientemente diluida, podemos detectar el paquete de iones generado por cada partícula individual.

Trabajando con el equipo en el rango de frecuencias de los kHz (esto es, con tiempos de medida en el rango de los milisegundos), los paquetes de iones se miden como pulsos. El tiempo total de adquisición de datos por cada muestra con el equipo de ICP-MS es de varios minutos, obteniéndose barridos con el tiempo, que consisten en un número de eventos registrados como señales transitorias o pulsos sobre una línea base continua. Mientras que la intensidad de cada evento se debe a los iones detectados de cada partícula, la línea base se debe a la señal de fondo correspondiente a la masa del isótopo del elemento monitorizado o a la presencia de formas disueltas del elemento medido. Los barridos de tiempo en bruto obtenidos se pueden procesar representando la intensidad frente a la frecuencia de las intensidades de los eventos, obteniéndose histogramas donde la primera distribución se debe a la señal de fondo y/o a la presencia

de formas disueltas del elemento medido y la segunda distribución es la propiamente debida a las partículas. Dado que el rango dinámico del SP-ICP-MS puede ampliarse hasta la región de los micrómetros, esto permite estudiar también con esta misma técnica tanto sistemas polidispersos como procesos de agregación¹¹.

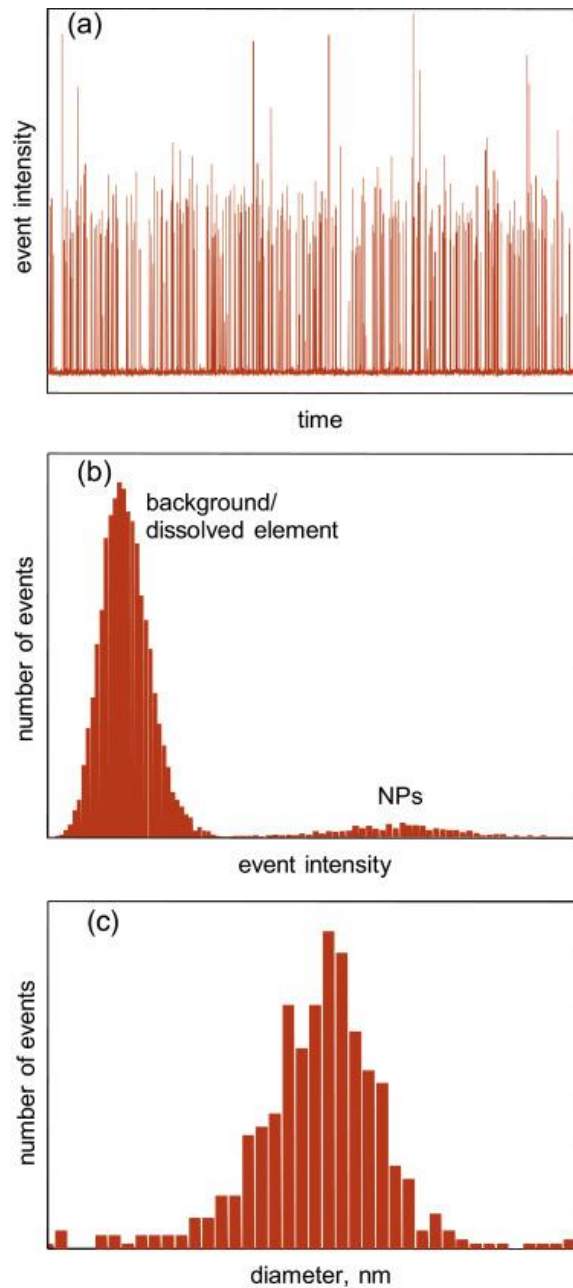


Figura 3. Barridos con el tiempo obtenidos con SP-ICP-MS para una suspensión de nanopartículas que contiene también el elemento que forma las nanopartículas disuelto (a), histograma de la frecuencia de las intensidades frente a la intensidad de los eventos que se obtiene al procesar los datos en bruto y (c) distribución de tamaños de partícula suponiendo nanopartículas sólidas, esféricas y puras que se calcula a partir de la segunda distribución de intensidades en el histograma anterior.

La suposición básica detrás de las medidas con espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo en modo de detección de partículas individuales consiste en suponer que cada evento registrado representa una partícula individual. Si esta suposición se cumple, entonces el número de eventos contados (n_P) durante el tiempo total de adquisición de datos (t_i) está directamente relacionado con la concentración en número de las partículas (C_P) mediante la siguiente ecuación¹⁵:

$$n_P = \eta_{neb} Q_{sam} t_i C_P \quad (2)$$

Donde η_{neb} es el rendimiento de nebulización y Q_{sam} el es caudal de introducción de la muestra. Por otro lado, la intensidad de cada evento (I_P) es proporcional al número de átomos del elemento monitorizado en cada partícula detectada, y por lo tanto a la masa del elemento por partícula (m_P) según la ecuación¹⁵:

$$I_P = K_{ICPMS} K_M m_P \quad (3)$$

Donde K_{ICPMS} es la eficiencia de detección, que representa la relación entre el número de iones detectados y el número de átomos introducidos en el ICP. $K_M (=AN_{Av}/M_M)$ es un factor relacionado con el elemento medido, donde A es la abundancia del isótopo monitorizado, N_{Av} es el número de Avogadro y M_M es el peso molecular del elemento. La *ecuación 3* puede a su vez relacionarse con el tamaño de las partículas si se conoce su composición, forma y densidad. Por ejemplo, en el caso de una nanopartícula esférica, homogénea y sólida, la *ecuación 3* se puede reescribir como¹⁵:

$$I_P = \frac{1}{6} \pi \rho X_P K_{ICPMS} K_M d^3 \quad (4)$$

Donde d es el diámetro, ρ es la densidad y X_P es la fracción en masa del elemento en la partícula.

Así en SP-ICP-MS, para cuantificar las concentraciones en número de las partículas en las muestras utilizamos la relación lineal entre el número de eventos y la concentración en número que nos da la *ecuación 2*, mientras que para obtener la masa del elemento por partícula o las distribuciones de tamaño es necesario recurrir a la proporcionalidad entre la intensidad de los eventos y la masa de analito por partícula que nos da la *ecuación 3* o la tercera potencia del diámetro de una partícula esférica, sólida y pura

como nos da la *ecuación 4*. Aunque la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo en modo de detección de partículas individuales presenta un gran potencial en el análisis de nanopartículas en muestras medioambientales, la presencia de especies disueltas del elemento monitorizado puede ocultar en buena medida o incluso imposibilitar la detección de las nanopartículas con esta técnica. Por otro lado, las propiedades físicas de las nanopartículas pueden provocar su incompleta vaporización en el ICP, lo que falsearía los resultados obtenidos¹¹.

2 Objetivos

El principal objetivo de este trabajo final de máster es la puesta a punto de una metodología analítica que permita detectar la presencia de nanopartículas de óxido de zinc en tejidos vegetales procedentes de plantas sometidas a tratamientos con dichas nanopartículas. El fin último de dichos análisis consiste en confirmar la asimilación de las nanopartículas a través de las raíces y su posible translocación a otras partes de las plantas.

Los objetivos específicos de este trabajo fueron:

- (1). Estudiar el comportamiento de las nanopartículas de óxido de zinc en suspensiones acuosas.
- (2). Aplicar un procedimiento de digestión enzimática para la extracción de nanopartículas de ZnO en tejidos vegetales.
- (3). Estudiar el efecto del proceso de digestión enzimática sobre las nanopartículas de óxido de zinc y su posible disolución.
- (4). Desarrollar un método de detección de las nanopartículas de óxido de zinc mediante detección de partículas individuales ICP-MS (SP-ICP-MS) en suspensiones procedentes de la digestión enzimática de tejidos vegetales.

3 Experimental

3.1 Instrumentación y materiales

3.1.1 Instrumentos

- Espectrómetro de masas de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) Elan DRC-e de Perkin Elmer.
- Equipo de dispersión de luz dinámica (DLS) 90 Plus de Brookhaven Instrument Corporation.
- Espectrómetro de absorción atómica en llama (FAAS) AAnalyst 200 de Perkin Elmer con una lámpara da cátodo hueco con una longitud de onda de excitación de 213.9 nm y una intensidad de corriente de 15 mA.
- Espectrofotómetro de absorción molecular (UV-Vis) V-730 de Jasco.

3.1.2 Nanopartículas de óxido de zinc

Los tres tipos de nanopartículas de óxido de zinc elegidas para este estudio se han elegido por cumplir la condición de tener una distribución de tamaño de partícula en el rango de la nanoescala (≤ 100 nm) y por tener un tamaño de nanopartícula primaria superior en todos los casos al límite de detección del SP-ICP-MS.

3.1.2.1 *Io-li-tec Nanomaterials*

Las primeras nanopartículas de óxido de zinc (Código de producto NO-0039-HP) se compraron a Io-li-tec Nanomaterials en forma de polvo blanco, con un tamaño promedio de nanopartícula entre 90 y 210 nm, un área superficial específica de entre 4.9 y 6.8 m²/g, una morfología irregular y una densidad de 5.606 g/cm³. La pureza de las nanopartículas es en todos los casos superior al 99.5%.

3.1.2.2 *Sigma-40*

Unas de las nanopartículas de óxido de zinc utilizadas se compraron en Sigma-Aldrich (Número de producto 721077) en forma de suspensión acuosa de apariencia blanquecina con una concentración en peso de 45.0-55.0 wt%, un tamaño de partícula determinado con dispersión de luz dinámica de ≤ 100 nm (tamaño medio ≤ 40 nm), un pH entre 6 y 8 y una densidad de 1.60-1.80 g/ml.

3.1.2.3 *Sigma-100*

Unas de las tres nanopartículas de óxido de zinc ensayadas se compraron a Sigma-Aldrich (Número de Producto 544906) en forma de polvo blanco, con un tamaño de partícula promedio ≤ 100 nm y un área superficial específica de entre 15 y 25 m²/g.

Entre las consideraciones más importantes a tener en cuenta sobre la estabilidad de las nanopartículas de óxido de zinc en suspensión acuosa están su disolución y agregación. Los principales factores que afectan la agregación y disolución de nanopartículas de óxido de zinc en agua incluyen la fuerza iónica, el pH y la presencia de materia orgánica en el sistema. Tanto fuerzas iónicas bajas como altos contenidos de materia orgánica están asociadas a una mayor estabilidad de las nanopartículas en suspensión acuosa¹⁶.

En el caso de nanopartículas de óxido de zinc en forma de polvo las suspensiones coloidales se prepararon pesando la masa con una balanza analítica y añadiendo agua ultrapura. Las nanopartículas adquiridas como una suspensión acuosa comercial se diluyeron directamente añadiendo agua ultrapura hasta alcanzar la concentración final. Todas las nanopartículas de óxido de zinc se sonicaron en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos para facilitar la formación de una suspensión homogénea y la reducción de la formación de agregados¹⁷. Las diluciones se prepararon frescas en el día en que se realizaron las medidas o se sometieron al proceso de digestión enzimática utilizando agua ultrapura.

3.1.3 Muestras vegetales

La presencia de nanomateriales en plantas comestibles es una vía clara a la que el público general se verá expuesto a este tipo de materiales. Varios estudios se han enfocado a nanopartículas metálicas (oro y plata principalmente) y de óxidos metálicos (CuO, ZnO y CeO₂ mayormente) en tejidos comestibles de distintos cultivos. La mayoría de estas investigaciones se centraron en tejidos vegetales de plantas cultivadas con partes aéreas comestibles (por ejemplo, las hojas de las lechugas o las espinacas), en frutos (como el tomate o el calabacín entre otras hortalizas) o en granos (maíz, arroz o cebada). Los resultados de los estudios en todas estas plantas muestran como en las raíces bajo tierra se acumulaban una concentración sensiblemente superior de nanopartículas que en las partes aéreas de las mismas. Esta tendencia se atribuye al pequeño tamaño de poro de la pared celular de las raíces de las plantas así como a su capacidad de actuar como un tamiz para atrapar las nanopartículas¹⁸.

Los tejidos vegetales de las plantas de tomate triturados, homogeneizados y liofilizados se suspendieron previamente a su puesta en disolución acuosa con un tampón de citrato de sodio 2 mM, ajustando el pH entre 3.5 y 7 tal y como recomienda el proveedor de la macerozima R-10 utilizada en la digestión enzimática. En las experiencias se analizaron cuatro tipos de tejido vegetal de las plantas de tomate: raíz, tallo, hojas y fruto. Las muestras fueron proporcionadas por el Grupo de Ecotoxicología y evaluación de riesgos ambientales del Departamento de Medio Ambiente del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).

3.1.4 Macerozima R-10

La macerozima R-10 (Número CAS 9032-75-1) de Duchefa Biochemie (Holanda) es una mezcla multicomponente de enzimas con una actividad enzimática total de más de 3000 unidades por gramo que contiene aproximadamente:

- 0.5 unidades/mg de Pectinasa
- 0.1 unidades/mg de Celulasa
- 0.25 unidades/mg de Hemicelulasa

La apariencia es de un polvo ámbar pálido que hay que almacenar en el frigorífico entre 2 y 8 °C, con un pH óptimo de funcionamiento entre 3.5 y 7 y con una densidad de 1.22 g/cm³.

3.1.5 Reactivos

- Ácido nítrico, HNO₃, concentrado (70%) de J.T. Baker.
- Citrato de sodio dihidratado de Sigma-Aldrich.

3.2 Preparación de las muestras

El análisis de nanopartículas en matrices complejas requieren un procedimiento de extracción de las nanopartículas de la matriz utilizando por ejemplo un ácido fuerte, un proceso que puede modificar químicamente las nanopartículas. Un problema que se puede solventar utilizando un método de digestión de la matriz empleando enzimas. Tanto en el caso de las nanopartículas de oro como de plata ya se ha reportado el uso de este método de digestión enzimática empleando la macerozima R-10 con éxito y sin que la distribución de tamaños de las nanopartículas se vea modificada tras deshacerse de la matriz vegetal¹⁹.

3.2.1 Digestión ácida de suspensiones de nanopartículas de ZnO

La digestión ácida de las suspensiones acuosas de nanopartículas de óxido de zinc se realizó bajo una campana extractora y utilizando un baño de arena en el que se sumergieron los recipientes abiertos de teflón (PTFE). Un volumen de 1 ml de la muestra se pesó directamente en el recipiente de teflón y se añadió 1 ml de ácido nítrico. La mezcla se calentó lentamente hasta alcanzar los 150°C se mantuvo a esta temperatura durante 1 hora hasta casi llegar a la sequedad. Pasada esta hora, se volvió a añadir nuevamente 1 ml de ácido nítrico manteniendo la temperatura de la placa calefactora durante 1 hora más, volviendo a llevarla casi a sequedad. Después se dejó

enfriar la mezcla en el recipiente hasta temperatura ambiente. Completada la digestión acida, los productos de la digestión se transfirieron a frascos volumétricos de plástico, completando el volumen con agua ultrapura. Las muestras se digirieron por duplicado.

3.2.2 Digestión enzimática de muestras vegetales

Tras la puesta en suspensión en 8 ml de las masas de tejido de las plantas de tomate en el tampón de citrato de sodio 2 mM (pH 6.5) y su homogenización, se le añadió 2 ml de una disolución de 25 g/L de la macerozima R-10. El tejido con las enzimas se dejaron digerir sometidos a una ligera agitación mecánica de 200 rpm durante 24 horas a 37°C dentro de una incubadora. Tras la digestión enzimática, las muestras se centrifugaron con un programa de 15 minutos a 9000 rpm y 20 °C, utilizando el sobrenadante de la centrifugación para su análisis mediante SP-ICP-MS previa dilución con agua ultrapura.

3.3 Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)

3.3.1 Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo en modo de partículas individuales (SP-ICP-MS)

La espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo básicamente utiliza un espectrómetro de masas para detectar la señal en forma de un pulso (esto es, no continua) generado por cada nanopartícula en el plasma. Una de las ventajas claves del uso de SP-ICP-MS incluye una elevada sensibilidad para las concentraciones de nanopartículas e iones relevantes medioambientalmente y la capacidad de adquirir simultáneamente datos de las nanopartículas de óxido de zinc (su tamaño, distribución de tamaños y concentraciones) y del zinc disuelto (su concentración)²⁰.

Todas las muestras se analizaron utilizando un espectrómetro de masas con plasma de acoplamiento inductivo Perkin Elmer Elan DRC-e en modo de detección de partículas individuales. Los parámetros instrumentales se optimizaron tanto para la detección de

las nanopartículas de óxido de zinc como para sus correspondientes iones disueltos. El equipo está equipado con un nebulizador concéntrico y una cámara ciclónica. La potencia de las radiofrecuencias se fijaron en 1200 W para garantizar la completa atomización de las nanopartículas. Algunos parámetros como el caudal de gas de nebulización (entre 1.02 y 1.06 mL/min) y el voltaje de la lente (entre 5.5 y 5.75 V) se optimizaban diariamente, mientras que otros se mantuvieron durante las medidas constantes, como el caudal de introducción (1.0mL/min) y el rendimiento de nebulización (entre 2.3 y 3.0 %). Los isótopos ^{64}Zn y ^{66}Zn se monitorizaron con un tiempo de medida de 5 ms durante un tiempo de adquisición de datos total de 60 s por isótopo, haciendo un total de 12000 medidas, y perdiéndose unos segundos (settling time) cuando pasamos de uno a otro. Se procesaron finalmente los datos para el isótopo ^{66}Zn para evitar la posible interferencia isobárica debida al isótopo minoritario $^{64}\text{Ni}^{21}$. Los parámetros instrumentales se optimizaron para tener una máxima sensibilidad para el isótopo $^{66}\text{Zn}^{22}$. Para determinar la eficiencia del transporte del equipo se utilizó un patrón de 60 nm de nanopartículas de oro. Este conjunto de parámetros analíticos de equipo de SP-ICP-MS, que recogemos en la *tabla 1*, se eligió y evaluó para trabajar con las nanopartículas de óxido de zinc. El instrumento se calibró con un blanco de agua milliQ y tres estándares de zinc disuelto (con concentraciones entre 10 y 100 $\mu\text{g/L}$). En la mayoría de los casos se encontró zinc presente disuelto en el blanco y la matriz del tejido vegetal (incluso la enzima contiene zinc en su composición). Por ello, se sustrajo siempre la señal del blanco de los resultados, tanto trabajando midiendo zinc disuelto como las nanopartículas de óxido de zinc.

Tabla 1. Parámetros instrumentales y de adquisición de datos para el espectrómetro de masas con plasma de acoplamiento inductivo en modo de detección de partículas individuales.

<i>Parámetros instrumentales</i>	
Potencia de radiofrecuencia	<i>1200 W</i>
Caudal de gas de nebulización	<i>1.0 L · min⁻¹</i>
Caudal de introducción de muestra	<i>1.0 mL · min⁻¹</i>
<i>Parámetros de adquisición de datos</i>	
Tiempo de medida	<i>5 ms</i>
Tiempo total de adquisición de datos	<i>60 s</i>

3.3.2 Límites de detección en tamaño y concentración de la técnica de detección para nanopartículas de óxido de zinc

La detección de las nanopartículas con SP-ICP-MS está asociada con la capacidad de identificar los pulsos que corresponden a nanopartículas sobre la línea base de la señal de fondo. El criterio básico que se ha seguido para identificar eventos correspondientes a nanopartículas ha sido aplicar un criterio de umbral de 3 o 5 veces la desviación estándar (σ) de la línea base. En nuestro caso, 5σ resulta más conservador y adecuado dado el elevado nivel de señal de fondo encontrado debido a los niveles de zinc disuelto presentes en las muestras. Aplicando el criterio 3σ , el menor límite de detección en tamaño (LOD) publicado para las nanopartículas de óxido de zinc ha sido de 32 nm, separando previamente el posible zinc disuelto presente mediante resinas de intercambio iónico²³.

En el caso de nuestras partículas de óxido de zinc lo que detectamos finalmente fueron agregados de las nanopartículas primarias, siendo de unos 100-120 nm el agregado más pequeño que se consiguió detectar con el SP-ICP-MS y el motivo fundamental por el que no se consiguen menores límites de detección en tamaño son los niveles de zinc disuelto que tenemos en las suspensiones. En cualquier caso, estos límites de detección de la técnica de SP-ICP-MS son en general más bajos al trabajar con nanopartículas metálicas (del orden de 10-20 nm) que estudiando nanopartículas de óxidos metálicos (del orden del centenar o varios centenares de nm).

3.3.3 Análisis de los datos experimentales

Los datos obtenidos con el software del espectrómetro de masas se importaron como archivos de datos en el programa de análisis de datos Microcal Origin para su procesado, representando en histogramas el número de pulsos frente a la intensidad del pulso para su posterior ajuste a una distribución de Poisson o lognormal²⁴. Para el procesado de los datos adquiridos con tiempos dwell en el rango de los milisegundos con la técnica de SP-ICP-MS también se ha utilizado una hoja de cálculo gratuita desarrollada en Holanda por el grupo de RIKILT

(<http://www.wageningenur.nl/en/Expertise-Services/Research-Institutes/rikilt/show/Single-Particle-Calculation-tool.htm>) que permite calcular tanto tamaños de las nanopartículas (conociendo su densidad y suponiendo forma esférica) como sus concentraciones (del elemento analizado en forma de partícula y disuelto).

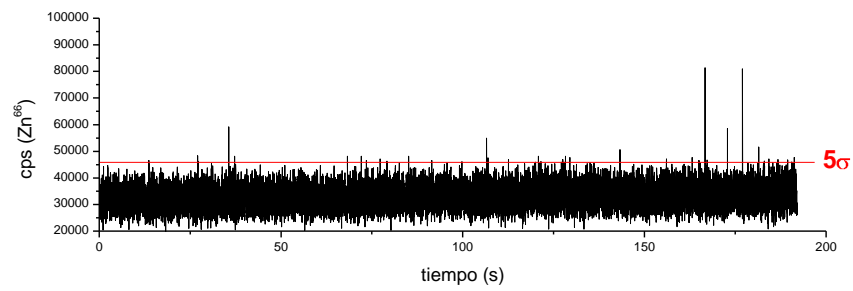
4 Resultados y discusión

4.1 Detección de nanopartículas de óxido de zinc en suspensión acuosa

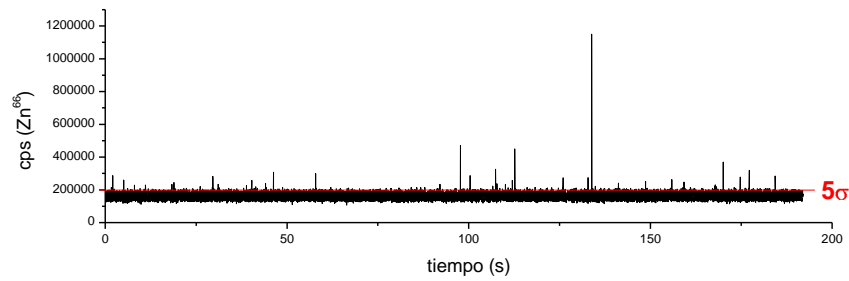
4.1.1 Optimización de la dilución para incrementar la capacidad de detección de nanopartículas mediante SP-ICP-MS

En el análisis de muestras medioambientales complejas de concentración exacta no conocida con SP-ICP-MS la optimización del factor de dilución es un paso crítico, especialmente cuando trabajamos con una resolución temporal en el rango de los milisegundos (5 ms de tiempo de medida en nuestro caso). Al aumentar el factor de dilución reducimos la oportunidad de coincidencias, esto es, que más de una nanopartícula entre en el plasma en el mismo intervalo de adquisición de datos, y también mejoramos el límite de detección en tamaños, al reducir la señal de fondo debida a las especies disueltas (entre la que la detección de la señal de las nanopartículas más pequeñas se pierde)²⁵. Sin embargo, si el factor de dilución se aumenta demasiado, necesitaremos tiempos de adquisición de datos muy prolongados para obtener un número de eventos significativo, lo que a su vez aumentará el costo del análisis, la posibilidad de obtener falsos positivos y el tiempo de medida. En el laboratorio la estrategia que hemos seguido para reducir la señal de fondo debido a las especies disueltas ha sido la dilución de las muestras para bajar su concentración. Pero existen otras estrategias en que no se toca la muestra, como puede ser reducir el tiempo de medida por debajo de los milisegundos usados en nuestro montaje experimental.

a)



b)



c)

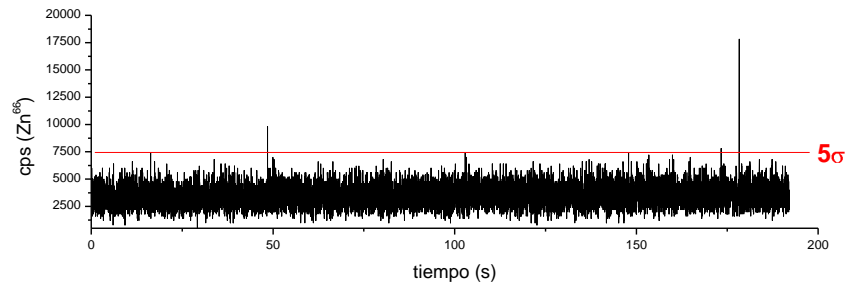


Figura 4. Barridos de tiempos en número de cuentas por segundo (cps) para tres concentraciones, a)- $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, b)- $10.4 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ y c)- $51.9 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, de las nanopartículas de Iolitec Nanomaterials.

Al medir sin diluir o a concentraciones altas, nos encontramos una señal de fondo muy elevada y una gran variabilidad de la señal con el tiempo, lo que camuflará la señal de las nanopartículas más pequeñas y hará imposible su detección. Así que diluir la muestra no solo es importante para prevenir contar varias nanopartículas como un único

evento o tener una pobre estadística de conteo, sino también en la detección de ciertos tipos de nanopartículas presentes en la muestra, sobre todo si tienen una distribución de tamaños ancha como es el caso de las nanopartículas de óxido de zinc que nos ocupan. A bajas concentraciones se ve que el nivel de la señal de fondo debida al zinc disuelto es baja y esto mejora la posibilidad de detectar las nanopartículas de óxido de zinc presentes en las muestras.

Tabla 2. Número de pulsos y concentraciones de las nanopartículas calculados usando la hoja de cálculo de RIKILT y un umbral de 5σ .

Suspensión NPs	Nº de pulsos	[NPs] (ng·L ⁻¹)	5σ (cps)
1.0 μg · L ⁻¹	3	0	7644
10.4 μg · L ⁻¹	57	25	45413
51.9 μg · L ⁻¹	1585	2654	189142

4.2 Detección de nanopartículas de óxido de zinc en el medio de la digestión enzimática

La macerozima R-10 es una mezcla multicomponente de enzimas que contiene celulosa (0.1 unidades/mg), hemicelulosa (0.25 unidades/mg) y pectinasa (0.5 unidades/mg) que tiene capacidad de digerir la mayoría de los tejidos vegetales que componen las distintas partes de las plantas y liberar las nanopartículas que contengan en su interior. Para evaluar en qué medida la digestión enzimática de los tejidos de tomate que contienen nanopartículas de óxido de zinc para su liberación con la macerozima R-10 afecta a la disolución y la agregación de las nanopartículas que contienen, se analizaron las suspensiones de nanopartículas de óxido de zinc tras someterlas al mismo proceso de digestión enzimática que a los tejidos vegetales de las plantas de tomate. Esto es se prepararon las suspensiones de nanopartículas de óxido de zinc y se mezclaron 8 ml de la suspensión de nanopartículas con 2 ml de la disolución de la enzima a una concentración de 25 g/L. Tras dejarlas agitando 24 horas a 200 rpm y a 37 °C en la incubadora se llevaron a SP-ICP-MS para su análisis. En los barridos de tiempos

obtenidos para las nanopartículas de óxido de zinc diluidas hasta concentraciones del orden de $500 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ en el medio de la digestión enzimática es posible detectar claramente los pulsos sobre la línea base continua del blanco y el zinc disuelto, mostrando los histogramas una única distribución en vez de las dos que hemos visto en la introducción, que no se ajusta bien a una distribución de Poisson, ya que tiene una caída en forma de cola hacia la derecha debida a los pulsos de las nanopartículas.

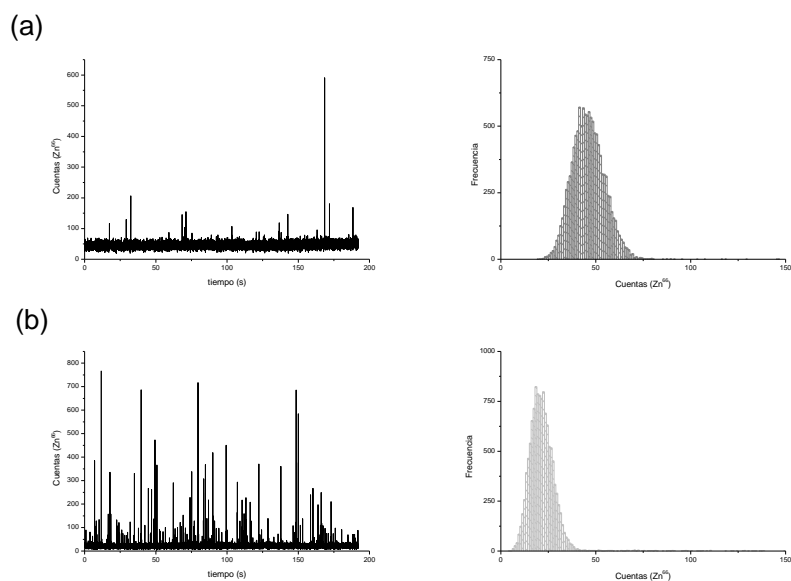


Figura 5. Barridos de tiempos e histogramas de las nanopartículas de Iolite Nanomaterials (a) y Sigma-100 (b) diluidas a una concentración de 515 y $513 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente, tras incubar a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas y 200 rpm.

4.2.1 Reproducibilidad del método de preparación de las muestras

La reproducibilidad del método de preparación de las muestras para su análisis con espectrometría de masas es muy importante, como con cualquier método analítico. Así que se realizaron tres réplicas de las medidas de espectrometría de masas tanto para comprobar la reproducibilidad de la preparación de las suspensiones de las nanopartículas de óxido de zinc tanto preparadas por dilución de las suspensión comercial como la preparada a partir del polvo como para comprobar la reproducibilidad de los resultados de someter a la enzima a la suspensión de las nanopartículas de óxido de zinc. Los resultados muestran una relativa buena

reproducibilidad por lo que podemos afirmar que el método de la digestión enzimática seguido del análisis con SP-ICP-MS es reproducible.

Tabla 3. Reproducibilidad del número de pulsos y el umbral 5σ de las nanopartículas de Iolitec Nanomaterials calculados usando la hoja de cálculo de RIKILT.

Suspensión NPs	Réplica	Nº de pulsos	5σ (cps)
$9.7 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	1	217	23310
	2	199	25570
	3	313	27642
$54.2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	1	466	129628
	2	505	130061
	3	517	130125

4.2.2 Distribuciones de tamaño y agregación de las nanopartículas de óxido de zinc mediante DLS

La dispersión de las nanopartículas de óxido de zinc en agua ultrapura resulta en una suspensión que presenta una rápida sedimentación de las partículas, indicativo de la fuerte tendencia a la formación de agregados de este tipo de nanopartículas. Es por ello que las suspensiones de las nanopartículas se prepararon frescas todos los días, ya que las medidas realizadas por espectroscopia de absorción molecular UV-Vis mostraron una caída rápida de la señal del pico a 380 nm que presentan las nanopartículas en suspensión, y se sonicaron durante 15 minutos previamente a las medidas.

Tanto las suspensiones de ZnO preparadas por dilución (Sigma-40) como a partir de polvo (Iolitec Nanomaterials) se caracterizaron por dispersión de luz dinámica (DLS) tras incubarlo 24 horas en el medio de la digestión enzimática de cara a obtener sus diámetros hidrodinámicos y confirmar que las nanopartículas primarias se encontraban formando agregados.

En el caso de las suspensiones de nanopartículas de ZnO preparadas a partir del polvo de Iolitec Nanomaterials se midieron por DLS a una concentración de $92 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ tras sonicar la suspensión en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos. El análisis de estas

suspensiones de nanopartículas de óxido de zinc de Iolitec Nanomaterials tras incubarlas 24 horas en presencia de la maceroenzima R-10, una agitación de 200 rpm y una temperatura de 37 °C (esto es, de la digestión enzimática pero sin tejidos biológicos) arrojan un valor del diámetro hidrodinámico de 285.1 ± 13.9 nm y un índice de polidispersidad de 0.162.

Igualmente se determinó el tamaño de los agregados que forman las nanopartículas de óxido de zinc Sigma-40 preparadas a partir de la dilución a una concentración de $102 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de la suspensión comercial con agua ultrapura para conocer mejor su estado de agregación. Las suspensiones se sonicaron durante 5 minutos antes de realizar las medidas. Tras la digestión enzimática, el diámetro hidrodinámico de la suspensión de nanopartículas de ZnO de Sigma-40 en el medio de la digestión enzimática ha sido de 236.5 ± 19.0 nm y a tener un índice de polidispersidad de 0.155.

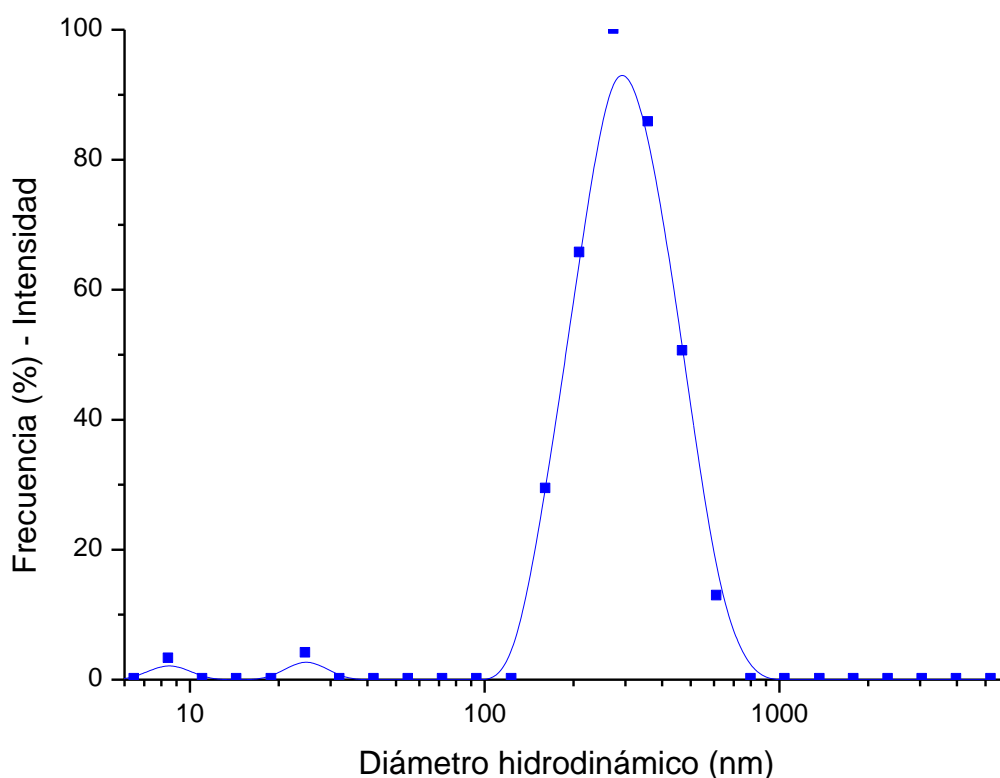


Figura 6. Distribuciones de tamaño en intensidades obtenidas por DLS para una suspensión acuosa de las nanopartículas de Iolitec Nanomaterials ($92 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) tras incubarlas 24 horas con la maceroenzima R-10 a 37 °C y 200 rpm.

De las medidas de dispersión de luz dinámica tenemos una confirmación de que ambos tipos de nanopartículas que estamos utilizando en los estudios se encuentran agregadas tras 24 horas en el medio de la digestión enzimática (esto es, en presencia de la macerozima R-10), con dimensiones superiores a las de las nanopartículas primarias reportadas por los proveedores. También se ve claramente que se trata de muestras muy polidispersas. Tanto el rango de concentraciones con las que hay que trabajar para obtener resultados en DLS, del orden de los $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, esto es muy superiores a los valores de concentraciones medioambientalmente relevantes, como la polidispersidad de las muestras, no aporta mucha información al estudio realizado más allá de la confirmación de la agregación de las nanopartículas en el medio de la digestión enzimática.

4.3 Detección de nanopartículas de óxido de zinc añadidas a tejidos vegetales sometidos a digestión enzimática

Tabla 4. Número de pulsos, concentraciones de las nanopartículas y tamaños mínimos de los agregados (asumiendo partículas esféricas) calculados usando la hoja de cálculo de RIKILT y un umbral de 5σ .

Muestra	Nº de pulsos	[NPs] ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	d_{\min} (nm)	5σ (cuentas)
Raíz (534 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	177 ± 42	58 ± 7	118 ± 2	104 ± 3
Tallo (509 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	67 ± 11	17 ± 1	116 ± 1	96 ± 2
Fruto (481 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	71 ± 5	34 ± 1	120 ± 2	124 ± 9

El principal reto a la hora de analizar los resultados obtenidos con SP-ICP-MS fue discriminar entre la señal de fondo, la señal del zinc disuelto y la debida a las nanopartículas de óxido de zinc. Establecer un límite entre la señal de las nanopartículas y la señal de fondo no es una tarea trivial. Nosotros hemos aplicado una aproximación en que se calcula la moda y la desviación estándar de las intensidades del zinc disuelto en el archivo de datos y tal cual se obtienen por SP-ICP-MS, fijando la separación entre eventos que se corresponden a nanopartículas y señal de fondo debido al zinc disuelto en 5 veces la desviación estándar del zinc disuelto¹⁵. De tal manera que solo los datos correspondientes a valores de intensidades que sean superiores a la moda mas 5 veces la

desviación estándar de la señal del zinc disuelto se consideran señal y eventos debidos a nanopartículas de óxido de zinc o sus agregados y son los que se consideran a la hora de analizar los datos de SP-ICP-MS para las nanopartículas de óxido de zinc. En otros estudios se han escogido estos límites tanto más bajos (3 veces la desviación estándar) como más altos (7 veces la desviación estándar). Hemos comparado también los resultados con esos dos límites, pero parece que en el caso de las nanopartículas de óxido de zinc que nos ocupan el límite de 5 veces la desviación estándar con respecto a la moda de la intensidad del zinc disuelto es el límite más apropiado para distinguir eventos debidos a las nanopartículas de óxido de zinc.

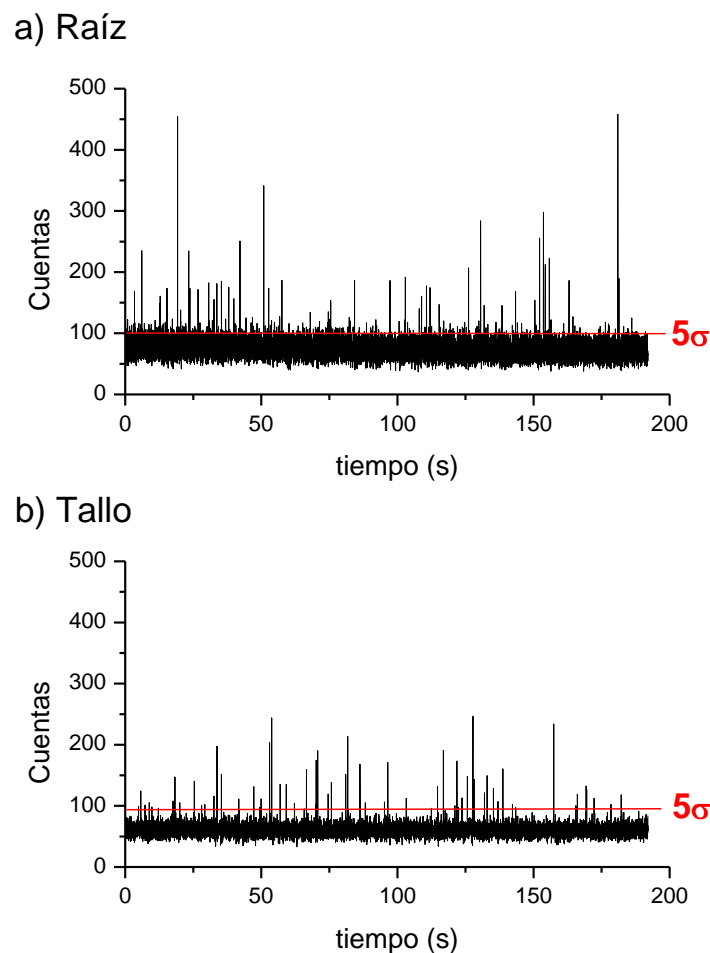


Figura 7. Barridos de tiempos para dos tejidos de tomate de control (a- raíz y b- tallo) a los que se ha añadido una concentración conocida de nanopartículas Sigma-100 (534 y $509 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ en la raíz y tallo, respectivamente) para comprobar que era posible detectarlas mediante SP-ICP-MS tras incubar las muestras.

A los tejidos vegetales de tomate ensayados (raíz, tallo y fruto) se les añadió la misma cantidad de nanopartículas de óxido de zinc ($50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), se sometieron a digestión enzimática durante 24 horas a 37°C y 200 rpm, se centrifugaron y se analizaron con SP-ICP-MS. La adición de nanopartículas a los tejidos vegetales de la planta de tomate es claramente detectable en los resultados, viéndose eventos por encima de la señal de fondo. Sin embargo, la señal de fondo correspondiente al zinc disuelto es más elevada que para las suspensiones acuosas de nanopartículas de óxido de zinc²⁶.

Aunque por SP-ICP-MS hemos obtenidos evidencia directa de la presencia de zinc en forma nanoparticulada, dar el salto a cuantificar el tamaño de las nanopartículas de óxido de zinc con esta técnica requiere conocer bien su naturaleza, básicamente su composición química, densidad y forma, para convertir la masa de zinc por nanopartícula en su correspondiente tamaño de nanopartícula. Si bien la densidad y composición de las nanopartículas de óxido de zinc que hemos empleado en este estudio es conocida, se trata de unas nanopartículas muy polidispersas y heterogeneas en forma, con lo que esta conversión no ha resultado posible. Además, como hemos visto, las nanopartículas de óxido de zinc estudiadas en suspensión acuosa experimentan importantes procesos de agregación, con lo que la técnica SP-ICP-MS solo es capaz de darnos información sobre los agregados de las nanopartículas de óxido de zinc en caso de que no se hayan disuelto las nanopartículas primarias en el proceso de digestión enzimática.

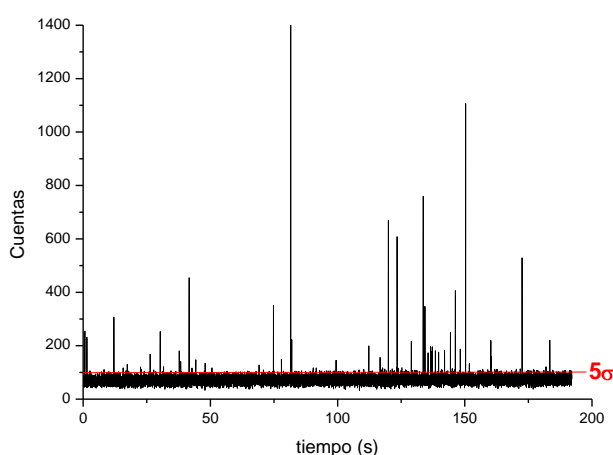


Figura 8. Barridos de tiempos para el tejido del fruto del tomate de control al que se ha añadido una concentración de $481 \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ de nanopartículas Sigma-100 para comprobar que era posible detectarlas mediante SP-ICP-MS tras incubar las muestras.

En la presentación de los resultados recogidos en esta memoria hemos optado por un planteamiento más cualitativo que cuantitativo, de tal manera que finalmente se ha optado por no incluir entre los resultados la cuantificación de las concentraciones totales del elemento (zinc) presentes en las suspensiones de las nanopartículas de óxido de zinc tras su digestión ácida realizadas tanto por espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo como con espectroscopia de absorción atómica en llama. Tampoco se ha discutido la cuantificación de la cantidad de zinc disuelto usando ICP-MS. Entre los resultados de los experimentos realizados aparecen recuperaciones superiores al 100% o concentraciones de las especies disueltas superiores a la total de las nanopartículas puestas en suspensión, que asociamos a problemas de blancos o contaminación y que nos llevan a pensar que haría falta un análisis más detallado y con más tiempo de estos resultados para sacarles provecho.

5 Conclusiones

Se ha desarrollado un método analítico basado en el uso de la detección de partículas individuales mediante ICP-MS, que permite detectar agregados de nanopartículas de óxido de zinc en suspensiones acuosas y en tejidos vegetales, sometidos previamente a un tratamiento de digestión enzimática.

Las principales conclusiones del presente trabajo pueden resumirse en los siguientes puntos:

- 1) Se ha demostrado que en las condiciones necesarias para la digestión enzimática de tejidos vegetales (macerozima R-10, tampón citrato pH 6.5, 37°C, 24 horas), las nanopartículas de óxido de zinc no se disuelven totalmente, produciéndose la agregación de las nanopartículas primarias.
- 2) La presencia de elevados niveles de zinc disuelto, procedente de los distintos reactivos así como de la disolución parcial de las propias nanopartículas, dificulta la detección de las nanopartículas de óxido de zinc mediante SP-ICP-MS.

- 3) La dilución adecuada de las muestras permite detectar mediante SP-ICP-MS nanopartículas de óxido de zinc a pesar de que las muestras presenten zinc disuelto.
- 4) No ha sido posible detectar mediante SP-ICP-MS nanopartículas primarias de óxido de zinc, sino únicamente agregados con tamaños por encima de los 100-120 nm.

El método analítico desarrollado puede ser utilizado para detectar la presencia de nanopartículas de óxido de zinc en tejidos procedentes de plantas sometidas a tratamientos con dichas nanopartículas. Las principales ventajas del método analítico desarrollado son:

- a) El método es aplicable a las concentraciones de nanopartículas del orden de $500 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ – $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, en presencia de concentraciones de zinc disuelto del orden de 1 – $5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.
- b) Con este método se puede obtener información promedio de cantidades relativamente grandes de tejidos (mg) y no de pequeñas secciones de la planta, como en el caso de la microscopía electrónica, lo que permitirá obtener una información más representativa de la interacción de las nanopartículas con la planta.

La combinación de una digestión enzimática para la preparación de las muestras junto a la detección de las nanopartículas de óxido de zinc utilizando espectrometría de masas de plasma de acoplamiento inductivo en modo de detección de partículas individuales es un método analítico prometedor para estudiar las interacciones de las nanopartículas de óxidos metálicos con las plantas, tanto en lo que se refiere a la cinética de entrada en la planta como a las biotransformaciones que experimentan en su interior como a su bioacumulación en los distintos tejidos de la planta. Se trata de un método que vence los principales retos analíticos que se plantean a día de hoy en nanometrología medioambiental con el análisis de nanopartículas en muestras complejas y puede contribuir significativamente a la gestión del riesgo alimentario que pueda suponer el uso de nanopartículas en plantas de cultivo comestibles.

6 Bibliografía

- (1) Bao, D.; Oh, Z. G.; Chen, Z. Characterization of Silver Nanoparticles Internalized by Arabidopsis Plants Using Single Particle ICP-MS Analysis. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 1–8.
- (2) Rico, C. M.; Majumdar, S.; Duarte-Gardea, M.; Peralta-Videa, J. R.; Gardea-Torresdey, J. L. Interaction of Nanoparticles with Edible Plants and Their Possible Implications in the Food Chain. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (8), 3485–3498.
- (3) Zhao, L.; Sun, Y.; Hernandez-Viezcas, J. A.; Hong, J.; Majumdar, S.; Niu, G.; Duarte-Gardea, M.; Peralta-Videa, J. R.; Gardea-Torresdey, J. L. Monitoring the Environmental Effects of CeO₂ and ZnO Nanoparticles through the Life Cycle of Corn (*Zea Mays*) Plants and in Situ XRF Mapping of Nutrients in Kernels. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49* (5), 2921–2928.
- (4) Nair, R.; Varghese, S. H.; Nair, B. G.; Maekawa, T.; Yoshida, Y.; Kumar, D. S. Nanoparticulate Material Delivery to Plants. *Plant Science*. Elsevier Ireland Ltd 2010, pp 154–163.
- (5) Dimkpa, C. O.; McLean, J. E.; Britt, D. W.; Anderson, A. J. Bioactivity and Biomodification of Ag, ZnO, and CuO Nanoparticles with Relevance to Plant Performance in Agriculture. *Ind. Biotechnol.* **2012**, *8* (6), 344–357.
- (6) Liu, R.; Lal, R. Potentials of Engineered Nanoparticles as Fertilizers for Increasing Agronomic Productions. *Sci. Total Environ.* **2015**, *514*, 131–139.
- (7) Aslani, F.; Bagheri, S.; Muhd Julkapli, N.; Juraimi, A. S.; Hashemi, F. S. G.; Baghdadi, A. Effects of Engineered Nanomaterials on Plants Growth: An Overview. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, 1–28.
- (8) Wang, P.; Menzies, N. W.; Lombi, E.; McKenna, B. A.; Johannessen, B.; Glover, C. J.; Kappen, P.; Kopittke, P. M. Fate of ZnO Nanoparticles in Soils and

- Cowpea (*Vigna Unguiculata*). *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47* (23), 13822–13830.
- (9) Lin, D.; Xing, B. Root Uptake and Phytotoxicity of ZnO Nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42* (15), 5580–5585.
- (10) Zmozinski, A. V.; De Jesus, A.; Vale, M. G. R.; Silva, M. M. Determination of Calcium, Magnesium and Zinc in Lubricating Oils by Flame Atomic Absorption Spectrometry Using a Three-Component Solution. *Talanta* **2010**, *83* (2), 637–643.
- (11) Laborda, F.; Bolea, E.; Cepriá, G.; Gómez, M. T.; Jiménez, M. S.; Pérez-Arantegui, J.; Castillo, J. R. Detection, Characterization and Quantification of Inorganic Engineered Nanomaterials: A Review of Techniques and Methodological Approaches for the Analysis of Complex Samples. *Analytica Chimica Acta*. 2016, pp 10–32.
- (12) Links, D. A. Nanoparticles in Suspensions and Products. *J. Anal. At. Spectrom.* **2011**, *26*, 1701–1721.
- (13) Gunsolus, I. L.; Haynes, C. L. Analytical Aspects of Nanotoxicology. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (1), 451–479.
- (14) David, C. A.; Galceran, J.; Rey-Castro, C.; Puy, J.; Companys, E.; Salvador, J.; Monné, J.; Wallace, R.; Vakourov, A. Dissolution Kinetics and Solubility of ZnO Nanoparticles Followed by AGNES. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116* (21), 11758–11767.
- (15) Laborda, F.; Bolea, E.; Jiménez-Lamana, J. Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for the Analysis of Inorganic Engineered Nanoparticles in Environmental Samples. *Trends Environ. Anal. Chem.* **2016**, *9*, 15–23.
- (16) Zhang, Y.; Chen, Y.; Westerhoff, P.; Hristovski, K.; Crittenden, J. C. Stability of Commercial Metal Oxide Nanoparticles in Water. *Water Res.* **2008**, *42* (8-9), 2204–2212.
- (17) Peng, Y. H.; Tso, C. ping; Tsai, Y. chun; Zhuang, C. ming; Shih, Y. hsin. The

- Effect of Electrolytes on the Aggregation Kinetics of Three Different ZnO Nanoparticles in Water. *Sci. Total Environ.* **2015**, 530-531, 183–190.
- (18) Ebbs, S. D.; Bradfield, S. J.; Kumar, P.; White, J. C.; Musante, C.; Ma, X. Accumulation of Zinc, Copper, or Cerium in Carrot (*Daucus Carota*) Exposed to Metal Oxide Nanoparticles and Metal Ions. *Environ. Sci. Nano* **2016**.
- (19) Dan, Y.; Zhang, W.; Xue, R.; Ma, X.; Stephan, C.; Shi, H. Characterization of Gold Nanoparticle Uptake by Tomato Plants Using Enzymatic Extraction Followed by Single-Particle Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry Analysis. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, 49 (5), 3007–3014.
- (20) Montaña, M. D.; Olesik, J. W.; Barber, A. G.; Challis, K.; Ranville, J. F. Single Particle ICP-MS: Advances toward Routine Analysis of Nanomaterials. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, 408 (19), 5053–5074.
- (21) Laborda, F.; Bolea, E.; Jimenez-Lamana, J. Powerful Tool for Nanoanalysis. *Anal. Chem.* **2014**, 86, 2270–2278.
- (22) Laborda, F.; Jiménez-Lamana, J.; Bolea, E.; Castillo, J. R. Selective Identification, Characterization and Determination of Dissolved silver(I) and Silver Nanoparticles Based on Single Particle Detection by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **2011**, 26 (7), 1362.
- (23) Hadioui, M.; Peyrot, C.; Wilkinson, K. J. Improvements to Single Particle ICP-MS by the on- Line Coupling of Ion Exchange Resins. *Anal. Chem.* **2014**, No. 86, 1–14.
- (24) Laborda, F.; Jiménez-Lamana, J.; Bolea, E.; Castillo, J. R. Critical Considerations for the Determination of Nanoparticle Number Concentrations, Size and Number Size Distributions by Single Particle ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* **2013**, 28, 1220–1232.
- (25) Navratilova, J.; Praetorius, A.; Gondikas, A.; Fabienke, W.; von der Kammer, F.; Hofmann, T. Detection of Engineered Copper Nanoparticles in Soil Using Single Particle ICP-MS. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2015**, 12 (12), 15756–15768.

- (26) Reed, R. B.; Higgins, C. P.; Westerhoff, P.; Tadjiki, S.; Ranville, J. F.
Overcoming Challenges in Analysis of Polydisperse Metal-Containing
Nanoparticles by Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry.
J. Anal. At. Spectrom. **2012**, 27, 1093.