



**Universidad  
Zaragoza**



# Trabajo Fin de Máster en Nanotecnología Medioambiental

Título del trabajo:  
ENSAYOS DE BIOACCESIBILIDAD DE  
NANOCOMPUESTOS A BASE DE PLATA

English tittle:  
BIOAVAILABILY ASSAYS OF SILVER-BASED  
NANOCOMPOSITES

Autor

Celia Trujillo Lacasa

Director

Eduardo Bolea Morales

FACULTAD DE CIENCIAS/UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA  
Año 2016/2017



---

<b>RESUMEN.</b> .....	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.</b> .....	<b>2</b>
1.1 INTERÉS DEL USO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA.....	2
1.2 USO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN PRODUCCIÓN ANIMAL.....	4
1.3 TÉCNICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS. ....	6
1.3.1 Técnicas de separación. ....	6
1.3.1.1 Extracción en punto de nube (CPE).....	6
1.3.1.2 Técnicas electroforéticas. ....	7
1.3.1.3 Métodos cromatográficos. ....	7
1.3.1.4 Fraccionamiento en flujo de campo (FFF). ....	7
1.3.1.5 Otros métodos. ....	9
1.3.2 Técnicas de cuantificación.....	10
1.3.2.1 Espectroscopia de absorción atómica en llama (FAAS).....	10
1.3.2.2 Espectroscopia de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).....	10
<b>2. OBJETIVOS.</b> .....	<b>12</b>
<b>3. EXPERIMENTAL</b> .....	<b>13</b>
3.1 REACTIVOS, ESTÁNDARES Y MUESTRAS .....	13
3.1.1 Reactivos y estándares .....	13
3.1.2 Muestras.....	14
3.2 INSTRUMENTACIÓN Y EQUIPOS.....	14
3.3 MATERIALES.....	15
3.4 PROCEDIMIENTOS .....	15
3.4.1 Tratamientos de las muestras.....	15
3.4.1.1 Ataque ácido de caolín-Ag y sepiolita-Ag.....	15
3.4.1.2 Ensayos de lixiviación de caolín-Ag y sepiolita-Ag.....	15
3.4.1.3 Ensayos de ultrafiltración. ....	16
3.4.1.4 Ensayo de digestión enzimática de caolín-Ag y sepiolita-Ag. ...	16

---

3.4.2 Fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico acoplado a un espectrómetro de masas con plasma de acoplamiento inductivo (AF4-ICPMS). .....	17
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>19</b>
4.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PLATA TOTAL PRESENTE EN LAS MUESTRAS DE CAOLÍN-Ag Y SEPIOLITA-Ag. ....	19
4.2 ENSAYOS DE LIXIVIACIÓN EN AGUA ULTRAPURA. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD TOTAL DE PLATA Y DE PLATA IÓNICA.....	20
4.3 DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES DE PLATA LIBERADA DESDE EL CAOLÍN-Ag Y SEPIOLITA-Ag EN AGUA ULTRAPURA MEDIANTE AF4-ICPMS. ....	22
4.4 ENSAYOS DE DIGESTIÓN ENZIMÁTICA CON CAOLÍN-Ag Y SEPIOLITA-Ag. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE PLATA TOTAL LIBERADA. ....	32
4.5 DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES DE PLATA LIBERADA DESDE LA SEPIOLITA-Ag EN ENSAYOS DE DIGESTIBILIDAD MEDIANTE AF4-ICPMS.....	35
<b>5. CONCLUSIONES. ....</b>	<b>40</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA. ....</b>	<b>41</b>



En el presente trabajo se plantea el uso de nanocomposites de caolín y sepiolita (aditivos habituales en alimentación animal) recubiertos de nanopartículas de plata como alternativa al uso de antibióticos, debido a sus propiedades antimicrobianas, como promotores del crecimiento. Con el objetivo de conocer el comportamiento de las nanopartículas una vez se encuentran en el tracto digestivo de los animales, se han llevado a cabo estudios de liberación de plata desde caolín y sepiolita a través de ensayos de lixiviación en agua ultrapura y en ensayos de digestión enzimática *in vitro*. Estos ensayos han permitido modelizar el comportamiento de estos materiales en distintos medios a través de la caracterización de las formas de plata liberada mediante el uso de técnicas de ultrafiltración y fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF4) acopladas a ICP-MS. Los resultados obtenidos demuestran que se produce una liberación de plata mayor desde el caolín-Ag que desde la sepiolita-Ag en todos los medios estudiados. En agua ultrapura, la mayor parte de la plata liberada desde el caolín-Ag es en forma de plata iónica o asociada a especies de bajo peso molecular, mientras que este porcentaje disminuye en el caso de la sepiolita-Ag, siendo el resto de plata asociada a micropartículas de sepiolita que permanecen en suspensión. Los ensayos de digestibilidad han permitido determinar que la mayor parte de la plata se libera durante la segunda etapa, correspondiente a la digestión en el intestino delgado y que las formas de plata corresponden a plata asociada a las especies presentes en el medio que se transforman en el interior del canal de AF4 durante la separación.

# **1. INTRODUCCIÓN.**

### 1.1 Interés del uso de nanopartículas de plata.

El uso de las nanopartículas cada día va en aumento debido en gran medida a las nuevas propiedades que éstas presentan si se comparan con sus semejantes a escala macro. Estas propiedades han hecho posible que sean utilizadas en una amplia gama de aplicaciones entre las que se encuentra la medicina, cosmética, energías renovables, remediación ambiental o en dispositivos biomédicos.

Las nanopartículas de plata (AgNPs) , son, a día de hoy, unas de las nanopartículas más utilizadas, debido a sus propiedades ópticas, catalíticas, morfológicas y antibacterianas..

- Propiedades ópticas.

Las AgNPs absorben radiación electromagnética en el rango del visible desde 380 nm a 450 nm mediante la excitación de resonancia plasmónica superficial localizada (LSPR).<sup>1</sup> La LSPR se produce en diferentes regiones del espectro (380-450 nm) en función del tamaño y la forma que presentan las AgNPs. Las nanopartículas con formas irregulares pueden presentar dos o más resonancias plasmónicas.<sup>2</sup> Debido a ésta característica las AgNPs pueden tener potencial para ser utilizadas con el fin de mejorar el rendimiento de las células solares,<sup>3</sup> en sensores para la detección colorimétrica de elementos químicos (como por ejemplo el cromo) en aguas<sup>4</sup> o como biosensores para el diagnóstico de enfermedades o para la detección de hormonas.<sup>5</sup>

- Propiedades catalíticas.

Las AgNPs comparadas con las propiedades de la plata a escala macro, presentan la capacidad de acelerar reacciones ya que tienen una mejor reactividad, una mejora en la selectividad y tienen la capacidad de ser recicladas.<sup>6</sup> Sin embargo la actividad catalítica se encuentra muy influenciada por el tamaño, la forma, el estado de oxidación y el ambiente



físico/químico en el que se encuentren las nanopartículas.<sup>7</sup> Las AgNPs se han utilizado de forma eficaz como agentes catalíticos para la reducción de colorantes (como el azul de metileno, el rosa de bengala o el naranja de metilo),<sup>8</sup> para la producción de óxido de etileno<sup>9</sup> o para la reducción de dióxido de carbono en el aire.<sup>10</sup>

- Propiedades morfológicas.

La morfología y el tamaño que vayan a presentar las AgNPs dependen en gran medida de la concentración en solución y de la distribución de los polisacáridos y sales metálicas utilizadas como precursores.<sup>11</sup> La forma y el tamaño que presenten las nanopartículas va a influenciar en otras propiedades de las mismas como en sus propiedades tóxicas (menor tamaño mayor actividad antimicrobiana) o en sus propiedades ópticas (mayor tamaño espectro de absorción mayor).

- Propiedades antibacterianas.

Las AgNPs se ha demostrado que son muy eficaces como antimicrobianos contra bacterias, virus y microorganismos eucariotas. Esta acción antimicrobiana se debe a las propiedades específicas de las nanopartículas (tamaño y forma) y a los efectos de los iones de plata liberados desde las nanopartículas. La forma en la que se produce esta acción tóxica sobre las células puede llevarse a cabo a través de diferentes mecanismos (figura 1).<sup>12</sup> Debido a esta acción antimicrobiana las AgNPs se han incorporado a diversos productos de consumo como cosméticos, textiles, en medicamentos, para el tratamiento de aguas o en envases alimentarios entre otros.<sup>13</sup>

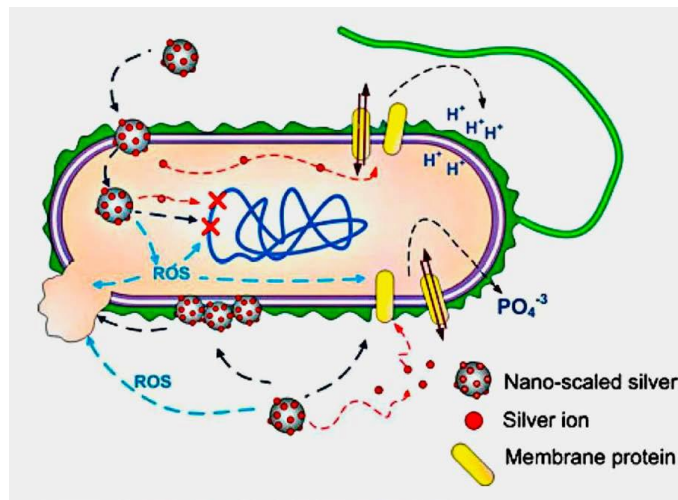


Figura 1. Diagrama resumiendo las interacciones de las nanopartículas de plata con una célula bacteriana.<sup>12</sup>

### **1.2 Uso de las nanopartículas de plata en producción animal.**

El número de aplicaciones en producción animal basadas en el uso de nanopartículas como pueden ser la administración de nutrientes específicos, como suplementos, probióticos, para el diagnóstico o para el tratamiento de enfermedades, es cada vez mayor. Una de las aplicaciones en las que están teniendo más relevancia es en la alimentación animal, siendo utilizadas en forma de aditivos.<sup>14</sup> En este caso la utilización de nanopartículas frente a otras sustancias se justifica por una mayor biodisponibilidad y una dosis requerida menor.

Se está investigando el uso de las AgNPs como aditivo en alimentación animal para remplazar a los antibióticos. Los antibióticos en producción animal han sido muy utilizados como promotores del crecimiento. Éstos se usaban para eliminar las especies bacterianas patógenas presentes en el tracto digestivo de los animales con el fin de que esta eliminación favoreciera la absorción de nutrientes y por tanto se produjera un aumento en los rendimientos productivos del animal. Sin embargo el uso continuado de estas sustancias favorecía la retención de los mismos en los tejidos del animal, lo cual podía suponer problemas de resistencia a antibióticos para el consumidor final de esa carne.<sup>15</sup> Por ello la Unión Europea en el

año 2006 prohibió el uso de antibióticos para este fin mediante el Reglamento N°1831/2003 sobre los aditivos en la alimentación animal.<sup>16</sup> Debido a esto las nanopartículas de plata surgieron como una opción para llevar a cabo esta práctica.

En ensayos in vitro realizados en lechones destetados (5-20 kg) la suplementación de AgNPs (20 y 40 ppm) adsorbidas en una matriz de sepiolita resultó en la reducción de coliformes en el contenido del conducto ileal, además dio lugar a la reducción de patógenos como *Clostridium perfringens* y *Cl. histolyticum* en el íleon.<sup>17</sup>

En aves de corral también se ha observado que el uso de AgNPs ejerce un impacto selectivo positivo sobre las bacterias presentes en el tracto digestivo. La incorporación a la dieta de 60 ppm de nanopartículas de plata durante 42 días provocaba una pequeña reducción en el peso de los pollos, lo cual se relacionó con la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata.<sup>18</sup> Sin embargo si lo que se busca es un aumento en el peso de los pollos la cantidad máxima de nanopartículas a suplementar tendría que estar entorno a los 20 ppm.<sup>19</sup> La suplementación de AgNPs en pollos también se ha visto que mejora la conversión alimenticia si se compara la conversión con pollos sin este tipo de suplementación. Esta mejora se cree que se produce por la acción de la plata iónica liberada desde las nanopartículas, la cual actúa sobre las bacterias dañinas mejorando así la salud intestinal dando como resultado una mejora en la absorción de nutrientes.<sup>20</sup>

### **1.3 Técnicas para la caracterización, identificación y cuantificación de las nanopartículas.**

A la hora de caracterizar, identificar y cuantificar AgNPs en matrices complejas estos procesos se encuentran influenciados por el tamaño de la partícula a analizar y la naturaleza de la misma, la concentración en la muestra, las características fisicoquímicas del medio en el que se encuentren, así como el principio en el que se fundamenta la técnica y las propias limitaciones de la misma.

En esta introducción nos limitamos a resumir las principales técnicas de separación y las técnicas de cuantificación con las que se han trabajado.

#### **1.3.1 Técnicas de separación.**

Las técnicas de separación por tamaños y el análisis de las AgNPs se pueden llevar a cabo mediante diversas técnicas como son la extracción en punto de nube, las técnicas electroforéticas, los métodos cromatográficos, el fraccionamiento de flujo de campo (FFF) y otros métodos.<sup>21</sup>

##### ***1.3.1.1 Extracción en punto de nube (CPE).***

La CPE es una técnica que permite separar las AgNPs de la muestra preservando su tamaño y morfología. Además también permite la separación de las nanopartículas de las especies disueltas.<sup>22</sup> Para llevar a cabo esta técnica es necesario incorporar a la solución de la muestra un tensoactivo (no-iónico) y modificar una serie de condiciones de la misma (pH, temperatura o fuerza iónica). Esta situación provoca la formación de micelas, a las cuales se unen las nanopartículas. Posteriormente para separar las nanopartículas unidas a las micelas del resto de componentes de la muestra solo es necesario llevar a cabo una centrifugación.<sup>23</sup> Ésta técnica presenta una serie de ventajas relacionadas con la alta eficiencia de extracción, el alto factor de preconcentración, el bajo coste, el fácil manejo y la no toxicidad de los reactivos utilizados.<sup>21</sup>

### 1.3.1.2 *Técnicas electroforéticas.*

La separación de las nanopartículas mediante métodos electroforéticos se ve influenciada por la funcionalización o no de dichas nanopartículas. Cuando las nanopartículas de plata no se encuentran funcionalizadas la separación se basa casi exclusivamente en el tamaño que presentan. Sin embargo si estas se encuentran funcionalizadas la separación se realiza en función de la cantidad, los grupos químicos y la ionización de dichos grupos.<sup>24</sup> La electroforesis en gel, el enfoque isoelectrico (IEF) y la electroforesis capilar (CE) son los métodos electroforéticos más utilizadas para la separación de AgNPs.<sup>21</sup>

### 1.3.1.3 *Métodos cromatográficos.*

Los métodos cromatográficos mas utilizados para la separación de AgNPs son la cromatografía hidrodinámica (HDC) y la cromatografía de exclusión por tamaños (SEC).<sup>21</sup>

HDC se basa en el uso de columnas empaquetadas con perlas no porosas, las cuales crean canales capilares en el interior de la columna. La separación se lleva a cabo por el gradiente de velocidad dentro de los canales capilares, los cuales provocan que las nanopartículas de mayor tamaño salgan antes que las de menor tamaño.<sup>25</sup> Por otra parte SEC se basa en columnas con materiales porosos, los cuales forman los canales de flujo. La separación se produce porque las partículas de menor tamaño son capaces de pasar a través de los poros del material mientras que las de mayor tamaño son excluidas tardando un mayor tiempo en salir.<sup>26</sup> En muchas ocasiones a estos métodos para obtener una mayor información se acoplan diversos detectores como ICP-MS (espectroscopia de masas de plasma acoplado inductivamente), DLS (dispersión dinámica de la luz) o UV-visible.

### 1.3.1.4 *Fraccionamiento en flujo de campo (FFF).*

En esta técnica de separación se aplica una fuerza, ya sea campo o gradiente, de forma perpendicular a un canal en el que se desplazan las distintas especies en régimen laminar (Figura 2).

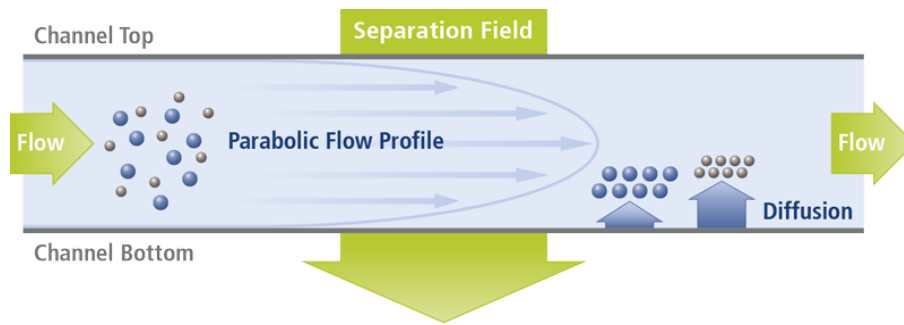


Figura 2. Representación del proceso de separación en FFF.<sup>27</sup>

Esta técnica presenta ventajas frente a otras técnicas de separación como las cromatográficas ya que presenta una resolución aceptable, permite a lo largo del análisis obtener información de manera continua sobre el tamaño de las nanopartículas dentro de un rango amplio (1-100  $\mu\text{m}$ ) y no requiere de fase estacionaria lo que favorece que las nanopartículas preserven su morfología y tamaño.<sup>28</sup>

Existen diversos campos o gradientes que pueden ser utilizados para realizar la separación dentro de los cuales se encuentra el térmico, el eléctrico, de sedimentación (gravitacional) y el de flujo (simétrico, de fibra hueca y asimétrico).<sup>28</sup> Éstos componen distintas subtécnicas como son FFF térmico, FFF eléctrico, FFF de sedimentación y FFF de flujo.

Ésta última subtécnica es de las más utilizadas dentro del campo de las técnicas de FFF. Esto se debe a que en FFF de flujo la separación se produce cuando se aplica un caudal perpendicular al flujo de elución, provocando que la variación de este caudal separe las especies en función de su coeficiente de difusión. Se puede utilizar para partículas con tamaños entre 1 nm a 50  $\mu\text{m}$ . Dentro de esta subtécnica encontramos distintos tipos como son el FFFF simétrico (la parte superior e inferior son permeables de forma que el caudal perpendicular se aplica de forma uniforme a lo largo del canal), FFFF hollow fiber (el canal ha sido sustituido por un tubo hueco por donde circula el portador en régimen laminar) y FFFF asimétrico (la parte superior del canal es impermeable, de forma que el flujo a la entrada se divide en el que recorre el canal y el perpendicular aplicado denominado crossflow).<sup>29</sup>

El FFFF asimétrico (AF4) es el más utilizado en la actualidad. Con el fin de obtener más información acerca del fraccionamiento de las muestras a este equipo suelen acoplarse una serie de detectores on-line y off-line (Figura 3). Dentro de los detectores que más tienden a acoplarse se encuentran el UV-Visible y el ICP-MS. Este último tiene una mayor sensibilidad y selectividad si se compara con el UV-visible, además permite el análisis multielemental. Sin embargo la técnica de AF4 también presenta problemas debido a los tiempos largos de análisis y a la necesidad de optimizar los parámetros mencionados anteriormente.

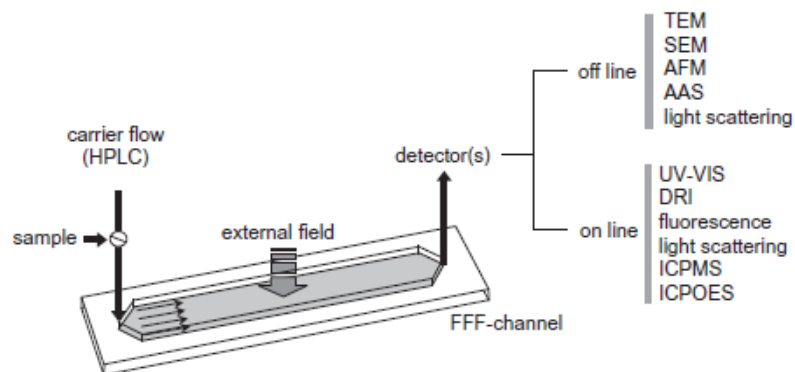


Figura 3. Detectores los cuales pueden acoplarse al sistema FFF.<sup>20</sup>

La separación de las nanopartículas mediante esta técnica no solo depende del campo aplicado sino también de una serie de parámetros. Dentro de estos parámetros se encuentra el portador (pH, fuerza iónica y composición química), las dimensiones del canal y la membrana y sus propiedades superficiales (carga y tamaño de poro).<sup>28</sup>

### 1.3.1.5 Otros métodos.

Para llevar a cabo la separación de AgNPs presentes en una muestra también se han utilizado otras técnicas como la filtración por membrana, la ultrafiltración o la centrifugación.<sup>30</sup> Estas técnicas suelen tener un bajo coste y fácil manejo, además no requieren la adición de agentes de separación. Sin embargo su uso puede dar lugar a agregaciones no deseadas o a la obturación de los filtros.

### 1.3.2 Técnicas de cuantificación.

Para llevar a cabo la cuantificación de las AgNPs se pueden utilizar diversas técnicas entre las que se encuentra la espectroscopia de absorción atómica en llama (FAAS) y la espectroscopia de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

#### 1.3.2.1 *Espectroscopia de absorción atómica en llama (FAAS).*

La FAAS se basa en la absorción de radiación por los átomos formados en una llama a partir de una muestra líquida. Es uno de los métodos más utilizados para la determinación de iones metálicos, sin embargo presenta dos grandes limitaciones. Una de ellas se relaciona con el límite de detección el cual se encuentra en el rango de los mg/L, lo que en ocasiones puede tener limitaciones cuando se determina la presencia de nanomateriales en determinados tipos de muestras. La otra limitación se relaciona con la presencia de matriz, a que esta puede afectar a la selectividad y la sensibilidad del método.<sup>31</sup>

#### 1.3.2.2 *Espectroscopia de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).*

La técnica ICP-MS nos permite cuantificar las especies disueltas y nanopartículas presentes en una muestra líquida. Esta técnica presenta bajos límites de detección, tiene un amplio rango lineal dinámico, tiene la capacidad de análisis de múltiples elementos/isótopos, es una detección relativamente rápida y presenta pocas interferencias de masa.<sup>22</sup> Sin embargo esta técnica no permite obtener información acerca de la forma en la que se encuentra el elemento (disuelta o particulada) o información acerca del tamaño, forma o estado de agregación de las nanopartículas en su modo convencional de medida. Cuando se utiliza en modo single particle la técnica permite obtener información acerca composición química elemental del nanomaterial, el tamaño, la concentración en número y la distribución de tamaño en número.



Si se desea obtener este tipo de información es necesario llevar a cabo etapas previas como puede ser una ultrafiltración.<sup>23</sup> Además en ocasiones las muestras complejas producen efecto matriz, lo que provoca que en ocasiones sea necesario eliminar la matriz aunque esto pueda alterar la naturaleza de la nanopartícula objeto del estudio.<sup>32</sup>

## **2. OBJETIVOS.**

El objetivo principal del presente TFM se centra en evaluar la posible utilización de nanocomposites de sepiolita y caolín recubiertos de nanopartículas de plata para la dosificación de plata mediante su estudio en ensayos de digestibilidad. Para ello, se han de conseguir los siguientes objetivos parciales:

1. Caracterizar los nanocomposites de sepiolita y caolín recubiertos de nanopartículas de plata.
2. Realizar estudios de liberación de plata desde los nanomateriales empleados (caolín y sepiolita) a lo largo de ensayos de liberación y a la caracterización de las formas de plata liberada.
3. Realizar estudios de liberación de plata desde los nanomateriales empleados (caolín y sepiolita) a lo largo de procesos digestivos in vitro y a la caracterización de las formas de plata liberada.

Para cumplir con los objetivos fijados se emplearan una serie de técnicas como FAAS, ICP-MS y AF4-ICP-MS.

### **3. EXPERIMENTAL.**

### 3.1 Reactivos, estándares y muestras.

#### 3.1.1 Reactivos y estándares.

Los reactivos utilizados fueron:

- Dihidrógeno fosfato de sodio monohidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ); Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.
- Fosfato disódico ( $\text{NaHPO}_4$ ); Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.
- Pepsina; Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.
- Hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ); Scharlau, Barcelona, España.
- Pancreatina; Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); Scharlau, Barcelona, España.
- Viscozyme; Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.
- Ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ); PanReac, Barcelona, España.
- Ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ); J.T.Baker, Madrid, España.
- Estándar de plata para ICP-MS; Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.
- Estándar de rodio; Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.
- Dodecil sulfato de sodio (SDS); Bio-rad, Hercules, EE.UU.
- Azida sódica pura ( $\text{NaN}_3$ ); PanReac, Barcelona, España.
- Ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ); Probus, Badalona, España.
- Ácido clorhídrico ( $\text{HCl}$ ); J.T.Baker, Madrid, España.
- Nanopartículas de plata de 10 nm (1000mg/l); Plasmachem GmbH, Berlín, Alemania.
- Nanopartículas de plata de 20, 40 y 60 nm (20mg/l); Nanocomposix, San Diego, EE.UU.
- Partículas de óxido de silicio  $2\mu\text{m}$  y  $0.5\mu\text{m}$ ; Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.

#### 3.1.2 Muestras.

Las muestras utilizadas para llevar a cabo los estudios son caolín plateado coloidal denominado como caolín-Ag ( $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$ ) y sepiolita plateada coloidal denominado como sepiolita-Ag ( $\text{Mg}_4\text{Si}_6\text{O}_{15}(\text{OH})_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), en las que se ha depositado sobre su superficie nanopartículas de plata. Además de caolín sin ningún tratamiento.

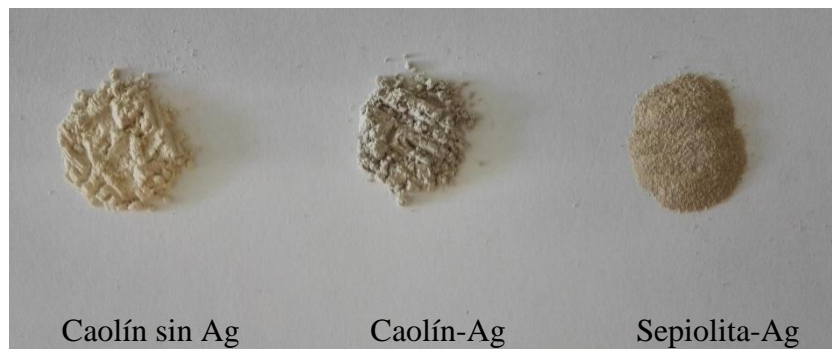


Figura 4. Foto con los distintos tipos de caolín y sepiolita utilizados.

#### 3.2 Instrumentación y equipos.

- Equipo de Fraccionamiento en Flujo mediante Campo de Flujo Asimétrico (AsFIFFF); Postnova Analytics, Landsberg, Alemania.
- Espectrómetro ICP-MS Perkin Elmer SCIEX Elan DRC-e; Perkin Elmer, Toronto, Canadá.
- Incubadora; OVAN, Barcelona, España.
- Centrifuga refrigerada Heraeus Multifuge X1R; Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.
- pH-metro, Crison Basic 20; Crison, Barcelona, España.
- Equipo de Espectroscopia de absorción atómica en llama PerkinElmer AAnalyst 200; Perkin Elmer, Toronto, Canadá.

### 3.3 Materiales.

- Tubos tipo Falcon de polipropileno de 50 mL y de 15 mL.
- Tubos Eppendorf de polipropileno de 1,5 mL.
- Erlenmeyer de polipropileno de 250 ml.
- Membrana polietersulfona (PES) de 5kDa; Postnova Analytics, Landsberg, Alemania.
- Filtros de 0.45  $\mu\text{m}$  de PVDF; Millipore, Bedford, EE.UU.
- Filtros de ultrafiltración 3k (50-500 $\mu\text{L}$ ); Pall Corporation, Nueva York, EE.UU.

### 3.4 Procedimientos

#### 3.4.1 Tratamientos de las muestras.

##### 3.4.1.1 *Ataque ácido de caolín-Ag y sepiolita-Ag.*

Para llevar a cabo el ataque ácido de las muestras mediante ácido nítrico se pesaron 100 mg de muestra a los cuales se les añadió una relación 1:1 de  $\text{HNO}_3$  y agua ultrapura. Esta mezcla se calentó hasta la sequedad y una vez seco el residuo se resuspendió con  $\text{HNO}_3$  al 10%. Tras esto la muestra se llevo a centrifugación a 3000 rpm durante 10 min, con el fin de separar las partículas de arcilla.

Por último el sobrenadante procedente de la separación se llevo a un volumen final de 50 ml con  $\text{HNO}_3$  al 1%.

##### 3.4.1.2 *Ensayos de lixiviación de caolín-Ag y sepiolita-Ag.*

Para los ensayos de lixiviación de plata se tomaron 125 mg de caolín-Ag o de sepiolita-Ag, a los cuales se les añadió 50 ml de agua ultrapura, esto se realizó en erlenmeyer de polipropileno. La suspensión se mantuvo en agitación durante 24 h a 99 rpm a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se tomaron 10 ml de las

suspensiones y se llevaron a centrifugar durante 10 min a 1430 rpm para el caso del caolín-Ag y 10 min a 1808 rpm para el caso de la sepiolita-Ag. Con estas condiciones se obtenían 2 ml los cuales no presentaban partículas mayores a 0.5  $\mu\text{m}$ .

#### 3.4.1.3 *Ensayos de ultrafiltración.*

Con una parte de los ml obtenidos tras la centrifugación se realizó una dilución 1:5 con agua Mili Q y con el resto se llevó a cabo una ultrafiltración mediante ultrafiltros de 500 $\mu\text{l}$ . Para llevar a cabo esta ultrafiltración inicialmente se hidrató la membrana mediante agua ultrapura a 9000 rpm durante 10 min. Este proceso se realizó 2 veces. Tras la hidratación de la membrana se añadieron 500 $\mu\text{l}$  de la muestra centrifugada previamente y se llevaron los ultrafiltros a la centrifuga 20 min a 9000 rpm. Transcurrido ese tiempo se tomaron los  $\mu\text{l}$  de solución los cuales han pasado por el filtro (entorno a 450  $\mu\text{l}$ ) para realizar una disolución 1:10.

#### 3.4.1.4 *Ensayo de digestión enzimática de caolín-Ag y sepiolita-Ag.*

El ensayo de digestión enzimática consta de 3 fases las cuales se basan en el procedimiento desarrollado por Boisen y Fernández, 1997.<sup>33</sup> Las digestiones se llevaron a cabo en erlenmeyer de polipropileno de 250 ml, siendo necesario utilizar como mínimo tres para cada muestra. Esto se debe a que en cada fase se sacaba un erlenmeyer.

El procedimiento que se realizó para llevar a cabo los ensayos de digestión es el siguiente:

- Fase 1°. Se tomaron 100 mg de muestra a los cuales se les añadió 25 ml de tampón fosfato 0.1M (pH=6.0). Tras esto se comprobó el pH de las muestras, ajustándolo a 2 mediante HCl 3N. Una vez ajustado el pH, se añadió 1 ml de pepsina y las muestras se llevaron a agitación a 99 rpm durante 2h a una temperatura de 39°C.
- Fase 2°. Transcurrido el tiempo se añadió a las muestras 10 ml de tampón fosfato 0.2M (pH=6.8) y 5 ml de NaOH 0.6M. Tras esto se comprobó



que el pH de las muestras era de 6.8, ajustándolo con NaOH 1M en caso de que fuera necesario. Una vez ajustado el pH se añadió 1 ml de la solución de pancreatina y las muestras se llevaron a agitación a 99 rpm durante 4 h a una temperatura de 39°C.

- Fase 3°. Transcurrido el tiempo se añadieron 10 ml de EDTA 0.2M y se comprobó que el pH era 4.8, ajustándolo si fuera necesario con ác.acético 30%. Por último se añadieron 0.5 ml de viscoyme y se llevo a agitación a 99 rpm durante 18 h a temperatura de 39°C.

La agitación en todas las fases se realizo mediante la incubadora (OVAN, Barcelona, España).

Al finalizar cada una de las fases se tomaron 10 ml de las suspensiones y se centrifugaron, para el caso del caolín a 1500 rpm durante 10 min a 20°C y en el caso de la sepiolita a 1900 rpm durante 10 min a 20°C. Con ello se obtenían 2 ml los cuales no presentaban partículas mayores a 0.5µm.

#### 3.4.2 Fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico acoplado a un espectrómetro de masas con plasma de acoplamiento inductivo (AF4-ICPMS).

La separación de las muestras de caolín y sepiolita obtenidas tras los ensayos de lixiviación y digestión enzimática se llevó a cabo mediante el equipo Postnova AF 2000. El espaciador utilizado en el canal tenía un espesor de 350 µm y la membrana utilizada fue PES (poliestersulfona) de 5KDa.

Para la separación de las muestras de caolín y sepiolita se utilizaron dos programas distintos junto con diversas fases móviles. Las fases móviles utilizadas para la separación fueron SDS a 0.01% con un pH =8, la cual se filtraba previamente mediante un filtro de un tamaño de poro de 0.2µm y agua ultrapura con un pH= 5.50. Los programas que se utilizaron para llevar a cabo la separación de las muestras se muestran a continuación en las distintas tablas:

<b>Programa de separación A (35min)</b>			
Etapa del programa	Tiempo (min)		Crossflow (ml·min <sup>-1</sup> )
Inyección / Focalización	5	Flujo de inyección, 0.2 ml	1
Separación	25	Constante	0.325
	1	Caída lineal	0.325 a 0
	4	Constante	0

Tabla 1. Programa de separación A. Programa optimizado para la caracterización de nanopartículas de Ag, en un rango de tamaños hasta 200 nm .<sup>34</sup>

<b>Programa de separación B (35min)</b>			
Etapa del programa	Tiempo (min)		Crossflow (ml·min <sup>-1</sup> )
Inyección/ Focalización	5	Flujo de inyección, 0.2 ml	1
Separación	25	Caída lineal	1 a 0
	5	Constante	0

Tabla 2. Programa de separación B, lineal, diseñado para cubrir un rango de tamaños mayores al programa A.

En los programas de separación, la inyección fue de 100µL. A la salida del canal se acoplo un detector UV-Vis de diodos, el cual permite recoger señales entre 200-650 nm.

Tras este detector se acopló el equipo ICP-MS. En este se fijo un caudal de introducción de 1ml/min, una adquisición de datos de 20 barridos por segundo y un dwell time de 50 ms. También se fijaron los isotopos a monitorizar los cuales fueron la plata (<sup>107</sup>Ag y <sup>109</sup>Ag), el aluminio (<sup>27</sup>Al), el silicio (<sup>28</sup>Si), el magnesio (<sup>24</sup>Mg), y el rodio (<sup>102</sup>Rh). Los isotopos fijados corresponden a la composición del caolín (<sup>27</sup>Al y <sup>28</sup>Si) y de la sepiolita (<sup>24</sup>Mg y <sup>28</sup>Si), además se fijo el rodio como isotopo a monitorizar ya que fue utilizado como patrón interno, utilizándose una disolución de rodio de 20 ppb en HNO<sub>3</sub> 1%.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

#### **4.1 Determinación del contenido de plata total presente en las muestras de caolín-Ag y sepiolita-Ag.**

La determinación del contenido total de plata presente en los lotes de muestra nos proporciona información sobre la cantidad máxima de plata que va a poder estar disponible para los demás experimentos.

Esta determinación se llevó a cabo de forma inicial sometiendo a las muestras de caolín-Ag y sepiolita-Ag, que se iban a utilizar durante la realización del trabajo, a un ataque ácido. Este ataque se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 3.4.1.1. Tras llevar a cabo el ataque ácido se cuantificó el contenido de plata de las muestras mediante la FAAS. Se preparó una recta de calibrado en un intervalo de concentraciones de 0.5 mg/L a 5 mg/L a partir de un estándar concentrado de plata mediante dilución en HNO<sub>3</sub> al 1% (v/v). En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos.

<i>Lote</i>	<i>Concentración de Ag (mg/L)</i>	<i>% Ag (m/m)</i>
<b>Sepiolita-Ag (V1 G2)</b>	1.76 ± 0.01	0.70 ± 0.002
<b>Caolín-Ag (V1 L11)</b>	1.83 ± 0.03	0.72 ± 0.014

Tabla 4. Concentración y tanto por ciento de plata presente en los lotes de caolín y sepiolita.

Como se observa en la tabla 4, los lotes de caolín-Ag y sepiolita-Ag no muestran grandes diferencias entre sí con respecto a la concentración de plata total que presentan, aunque difieren algo respecto a la concentración dada por el fabricante (aproximadamente 1% (m/m)).

## 4.2 Ensayos de lixiviación en agua ultrapura. Determinación de la cantidad total de plata y de plata iónica.

Los ensayos de lixiviación en agua ultrapura tienen como objetivo modelizar la liberación de plata desde los materiales estudiados en un medio lo más simple posible y caracterizar las formas de plata en las que lo hace. Las AgNPs presentes en el caolín y la sepiolita pueden sufrir diferentes procesos. Así, las nanopartículas pueden liberarse al medio (donde se pueden agregar, modificar su superficie u oxidarse y pasar a  $\text{Ag}^+$ ) u oxidarse directamente y pasar al medio en forma de  $\text{Ag}^+$  (donde se puede llegar formar especies insolubles, o asociarse con otras especies presentes en el medio en forma de especies disueltas) (Figura 5). Como una primera aproximación, se determinó la cantidad de plata total y plata iónica liberada durante el proceso.

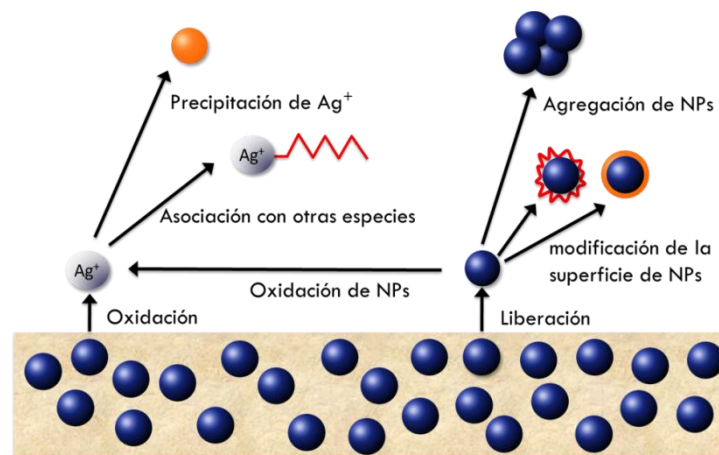


Figura 5. Diagrama de los posibles formas en las que se pueden encontrar la plata en suspensión.<sup>35</sup>

Los ensayos de lixiviación se llevaron a cabo mediante el procedimiento descrito en el apartado 3.4.1.2. La determinación del contenido en plata iónica se realizó mediante un ensayo de ultrafiltración, tal y como se describe en el apartado 3.4.1.3, asumiendo que la única forma de plata presente en el medio que puede atravesar la membrana de ultrafiltración de 3 kDa utilizada es la  $\text{Ag}^+$ . Sin embargo, la presencia de otras formas de plata asociada a especies liberadas desde el material no puede descartarse. La determinación se realizó mediante FAAS al igual que en

el apartado anterior. Los resultados obtenidos en la cuantificación, así como las condiciones de ensayo, se muestran en las tablas 5 y 6.

Muestra	Medio	Tiempo de contacto en agitación	Concentración de plata en el medio (mg/l)	% Ag total liberada respecto al total en el material (m/m)
<i>Caolín-Ag</i>	Agua ultrapura	24 h	14.7 ± 1.5	79.0 ± 9.8
<i>Sepiolita-Ag</i>	Agua ultrapura	24 h	11.4 ± 0.8	62.9 ± 3.4

Tabla 5. Cantidad de plata total liberada desde caolín-Ag y sepiolita-Ag en agua ultrapura en 24 horas.

Muestra	Fracción	Concentración de plata ultrafiltrada en el medio (mg/l)	%Ag UF vs. total liberada
<i>Caolín-Ag</i>	Agua ultrapura	10.8 ± 3.4	73.4 ± 2.8
<i>Sepiolita-Ag</i>	Agua ultrapura	4.3 ± 2.0	37.8 ± 5.04

Tabla 6. Cantidad de plata ultrafiltrada liberada desde caolín-Ag y sepiolita-Ag en agua ultrapura en 24 horas.

En la tabla 5 se puede observar que tanto en el caso del caolín-Ag como en el de la sepiolita-Ag liberan un porcentaje elevado (mayor al 60%) de plata al medio (Figura 6). Esta liberación tiende a ser algo mayor en el caso del caolín-Ag (79.0 ± 9.8 % Ag total liberada) que en el caso de la sepiolita-Ag (62.9 ± 3.4 % Ag total liberada).

La plata liberada desde el caolín-Ag corresponde mayoritariamente (73.4 ± 2.8 %) a plata iónica (o en general a especies de plata con tamaños inferiores a 3 kDa). En el caso de la sepiolita-Ag este porcentaje es considerablemente menor (37.8 ± 5.04 %), lo que sugiere una mayor proporción de plata liberada bien en forma de nanopartículas de plata (que quedarían retenidas en la membrana de

ultrafiltración), o plata presente en el material original en forma de micropartículas que no han sido eliminadas en la etapa de centrifugación previa.

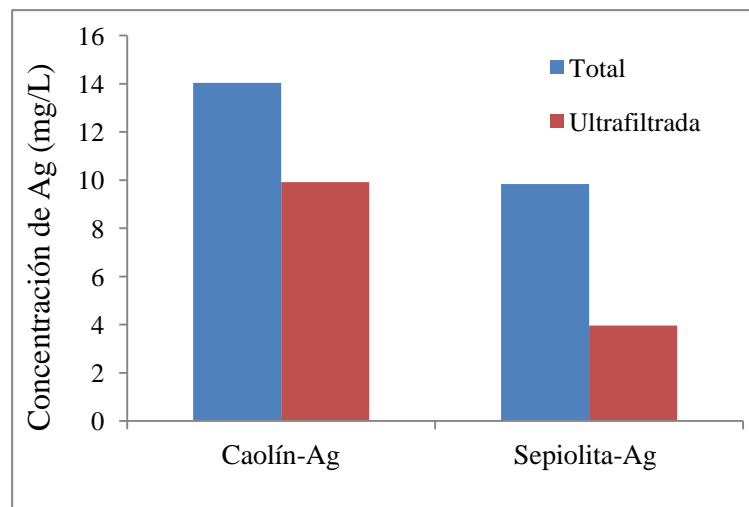


Figura 6. Gráfico de barras correspondiente a las concentraciones de plata total y ultrafiltrada en las muestras de caolín-Ag y sepiolita-Ag.

### **4.3 Detección y caracterización de especies de plata liberada desde el caolín-Ag y sepiolita-Ag en agua ultrapura mediante AF4-ICPMS.**

Para obtener una mayor información acerca de las distintas formas en las que se encuentra la plata liberada en los ensayos de lixiviación, las suspensiones se analizaron mediante AF4-ICPMS.

Para poder observar cómo se comportaban las muestras de caolín-Ag y sepiolita-Ag cuando eran analizadas mediante AF4-ICPMS se realizaron varios ensayos. El primer ensayo consistió en el análisis de las suspensiones de caolín-Ag, caolín sin Ag y de sepiolita-Ag (obtenidas mediante el procedimiento descrito en el apartado 3.4.1.2) utilizando como fase móvil SDS a 0.01% con un pH =8, como programa de separación se utilizó el programa A (apartado 3.4.2) y las condiciones de análisis se utilizaron las fijadas en el apartado 3.4.2.

En las figuras 7, 8 y 9 se muestran los fractogramas de caolín-Ag, caolín sin Ag y sepiolita-Ag.

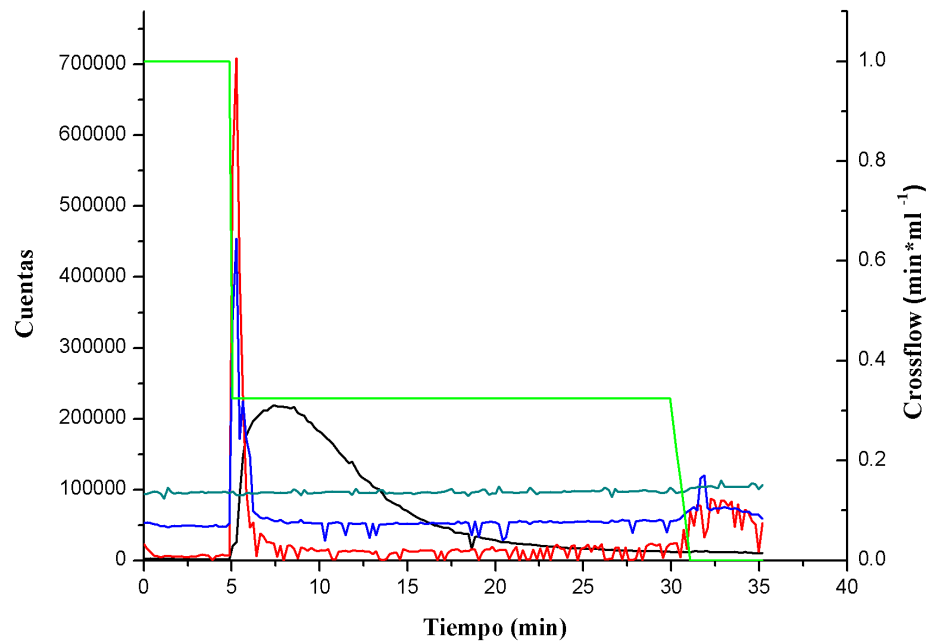


Figura 7. Fractograma correspondiente a la suspensión de caolín-Ag analizada mediante programa A. Representación de cuentas frente a tiempo en minutos. La señal negra corresponde a  $^{107}\text{Ag}$ , la roja a  $^{27}\text{Al}$ , la azul a  $^{28}\text{Si}$  y la verde a  $^{103}\text{Rh}$ . En verde claro se muestra el programa A aplicado en el AF4.

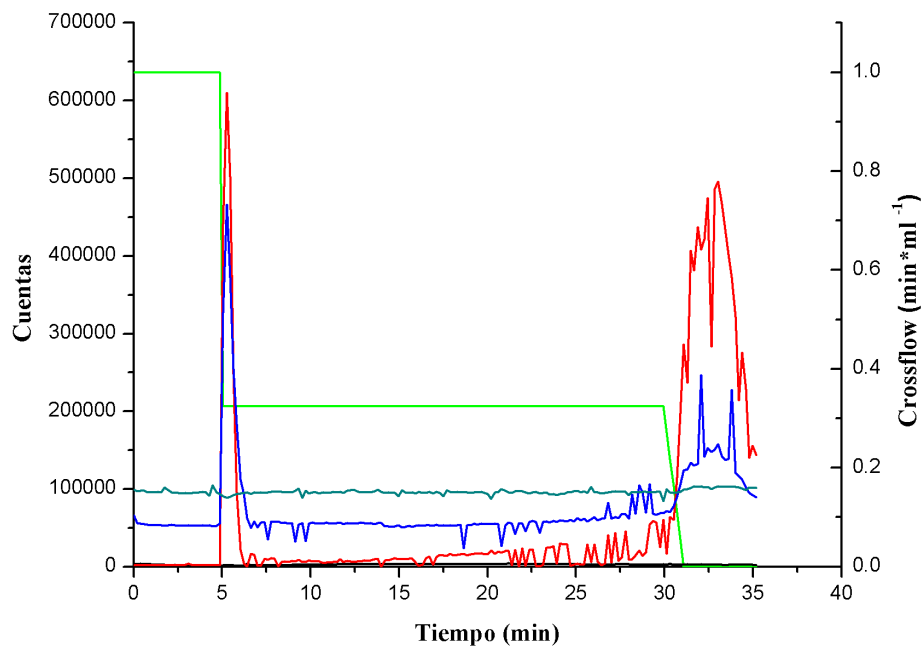


Figura 8. Fractograma correspondiente a la suspensión de caolín sin Ag analizada mediante programa A. Representación de cuentas frente a tiempo en minutos. La señal negra corresponde a  $^{107}\text{Ag}$ , la roja a  $^{27}\text{Al}$ , la azul a  $^{28}\text{Si}$  y la verde a  $^{103}\text{Rh}$ . En verde claro se muestra el programa A aplicado en el AF4.



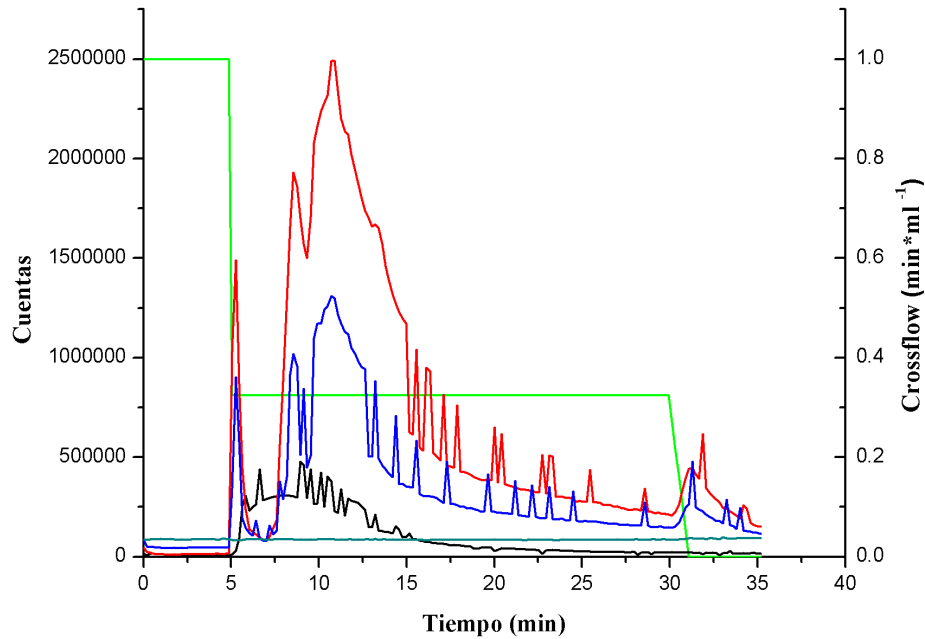


Figura 9. Fractograma correspondiente a la suspensión de sepiolita-Ag analizada mediante programa A. Representación de cuentas frente a tiempo en minutos. La señal negra corresponde a  $^{107}\text{Ag}$ , la roja a  $^{24}\text{Mg}$ , la azul a  $^{27}\text{Si}$  y la verde a  $^{103}\text{Rh}$ . En verde claro se muestra el programa A aplicado en el AF4.

Al observar los fractogramas (Figuras 7, 8 y 9) se puede ver de forma muy clara que el comportamiento del caolín-Ag y el de la sepiolita-Ag analizado mediante AF4-ICPMS es muy distinto. En el caso caolín-Ag se puede ver que entorno a los 8.3 min aparece el pico máximo de plata el cual no se encuentra asociado a ninguno de los componentes del caolín (Al y Si). Además estos componentes comienzan a aparecer en el fractograma cuando el programa casi va a finalizar, en ausencia de crossflow entorno a los 33.3 min. Esta situación también se ve de forma muy clara en el fractograma de caolín sin Ag (Figura 8). Durante casi todo el programa no aparece ningún pico hasta el momento en el que se alcanzan los 33.3 min, a partir de los cuales comienzan a salir los componentes del caolín (Al y Si). Dado que el programa A se diseñó para estudiar AgNPs en un rango de tamaños hasta los 200 nm, se puede deducir que el tamaño de las especies eluidas a esos tiempos es mayor a ese límite. Por otra parte, en el caso de la sepiolita-Ag la plata presente en la suspensión inyectada comienza a ser detectada en torno a los 8.3 min igual que ocurre con en el caolín-Ag, sin embargo, en la sepiolita-Ag a este tiempo también comienzan a aparecer los componentes mayoritarios de la sepiolita (Si y Mg).

Con el fin de poder deducir la naturaleza de las señales de plata obtenidas en las suspensiones de caolín-Ag y sepiolita-Ag, se llevó a cabo otro análisis mediante AF4-ICPMS utilizando un programa de elución distinto (programa B, descrito en el apartado 3.4.2, tratando de ampliar el rango de tamaños), con un portador de agua ultrapura con un pH=5.5.

Estas modificaciones en las condiciones de la separación buscaban evitar posibles interacciones de la plata con componentes presentes en las suspensiones y en el caso del programa de separación mejorar la separación de la plata presente en las muestras, intentando provocar que la plata con mayores tamaños saliera antes y que la fracción que correspondía al caolín y a la sepiolita saliera más tarde. Para ello se modificó el crossflow y el tiempo.

En la figura 10 se muestra el fractograma de caolín-Ag que se obtuvo utilizando las condiciones fijadas en el párrafo anterior.

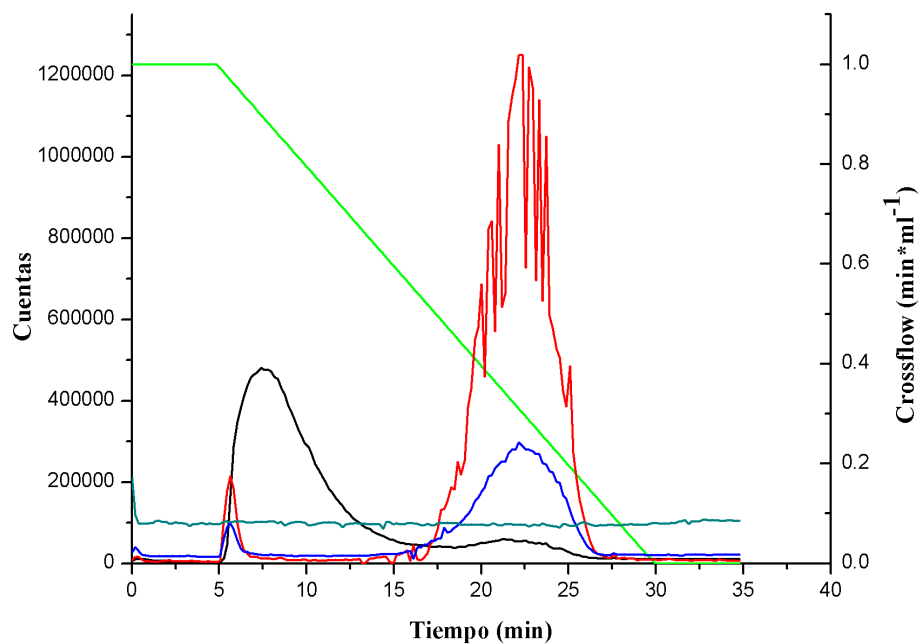
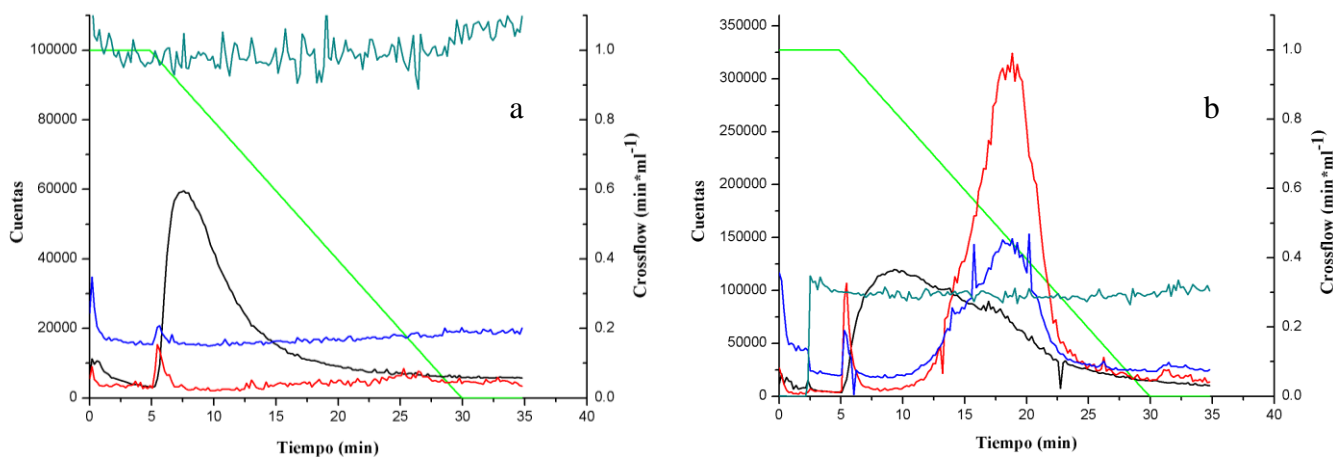


Figura 10. Fractograma correspondiente a la suspensión de caolín- Ag analizada mediante programa B. Representación de cuentas frente a tiempo en minutos. La señal negra corresponde a  $^{107}\text{Ag}$ , la roja a  $^{27}\text{Al}$ , la azul a  $^{28}\text{Si}$  y la verde a  $^{103}\text{Rh}$ . En verde claro se muestra el programa B aplicado en el AF4.

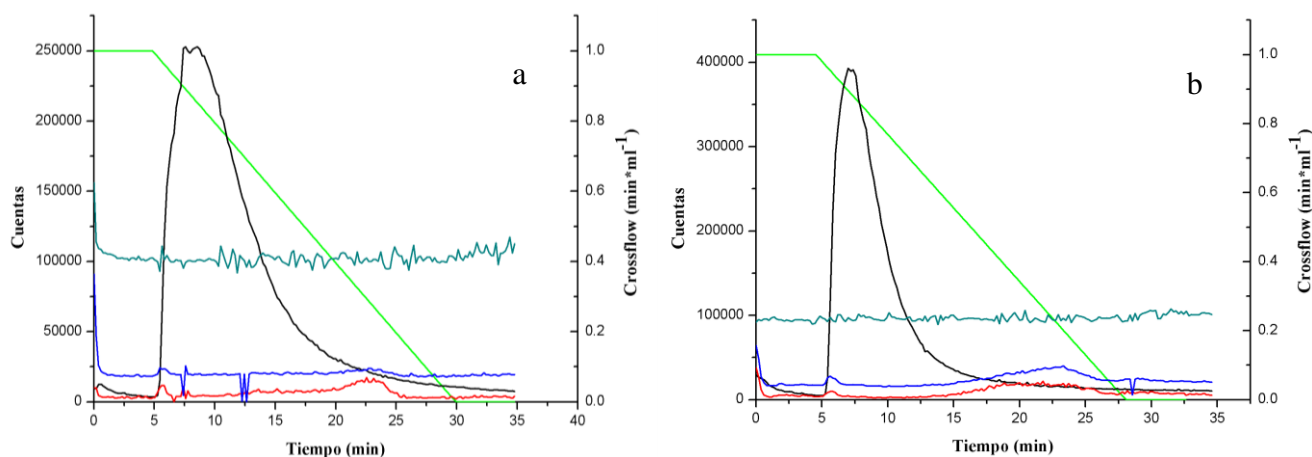
Al comparar el fractograma de la muestra de caolín-Ag obtenido con el programa B (Figura 10) al obtenido con el programa A (Figura 7) se puede observar que se ha conseguido una mejora en la separación produciéndose una separación clara de la plata y de las micropartículas de caolín que permanecen en suspensión. Por otra parte esta mejora en la separación permite ver que una fracción de plata se encuentra asociada a ese caolín, al eluirse al mismo tiempo (21.6 min). En el caso de la sepiolita-Ag sin embargo, no fue posible obtener esta separación, tal y como se discute más adelante (ver figura 14).

Adicionalmente, las muestras de caolín-Ag y sepiolita-Ag obtenidas mediante el procedimiento descrito en el apartado 3.4.1.2 fueron sometidas a otra serie de ensayos, con el objetivo de aclarar la naturaleza de ese primer pico de plata. En el caso de las muestras de caolín-Ag, éstas se sometieron a una dilución (1:10) con fase móvil utilizada para este análisis, a una filtración mediante un filtro de  $0.45\mu\text{m}$ , a un proceso de ultrafiltración (apartado 3.4.1.3) y a una modificación de pH (6 a 3) mediante la adición de  $\text{HNO}_3$  al 1% (v/v). Por otra parte, las muestras de sepiolita-Ag fueron sometidas a una filtración mediante un filtro de  $0.45\mu\text{m}$ .

En las figuras 11 (a y b) y 12 (a y b), se muestran los fractogramas de caolín-Ag que se obtuvieron utilizando las condiciones fijadas en el párrafo anterior.



Figuras 11 (a y b). Fractogramas correspondientes a las suspensiones de caolín-Ag analizadas mediante programa B en las que se ha realizado una dilución 1:10 (a) y un cambio de pH (b). Representación de cuentas frente a tiempo en minutos. La señal negra corresponde a  $^{107}\text{Ag}$ , la roja a  $^{27}\text{Al}$ , la azul a  $^{28}\text{Si}$  y la verde a  $^{103}\text{Rh}$ . En verde claro se muestra el programa B aplicado en el AF4.



Figuras 12 (a y b). Fractogramas correspondientes a las suspensiones de caolín-Ag analizadas mediante programa B en las que se ha realizado una filtración de 0.45 µm (a) y una ultrafiltración (b). Representación de cuentas frente a tiempo en minutos. La señal negra corresponde a  $^{107}\text{Ag}$ , la roja a  $^{27}\text{Al}$ , la azul a  $^{28}\text{Si}$  y la verde a  $^{103}\text{Rh}$ . En verde claro se muestra el programa B aplicado en el AF4.

La figura 11 a, la cual fue sometida a una dilución (1:10), muestra una señal proporcional a la obtenida sin diluir, lo que indica que esa señal es proporcional a la concentración de plata en el medio.

En la Figura 11 b, correspondiente al fractograma obtenido por la muestra de caolín-Ag en la que se realizó un cambio en el pH mediante acidificación, se puede observar que la acidez del medio tiene un efecto sobre la intensidad de la primera señal de plata en disolución ya que se produce una disminución en la plata detectada, además de una modificación en los tiempos de elución del pico correspondiente al caolín (señal asociada a Al y Si). A la vista de este resultado podría deducirse que la aparición de ese primer pico de Ag está relacionado con el pH del medio, de forma que un menor pH en el medio hace disminuir ese pico.

Debido a este resultado se decidió investigar si la composición del caolín y la sepiolita provocaban diferencias significativas entre sí con respecto al pH cuando estos eran puestos en suspensión. Para ello se realizó el proceso de lixiviación descrito en el punto 3.4.1.2. Tras este proceso se midió el pH que presentaban las muestras mediante un pH-metro. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 7.

<i>Lote</i>	<i>Media pH</i>
<b>Sepiolita-Ag (V1 G2)</b>	7.7 ± 0.8
<b>Caolín-Ag (V1 L11)</b>	7.8 ± 0.6

Tabla 7. pH medio que presentan los lotes de caolín y sepiolita.

Los resultados obtenidos no presentan grandes diferencias entre ellos, por lo que la composición de las muestras no es un factor que influya en pH del medio. Sin embargo, el pH generado por la muestra de caolín sin Ag es ligeramente ácido con lo que el proceso de plateado modifica de alguna manera el pH final de los lixiviados.

Por otra parte, las figuras 12 a y b, muestran los fractogramas de las muestras de caolín-Ag sometidas a filtración (a) y ultrafiltración (b). En ambos casos, no aparecen las señales correspondientes a las partículas de caolín, lo que indica unos tamaños del orden de 0,3-0,5  $\mu\text{m}$  para estas partículas (de acuerdo al tamaño de corte del filtro utilizado), lo que es coherente con los tiempos observados en los fractogramas de la figura 10. Por otro lado, la presencia del pico de plata a 8,3 min en la figura 12 b, tras someter la muestra a un proceso de ultrafiltración, indica que esa plata corresponde a plata iónica o asociada a especies de bajo peso molecular (inferior a 3 kDa), y que en principio no debería eluirse a través del canal, sino filtrarse a través de la membrana de permeación del canal, que tiene un tamaño de poro de 5 kDa. Una explicación a este comportamiento podría ser la formación de alguna especie insoluble en el interior del canal durante la etapa de focalización y separación, debido a modificaciones en el entorno del analito (plata), tanto de fuerza iónica como de pH.

En la figura 13 se puede observar cómo se va modificando la presencia de plata en la muestra conforme se aplican los procesos de filtración, ultrafiltración y modificación del pH, además de cómo estos procesos eliminan o reducen la presencia de caolín en las muestras.

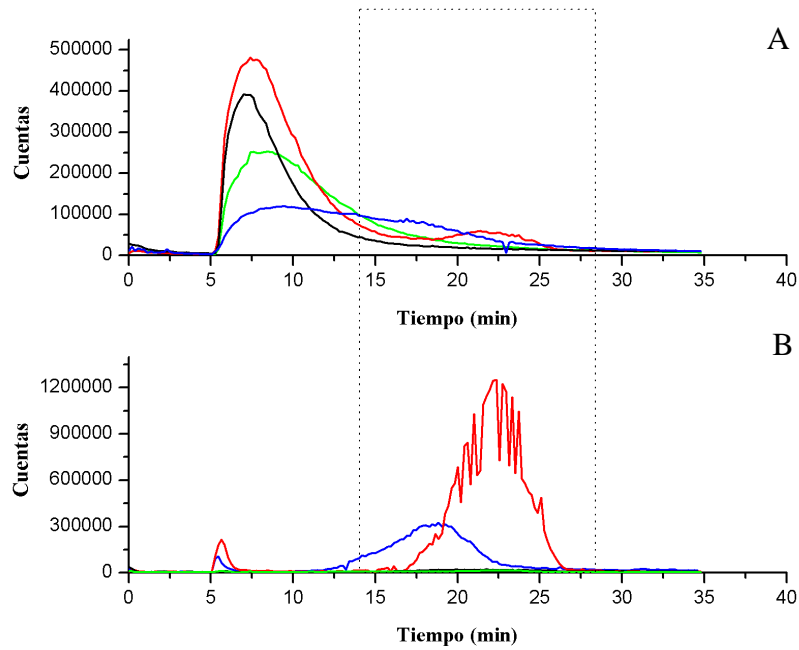


Figura 13. Fractograma A correspondiente a la señal de  $^{107}\text{Ag}$  y fractograma B correspondiente a las señales de  $^{27}\text{Al}$ . Representación de cuentas frente a tiempo en minutos. La señal roja corresponde a la muestra de caolín-Ag, la negra corresponde a la muestra de caolín-Ag filtrada, la verde a la muestra de caolín-Ag ultrafiltrada y la azul corresponde a la muestra de caolín-Ag acidificada.

Adicionalmente, y con el fin de poder comparar estos efectos observados a través de los fractogramas, se llevó a cabo la determinación de la concentración de plata en las muestras a través del análisis de los fractogramas obtenidos. Los resultados se muestran en la tabla 8.

	<i>Concentración (<math>\mu\text{g/L}</math>)</i>
<b>Caolín-Ag</b>	3.7
<b>Caolín-Ag + filtración 0.45 <math>\mu\text{m}</math></b>	2.6
<b>Caolín-Ag + ultrafiltración</b>	2.44
<b>Caolín-Ag + acidificación</b>	1.94

Tabla 8. Concentración de plata presente en las muestras de caolín-Ag.

Las concentraciones obtenidas confirman las afirmaciones expresadas en párrafos anteriores ya que los procesos que se han realizado han provocado una disminución de la plata presente en las muestras. Además, la concentración de plata obtenida en la muestra de ultrafiltración y comparada con la original de caolín-Ag,

nos da una estimación por diferencia de la cantidad de plata que se encuentra asociada al caolín ( $\approx 1.2 \mu\text{g/L}$  de Ag). Mediante este dato se puede determinar que entorno a  $2,45 \mu\text{g/L}$  corresponderían a plata iónica y a especies de plata con tamaños inferiores a 3 kDa. De esa fracción, una parte importante se eluiría como una especie insoluble a tiempos de retención de 8.3 min, probablemente en modo estérico (es decir, de tamaños superiores a  $1 \mu\text{m}$ ), tal y como se ha deducido mediante trabajos realizados por otros miembros del grupo de investigación.

En las figuras 14 y 15 se muestran los fractogramas de sepiolita-Ag que se obtuvieron utilizando las condiciones fijadas anteriormente.

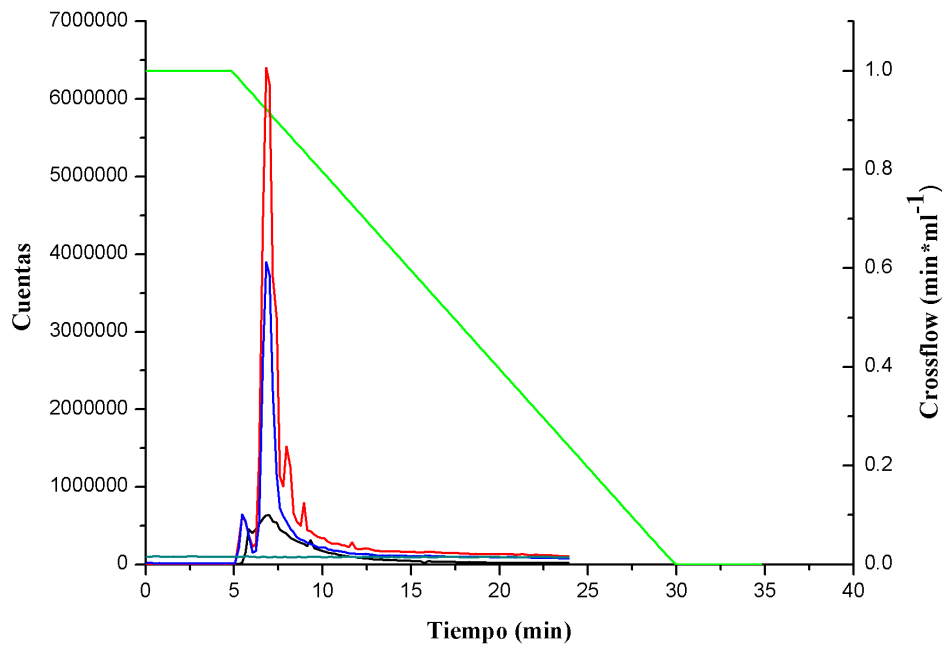


Figura 14. Fractograma correspondiente a la suspensión de sepiolita-Ag analizada mediante programa B. Representación de cuentas frente a tiempo en minutos. La señal negra corresponde a  $^{107}\text{Ag}$ , la roja a  $^{24}\text{Mg}$ , la azul a  $^{27}\text{Si}$  y la verde a  $^{103}\text{Rh}$ . En verde claro se muestra el programa B aplicado en el AF4.

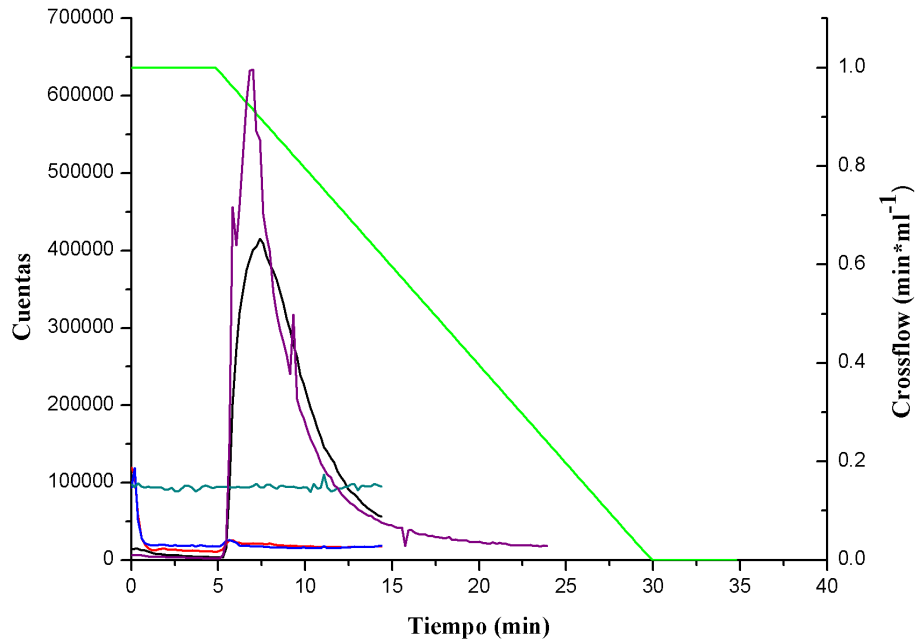


Figura 15. Fractograma correspondiente a la suspensión de sepiolita-Ag filtrada analizada mediante programa B. Representación de cuentas frente a tiempo en minutos. La señal negra corresponde a  $^{107}\text{Ag}$ , la roja a  $^{24}\text{Mg}$ , la azul a  $^{27}\text{Si}$  y la verde a  $^{103}\text{Rh}$ . La señal morada corresponde a la señal de  $^{107}\text{Ag}$  de la sepiolita-Ag. En verde claro se muestra el programa B aplicado en el AF4.

En la figura 14, correspondiente al fractograma de sepiolita-Ag, se observa que en este caso el cambio de programa no ha influido en la separación de la muestra ya que se sigue viendo que la plata sale al mismo tiempo que la sepiolita (7.5 min) (figura 9), por lo que se puede suponer que una parte de la plata en la muestra se encuentra asociada a la sepiolita. Cuando se lleva a cabo la filtración de la muestra, con el fin de eliminar la sepiolita presente, se puede seguir observando como aparece plata en el fractograma (Figura 15). Esta plata correspondería a especies de la misma naturaleza que las observadas en el caso del caolín-Ag (es decir, especies insolubles que se forman en el interior del canal durante la etapa de focalización/separación) y que saldrían casi al mismo tiempo (7.7 min) que la plata asociada a la sepiolita.

De la misma manera que en el caso anterior, se ha estimado la concentración de plata en las muestras a través del análisis de los fractogramas obtenidos. Los resultados se muestran en la tabla 9.



	<i>Concentración (<math>\mu\text{g/L}</math>)</i>
<b>Sepiolita-Ag</b>	4.74
<b>Sepiolita-Ag + filtración 0.45 <math>\mu\text{m}</math></b>	2.1

Tabla 9. Concentración de plata presente en las muestras de sepiolita-Ag.

Estos resultados indican que una cantidad elevada de la plata presente en la muestra se encuentra asociada a la sepiolita, en torno a 2.6  $\mu\text{g/L}$  de plata. Esta concentración se obtiene si se tiene en cuenta la concentración total de plata (4.74  $\mu\text{g/L}$ ) y la concentración de plata relacionada con el resto de las especies (2.1  $\mu\text{g/L}$ ), dentro de las cuales se encontraría la plata iónica y especies de plata con tamaños inferiores a 3 kDa.

#### **4.4 Ensayos de digestión enzimática con caolín-Ag y sepiolita-Ag. Determinación de la cantidad de plata total liberada.**

Una vez estudiado el comportamiento de los materiales objeto de estudio en agua ultrapura, se realizaron los ensayos descritos por Boison y Fernández<sup>33</sup> y recogido en el apartado 3.4.1.4. Este tipo de ensayos buscan presentar un modelo para la evaluación la digestibilidad de los nutrientes sin necesidad de utilizar animales para ello. En primer lugar, se cuantificó la cantidad de plata liberada en cada una de las fases de los ensayos de digestión.

Las muestras de caolín-Ag y sepiolita-Ag fueron tratadas mediante el procedimiento explicado en el apartado 3.4.1.4. Las muestras que se obtenían al finalizar este procedimiento eran diluidas (1:10) con HCl 5% (v/v) para su posterior cuantificación mediante ICP-MS. Para ello se preparó en una recta de calibrado de 5 puntos con concentraciones de 1 ppb, 10 ppb, 50 ppb, 100 ppb y 500ppb, preparadas a partir de un estándar de plata por dilución en HNO<sub>3</sub> 1% (v/v).

Los valores obtenidos en los ensayos para el caso del caolín-Ag y la sepiolita-Ag se muestran en las tablas 11 y 12 respectivamente.

<i>Fase</i>	<i>Concentración de Ag en el medio (<math>\mu\text{g/l}</math>)</i>	<i>% Ag total liberada respecto al total en el material (m/m)</i>
<b>1°</b>	$7.0 \pm 0.6$	$0.85 \pm 0.01$
<b>2°</b>	$233.0 \pm 25.7$	$30.8 \pm 5.0$
<b>3°</b>	$291.0 \pm 2.5$	$35.8 \pm 1.3$

Tabla 11. Cantidad de plata presente en cada una de las fases del ensayo de digestión enzimática, para las muestras de caolín-Ag.

<i>Fase</i>	<i>Concentración de Ag en el medio (<math>\mu\text{g/l}</math>)</i>	<i>% Ag total liberada respecto al total en el material (m/m)</i>
<b>1°</b>	$2.7 \pm 1.4$	$0.35 \pm 0.17$
<b>2°</b>	$21.4 \pm 9.4$	$2.9 \pm 1.3$
<b>3°</b>	$27.0 \pm 4.1$	$3.3 \pm 0.5$

Tabla 12. Cantidad de plata presente en cada una de las fases del ensayo de digestión enzimática, para las muestras de sepiolita-Ag.

En las tablas se encuentran representados la cantidad de plata cuantificada y el tanto por ciento de plata liberada respecto a la cantidad presente en el material original para cada una de las fases analizadas, teniendo en cuenta que la plata presente en el material era de 0.72 % y 0.70 % (m/m) respectivamente.

Para ambos materiales se puede observar cómo se produce un aumento de la liberación de plata conforme pasan las fases. En la fase 1° la liberación de plata, tanto para el caolín-Ag ( $0.85 \pm 0.01$  %) como para la sepiolita-Ag ( $0.35 \pm 0.17$  %), es muy baja llegando a no alcanzar en ninguno de los casos el 1%. Esta situación podría deberse a la formación y precipitación de la plata en forma de AgCl, debido a que en el medio se encuentran presentes cloruros procedentes del HCl utilizado en esta fase. Este hecho se vio confirmado con el análisis mediante FESEM de los materiales tras el tratamiento con HCL 0.01% realizados por otros miembros del

grupo de investigación. Con respecto a la fase 2° la liberación de plata aumenta tanto para el caolín-Ag ( $30.8 \pm 5.0$  %) como para la sepiolita-Ag, aunque en este caso en una menor extensión ( $2.9 \pm 1.3$  %). Este aumento se produce probablemente por la redisolución de parte de AgCl formado en la fase 1°, debido a la incorporación en esta fase de una nueva enzima (pancreatina), pudiendo formar complejos con la plata y favoreciendo el desplazamiento del equilibrio de precipitación hacia su disolución. La liberación de plata en el caolín-Ag y en la sepiolita-Ag sigue aumentado en la fase 3°, sin embargo en esta fase lo hace de forma menos acusada. Teniendo en cuenta que cada una de las fases se realiza una vez concluida la etapa anterior (es decir, que la suspensión de la fase 3 es el resultado de haber sometido el material previamente a las fases 1 y 2), parece lógico pensar que el contenido en plata se mantenga constante o aumente al ir avanzando en el proceso digestivo, tal y como se observa.

Ahora bien, este aumento en la liberación de plata que se produce a lo largo del ensayo de digestión enzimática no se da de igual manera en el caolín-Ag que en la sepiolita-Ag. El caolín-Ag con respecto a la sepiolita-Ag, presenta una mayor liberación de plata en todas las fases del ensayo. Esta situación podría verse relacionada con la forma del material, siendo en el caso de la sepiolita más compleja (por su estructura laminar, con una mayor porosidad<sup>36</sup>) lo que podría dificultar la liberación de plata al medio. Esta situación se ha observado en otros estudios en los cuales la sepiolita era utilizada como soporte de nanopartículas (plata<sup>37</sup> o cobre<sup>38</sup>). Esta diferencia sería en cambio mucho mayor a la observada en agua ultrapura.

En la figura 19 se pueden observar las diferencias que existen entre el caolín-Ag y la sepiolita-Ag con respecto al % de Ag liberada en cada una de las fases del ensayo de digestión enzimática.

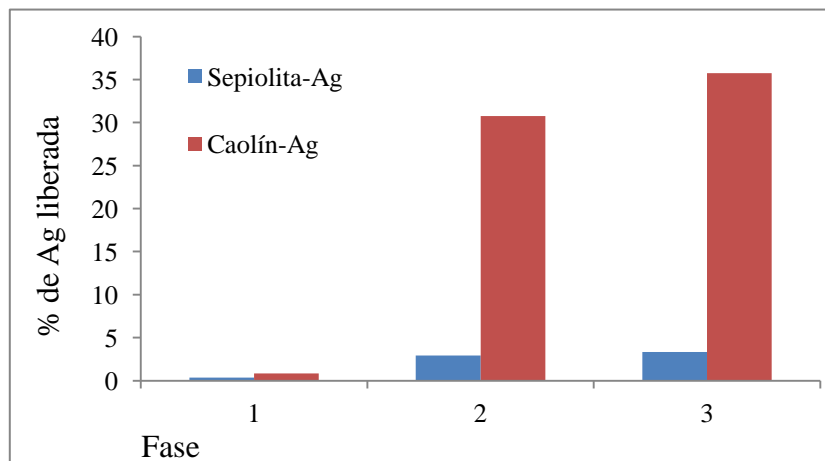


Figura 19. Grafico de barras representando el tanto por ciento de Ag liberada en cada una de las fases del ensayo de digestión enzimática con el caolín-Ag y en la sepiolita-Ag.

### **4.5 Detección y caracterización de especies de plata liberada desde la sepiolita-Ag en ensayos de digestibilidad mediante AF4-ICPMS.**

Con el objetivo de obtener más información sobre las formas de plata movilizadas en los ensayos de digestión enzimática, las suspensiones de las distintas fases obtenidas en los ensayos con sepiolita-Ag fueron analizadas mediante AF4-ICPMS. Se analizaron las muestras correspondientes únicamente a sepiolita-Ag ya que las correspondientes al caolín-Ag habían sido analizadas previamente por otros miembros del grupo.

Para poder observar cómo se comportaban las muestras de sepiolita-Ag cuando eran analizadas mediante AF4-ICPMS se realizó un primer análisis. Para ello se analizaron la fase 1, 2 y 3 (obtenidas mediante el procedimiento descrito en el apartado 3.4.1.4) utilizando como fase móvil SDS a 0.01% con un pH =8, el programa A (apartado 3.4.2) como programa de separación y las condiciones de análisis descritas en el apartado 3.4.2.

En las figuras 16 (a y b), 17 y 18 (a y b) se muestran los fractogramas para cada una de las fases (1, 2 y 3 respectivamente).

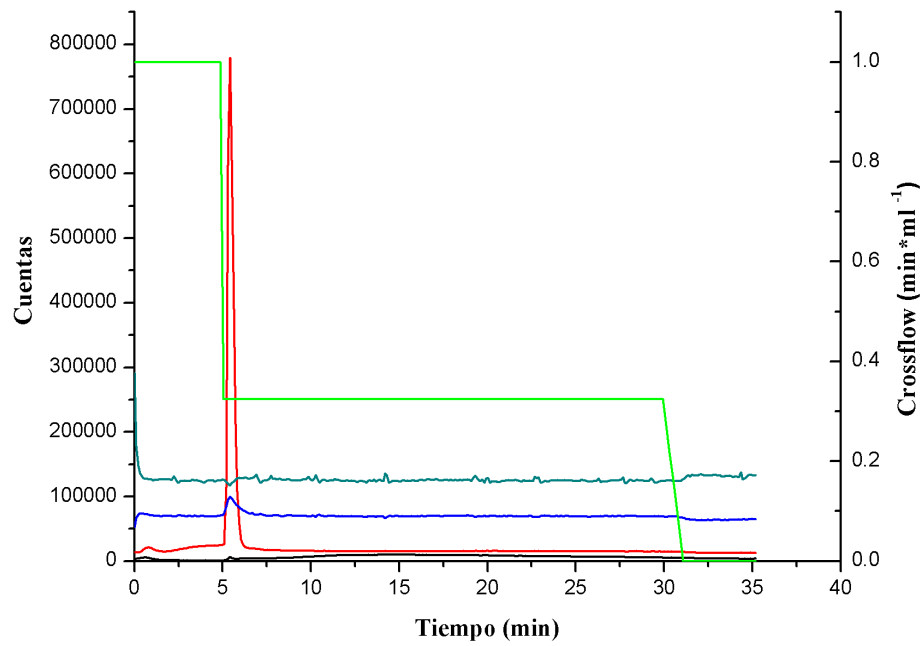


Figura 16 a. Fractograma correspondiente a la fase 1 analizada mediante programa A. Representación de cuentas frente a tiempo en minutos. La señal negra corresponde a  $^{107}\text{Ag}$ , la roja a  $^{24}\text{Mg}$ , la azul a  $^{27}\text{Si}$  y la verde a  $^{103}\text{Rh}$ . En verde claro se muestra el programa A aplicado en el AF4.

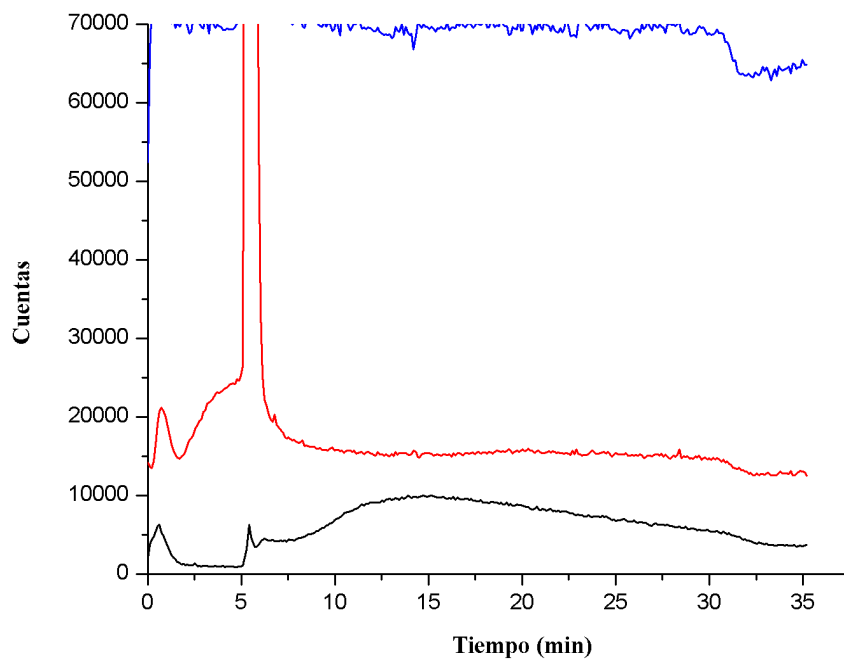


Figura 16 b. Fractograma ampliado de la señal de  $^{107}\text{Ag}$  correspondiente a la fase 1. Representación de cuentas frente a tiempo en minutos. La señal negra corresponde a  $^{107}\text{Ag}$ , la roja a  $^{24}\text{Mg}$  y la azul a  $^{27}\text{Si}$ .

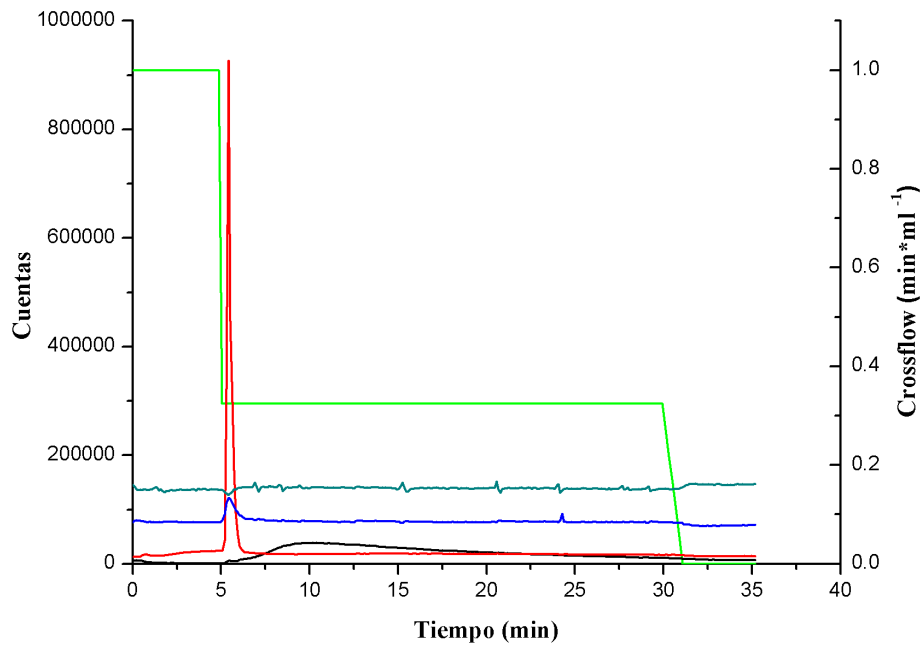


Figura 17. Fractograma correspondiente a la fase 2 analizada mediante programa A. Representación de cuentas frente a tiempo en minutos. La señal negra corresponde a  $^{107}\text{Ag}$ , la roja a  $^{24}\text{Mg}$ , la azul a  $^{27}\text{Si}$  y la verde a  $^{103}\text{Rh}$ . En verde claro se muestra el programa A aplicado en el AF4.

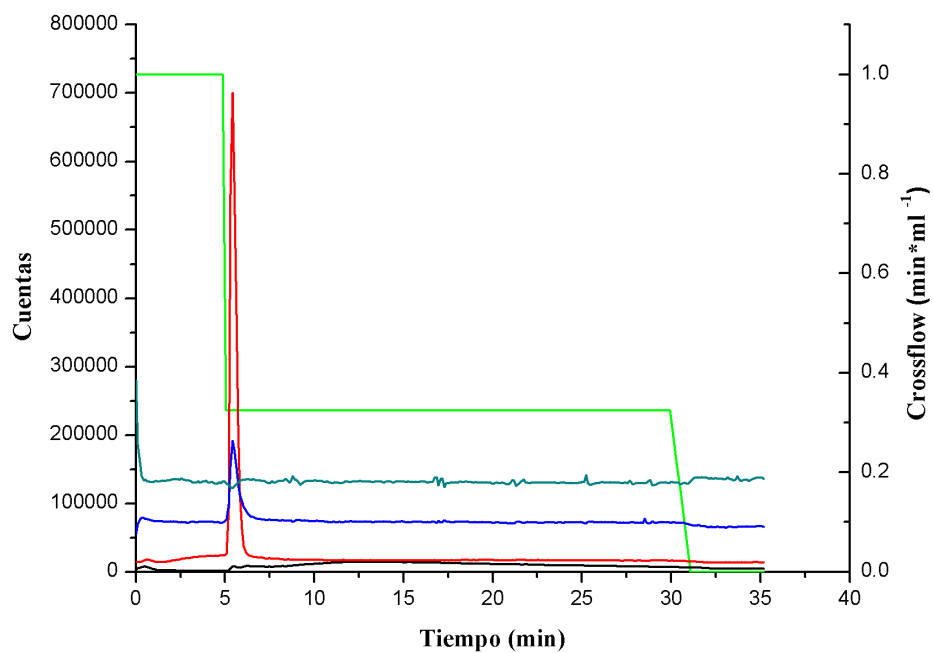


Figura 18 a. Fractograma correspondiente a la fase 3 analizada mediante programa A. Representación de cuentas frente a tiempo en minutos. La señal negra corresponde a  $^{107}\text{Ag}$ , la roja a  $^{24}\text{Mg}$ , la azul a  $^{27}\text{Si}$  y la verde a  $^{103}\text{Rh}$ . En verde claro se muestra el programa A aplicado en el AF4.

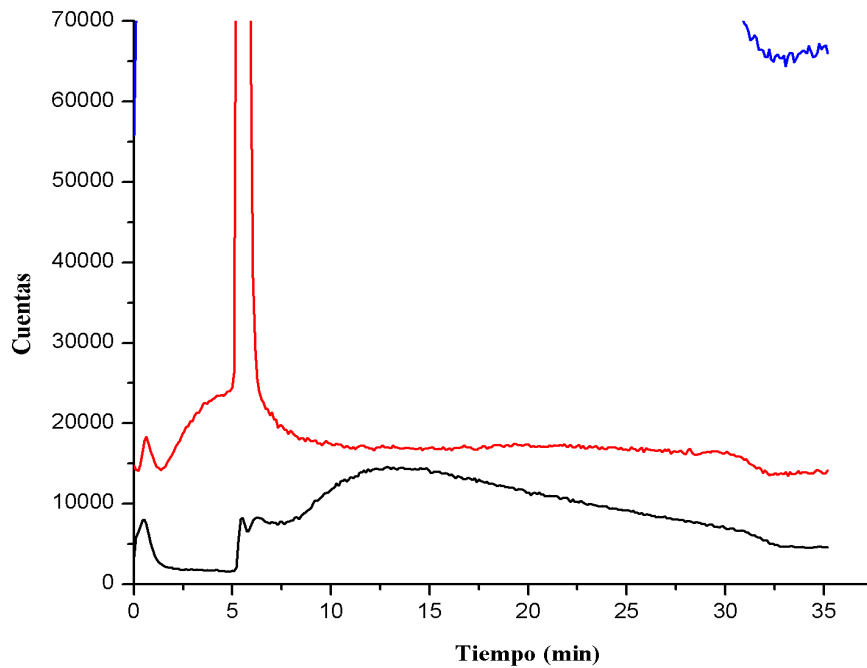


Figura 18 b. Fractograma ampliado de la señal de  $^{107}\text{Ag}$  correspondiente a la fase 3. Representación de cuentas frente a tiempo en minutos. La señal negra corresponde a  $^{107}\text{Ag}$ , la roja a  $^{24}\text{Mg}$  y la azul a  $^{27}\text{Si}$ .

Si se comparan los fractogramas obtenidos con los correspondientes a los ensayos en agua ultrapura descritos en el apartado 4.3, se observa que en los ensayos de digestibilidad no aparecen partículas de sepiolita, al no obtenerse señal correspondiente a Si o Mg, salvo la correspondiente al voidpeak. Es posible que un aumento en la fuerza iónica del medio lleve a una agregación de estas partículas haciendo que se eliminen durante la etapa de centrifugación. Por otro lado, el pico de Ag que se obtiene, similar en las tres fases, aparece a tiempos mayores respecto al obtenido en los ensayos en agua ultrapura. Si comparamos los fractogramas de las tres fases entre sí, se puede ver que en el de la fase 2 la señal de plata es mucho más notable que en los de la fase 1 y 3. En la tabla 10 se presentan los resultados obtenidos al cuantificar la concentración de plata en las muestras a través del análisis de los fractogramas obtenidos.

	<i>Concentración de Ag en el medio (<math>\mu\text{g/L}</math>)</i>	<i>% Ag total liberada respecto al total en el material (m/m)</i>
<b>Fase 1</b>	0.98	4.58
<b>Fase 2</b>	4.39	28.67
<b>Fase 3</b>	1.10	8.91

Tabla 10. Concentración de plata presente en las distintas fases del ensayo de digestión enzimática de la muestra de sepiolita-Ag y tanto por ciento de plata liberada respecto al total del material.

En el caso de la fase 2, la concentración de plata estimada se encuentra alejada de los resultados de concentración obtenidos en el apartado 4.4. Esta situación puede ser el resultado de una contaminación de la membrana, ya que esta fase se inyectó después de la fase 3. Por otra parte las concentraciones de plata obtenidas en las fases 1 y 3, aunque superiores a las obtenidas en el apartado 4.4, podrían ser consideradas adecuadas. Respecto a la naturaleza de esta señal, podría considerarse similar a las obtenidas en los ensayos con agua ultrapura, de forma que correspondiera a una fracción de plata en disolución que sufriera cambios durante la fase de separación en el interior del canal.



## **5. CONCLUSIONES.**

A lo largo de este trabajo se ha demostrado que el uso combinado de diferentes técnicas de caracterización y cuantificación, concretamente ultrafiltración y fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF4) acopladas a ICP-MS, permiten obtener información sobre las formas de plata liberadas desde diferentes soportes arcillosos recubiertos de nanopartículas de plata utilizados en alimentación animal. Estas técnicas se han utilizado en ensayos de lixiviación en medios sencillos (agua ultrapura) y en ensayos de digestibilidad enzimática *in vitro*.

A través de los resultados obtenidos se puede concluir que:

La liberación de plata desde el soporte al medio depende en gran medida del tipo de soporte utilizado. Cuando se utiliza caolín como soporte de las nanopartículas de plata, la liberación de la plata al medio se produce en forma de plata iónica o en forma de plata unida a especies de bajo peso molecular; sin embargo cuando se utiliza sepiolita, la plata que permanece en suspensión se encuentra mayoritariamente en forma de plata unida a micropartículas de sepiolita, probablemente por la menor eficacia en la eliminación de micropartículas pequeñas de estructura laminar mediante centrifugación. Además la cantidad de plata liberada difiere en gran medida entre un material y otro, siendo la cantidad liberada menor para el caso de la sepiolita debido probablemente a su estructura laminar y mayor porosidad, junto con su capacidad de intercambio iónico.

El contenido de plata liberada desde los materiales estudiados aumenta en las distintas fases del proceso digestivo *in vitro* estudiado, siendo mucho mayor en el caso del caolín-Ag. La información obtenida mediante AF4 no ha permitido aclarar las formas de Ag presentes en los medios enzimáticos, probablemente por cambios en la composición durante la etapa de separación, por lo que no se puede afirmar que las nanopartículas de plata presentes en los materiales pasen al medio digestivo.

Estos estudios pueden servir de apoyo a aquellos que requieran de una toma de decisión en cuanto a qué materiales utilizar en ensayos *in vivo* con animales y permitir explicar algunos de los efectos observados en animales sometidos a este tipo de ensayos.

## **6. BIBLIOGRAFÍA.**

1. Shervani, Z., Ikushima, Y., Sato, M., Kawanami, H., Hakuta, Y., Yokoyama, T., Nagase, T., Kuneida, H y Aramaki, K. (2008). Morphology and size-controlled synthesis of silver nanoparticles in aqueous surfactant polymer solutions. *Colloid and Polymer Science*, 286,403–410.
2. Martinez-Castanon, G. A., Nino-Martinez, N., Martinez-Gutierrez, F., Martinez-Mendoza, J. R., & Ruiz, F. (2008). Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(8), 1343-1348.
3. Tan, H., Santbergen, R., Smets, A. H., y Zeman, M. (2012). Plasmonic light trapping in thin-film silicon solar cells with improved self-assembled silver nanoparticles. *Nano letters*, 12(8), 4070-4076.
4. Shrivastava, K., Sahu, S., Patra, G. K., Jaiswal, N. K., y Shankar, R. (2016). Localized surface plasmon resonance of silver nanoparticles for sensitive colorimetric detection of chromium in surface water, industrial waste water and vegetable samples. *Analytical Methods*, 8(9), 2088-2096.
5. Kreuzer, M. P., Quidant, R., Badenes, G y Marco, M. P. (2006). Quantitative detection of doping substances by a localised surface plasmon sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 21 (7), 1345-1349.
6. Cuenya, B. R. (2010). Synthesis and catalytic properties of metal nanoparticles: Size, shape, support, composition, and oxidation state effects. *Thin Solid Films*, 518(12), 3127-3150.
7. Santos, K. D. O., Elias, W. C., Signori, A. M., Giacomelli, F. C., Yang, H., y Domingos, J. B. (2012). Synthesis and catalytic properties of silver nanoparticle–linear polyethylene imine colloidal systems. *The Journal of Physical Chemistry C*, 116(7), 4594-4604

8. Khodadadi, B., Bordbar, M., y Nasrollahzadeh, M. (2017). Achillea millefolium L. extract mediated green synthesis of waste peach kernel shell supported silver nanoparticles: Application of the nanoparticles for catalytic reduction of a variety of dyes in water. *Journal of Colloid and Interface Science*, 493, 85-93.
9. Ramirez, A., Hueso, J. L., Suarez, H., Mallada, R., Ibarra, A., Irusta, S., y Santamaria, J. (2016). A Nanoarchitecture Based on Silver and Copper Oxide with an Exceptional Response in the Chlorine- Promoted Epoxidation of Ethylene. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(37), 11158-11161.
10. Lu, Q., Rosen, J., Zhou, Y., Hutchings, G. S., Kimmel, Y. C., Chen, J. G., y Jiao, F. (2014). A selective and efficient electrocatalyst for carbon dioxide reduction. *Nature Communications*, 5, 3242.
11. Pandey, S., Goswami, G. K., y Nanda, K. K. (2012). Green synthesis of biopolymer–silver nanoparticle nanocomposite: An optical sensor for ammonia detection. *International journal of biological macromolecules*, 51(4), 583-589.
12. Ruparelia, J.P., Chatterjee, A.K., Duttagupta, S.P. y Mukheriji, S. (2008). Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 4: 707–716.
13. Zhang, X.F., Liu, Z.G., Shen,W., y Gurunathan, S. (2016). Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1534.
14. Hill, E. K., y Li, J. (2017). Current and future prospects for nanotechnology in animal production. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(1), 26.

15. Lefkowitz, D.L., y Lefkowitz, S.S. (2000) Glyconutritionals: implications in antimicrobial activity. *GlycoScience & Nutrition*, 1(22) ,1-4.
16. Unión Europea. Reglamento N° 18321/2003, de 22 de septiembre de 2003, sobre los aditivos en la alimentación animal. Diario oficial de la Unión Europea, 18 de octubre de 2003.
17. Fondevila, M., Herrero, R., Casallas, M. C., Abecia, L., y Duchá, J. J. (2009). Silver nanoparticles as a potential antimicrobial additive for weaned pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 150(3), 259-269.
18. Ahmadi, F., y Branch, S. (2012). Impact of different levels of silver nanoparticles (Ag-NPs) on performance, oxidative enzymes and blood parameters in broiler chicks. *Pakistan Veterinary Journal*, 32(3), 325-328.
19. Cromwell, G. L. (1991). Antimicrobial agents. *Swine Nutrition*, 297-314.
20. Andi, M. A., Mohsen, H., y Farhad, A. (2011). Effects of feed type with/without nanosil on cumulative performance: Relative organ weight and some blood parameters of broilers. *Global Veterinary*, 7, 605-609.
21. Liu, J. F., Yu, S. J., Yin, Y. G., y Chao, J. B. (2012). Methods for separation, identification, characterization and quantification of silver nanoparticles. *Trends in Analytical Chemistry*, 33, 95-106.
22. Laborda, F., Bolea, E., Cepriá, G., Gómez, M. T., Jiménez, M. S., Pérez-Arantegui, J., y Castillo, J. R. (2016). Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: a review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples. *Analytica Chimica acta*, 904, 10-32.
23. De la Calle, I., Menta, M., y Séby, F. (2016). Current trends and challenges in sample preparation for metallic nanoparticles analysis in

- daily products and environmental samples: A review. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 125, 66-96.
24. Surugau, N y Urban, P.L. (2009). Electrophoretic methods for separation of nanoparticles. *Journal of Separation Science*, 32, 1889-1906.
25. Tiede, K., Boxall, A.B.A., Tiede, D., Tear, S.P., David, H y Lewis, J. (2009) A robust size characterisation methodology for studying nanoparticle behaviour in “real” environmental samples, using hydrodynamic chromatography coupled to ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 24, 964-972.
26. Wei, G.T., Liu, F.K y Wang, C.R.C. (1999) Shape separation of nanometer gold particles by size-exclusion chromatography, *Analytical Chemistry*, 71, 2085-2091.
27. Web de Postnova. Revisado 15-08-2017. Disponible en: <http://www.postnova.com/>
28. Baalousha, M., Stolpe, B., y Lead, J. R. (2011). Flow field-flow fractionation for the analysis and characterization of natural colloids and manufactured nanoparticles in environmental systems: a critical review. *Journal of Chromatography A*, 1218(27), 4078-4103.
29. Von der Kammer, F., Legros, S., Hofmann, T., Larsen, E. H., y Loeschner, K. (2011). Separation and characterization of nanoparticles in complex food and environmental samples by field-flow fractionation. *Trends in Analytical Chemistry*, 30(3), 425-436.
30. Benn, T. M., y Westerhoff, P. (2008). Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environmental Science and Technology*, 42(11), 4133-4139.
31. Kardar, Z. S., Beyki, M. H., y Shemirani, F. (2017). Bifunctional aminosilane-functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as efficient sorbent for

- preconcentration of cobalt ions from food and water samples. *Research on Chemical Intermediates*, 43(7), 4079-4094.
32. He, M., Huang, L., Zhao, B., Chen, B., y Hu, B. (2017). Advanced functional materials in solid phase extraction for ICP-MS determination of trace elements and their species-A review. *Analytica Chimica Acta*, 973,1-24.
33. Boisen, S. y Fernandez, J.A. (1997). Prediction of total tract digestibility of energy in feedstuffs and pig diets by in vitro analyses. *Animal Feed Science Technology*, 68, 277–286.
34. Bolea, E., Jiménez-Lamana, J., Laborda, F., y Castillo, J. R. (2011). Size characterization and quantification of silver nanoparticles by asymmetric flow field-flow fractionation coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(9), 2723–2732.
35. Bolea, E., Laborda, F., Abad-Álvaro, I., Trujillo, C y Castillo, J. R. (2017-09). Caracterización de especies de plata liberadas a partir de arcillas recubiertas con nanopartículas de plata en ensayos de digestibilidad mediante AF4-ICPMS. Póster presentado a la XXI Reunión de la sociedad española de química analítica. Valencia, España.
36. González López, J. M. (2000). Las arcillas como minerales industriales: Caolines, bentonitas y arcillas especiales. Discurso de ingreso por el académico electo. Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales de Zaragoza, Zaragoza.
37. Esteban-Tejeda, L., Malpartida, F., Esteban-Cubillo, A., Pecharromán, C., y Moya, J. S. (2009). The antibacterial and antifungal activity of a soda-lime glass containing silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 20(8), 085103.



38. Esteban-Cubillo, A., Pecharromán, C., Aguilar, E., Santarén, J., y Moya, J. S. (2006). Antibacterial activity of copper monodispersed nanoparticles into sepiolite. *Journal of Materials Science*, 41(16), 5208-5212.

