



Departamento de  
Química Analítica  
Universidad Zaragoza



Facultad de Ciencias  
Universidad Zaragoza



Instituto Universitario de Investigación  
en Ciencias Ambientales  
de Aragón  
Universidad Zaragoza



TRABAJO DE FIN DE GRADO

## Caracterización de nanopartículas de plata en muestras medioambientales por cromatografía hidrodinámica

Autora: Patricia De la llana Barón

Directora: María Sierra Jiménez García-Alcalá

Laboratorios GEAS

Zaragoza, 2018

## **Abreviaturas**

AgNPs: Nanopartículas de plata

LSPR: Resonancia de los plasmones superficiales localizados

FM: fase móvil

HDC: Cromatografía hidrodinámica

PA: Penicilamina

$t_r$ : tiempo de retención

ICP-MS: Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia

EAM-UV-vis: Espectroscopía de absorción molecular ultravioleta visible

AF4 : Asymmetric flow field flow fractionation

SDS: dodecilsulfato sódico

$\varnothing$  : diámetro

## Índice

### Resumen

<b>1. Introducción</b>	<b>4</b>
1.1. Nanomateriales y nanopartículas de plata	4
1.2 Espectroscopía de absorción molecular UV-VIS	5
1.3 Espectroscopía de absorción atómica de llama	6
1.4 Cromatografía hidrodinámica	6
<b>2. Objetivos y planteamiento del trabajo</b>	<b>8</b>
<b>3. Resultados y discusión</b>	<b>9</b>
3.1. Caracterización de AgNPs mediante EAM UV-VIS	9
3.2 Determinación del contenido total AgNP mediante EAA-llama	10
3.3 Optimización de la fase móvil para la caracterización de las AgNPs por HDC	11
3.3.1 Fase móvil 1	12
3.3.2 Fase móvil 2	14
3.3.3 Fase móvil 3	15
3.3.4 Fase móvil 4	16
3.3.5 Fase móvil 5	17
3.3.6 Fase móvil 6	17
Parámetros cromatográficos	18
Parámetros analíticos	19
3.4 Caracterización de AgNPs mediante HDC-ICP-MS	20
<b>4. Parte experimental</b>	<b>21</b>
Instrumentación: Aparatos y materiales	21
Procedimientos	24
<b>5. Conclusiones</b>	<b>26</b>
<b>6. Bibliografía</b>	<b>27</b>
<b>Anexos</b>	<b>30</b>

## **Resumen**

El aumento de la comercialización de productos con nanopartículas de plata supone la necesidad de realizar estudios sobre dichas nanopartículas (NPs), para poder evaluar su impacto en el medio ambiente. En este trabajo se ha utilizado la técnica EAM-UV-vis para la caracterización de AgNPs de distintos tamaños (10, 20, 40 y 60 nm) y de AgNPs en muestras comerciales. La técnica EAA-llama se utiliza para la determinación del contenido total de plata en muestras comerciales; y mediante cromatografía hidrodinámica con detección UV-vis se realiza la separación de las AgNPs de distinto diámetro optimizando distintas fases móviles teniendo en cuenta parámetros cromatográficos, parámetros analíticos y recuperaciones.

## **Abstract**

The increase in the commercialization of products with silver nanoparticles implies the need to carry out studies on said nanoparticles (NPs), in order to evaluate their impact in the environment. In this work, the EAM-UV-vis technique has been used for the characterization of AgNPs of different size (10, 20, 40 and 60 nm) and of AgNPs in commercial samples. FAAS has been used for the determination of the total silver content in commercial samples; and though hydrodynamic chromatography technique with UV-vis detection has been used for the separation of NPs of different diameter and different mobile phases were optimized taking into account chromatographic parameters, analytical parameters and recoveries.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Nanomateriales y nanoparticulas de plata

El estudio de nanoparticulas (porciones de materia diferenciadas del medio donde se encuentran y cuya longitud, al menos en una de sus dimensiones está entre 1 y 100 nm)<sup>1</sup> está en auge actualmente. Esto se debe a sus aplicaciones en la industria tras haber sido capaces de sintetizar y manipular materiales a nanoscala, lo cual es posible gracias a las nuevas tecnologías. Pese a ello, los datos son escasos y es necesario profundizar y experimentar más con ellos para saber el efecto que pudiera tener la elevada producción que se preveé para años próximos. Es necesario distinguir entre NP naturales y antropogénicas para poder diferenciar su ocurrencia, destino y efectos sobre el medio ambiente<sup>2</sup>.

El aumento de comercialización de productos con nanopartículas de plata se debe a su actividad antimicrobiana, así como por su buena conductividad, estabilidad química y actividad catalítica. Lo cual da lugar a comercialización de diversos productos (apósitos, prótesis, material quirúrgico) recubiertos con AgNPs para evitar el crecimiento bacteriano, así como su utilización en tratamientos contra el VIH-1 dado que se ha observado interacción con el virus evitando su unión a la célula huésped<sup>3</sup>.

Por otro lado, al introducir AgNPs en fibras sintéticas o naturales se consigue potenciar la actividad iónica y se obtienen efectos antimicrobianos y, por ende, antiolor en las prendas textiles<sup>4</sup>.

Las nanoparticulas presentan una mayor reactividad (actividad) biológica. Este fenómeno puede ser positivo, como la actividad antioxidante o penetración de barreras celulares para acción de fármacos, o negativo si afecta a la toxicidad o induce estrés oxidativo. Aún se desconoce con certeza si las NPs presentan una interacción con las células y una biocinética diferente a la de partículas más grandes. Aunque los estudios realizados muestran la posibilidad de utilizar las NPs en tratamientos médicos. La nanotoxicología proporcionará datos para evaluar los riesgos y la seguridad de utilizar dichas NPs en nanomedicina y aplicaciones industriales<sup>5</sup>.

Se pueden diseñar NPs que liberen iones de plata de forma gradual y controlada. Su captación en sistemas intracelulares está favorecida debido a su capacidad de persistir en tejidos biológicos y su alta afinidad con membranas celulares. Características físicas como su tamaño/forma, carga superficial y de recubrimiento, y estado de agregación y aglomeración

son determinantes para su dinámica. Así como su pH, pE y composición de la materia orgánica. Teniendo en cuenta estos factores, se han utilizado diversas técnicas para la caracterización de AgNPs: la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía de fuerza atómica (AFM) proporcionan datos de alta resolución pero no ofrece datos cuantitativos a bajas concentraciones del metal. Una técnica adecuada para la detección cuantitativa de NP metálicas es ICP-MS, ya que es específico de un elemento y altamente sensible, aunque tiene que estar acoplada a una separación técnica para obtener una caracterización dimensional. Dichas técnicas son fraccionamiento campo-flujo (FFF), cromatografía hidrodinámica (HDC), cromatografía líquida de alto rendimiento de fase reversa (RP-HPLC), cromatografía de movilidad iónica (IMC) y cromatografía electrocinética micelar (MEC). FFF presenta bajas recuperaciones, RP-HPLC ofrece resolución pobre y baja reproducibilidad, mientras que HDC es un método robusto y versátil para separar NPs incluso en matrices complejas y pesada aunque con baja resolución. Si se utiliza HDC-ICP-MS se pueden determinar también los iones de plata<sup>6</sup>. La técnica que ofrece información completa sobre NPs es sp-ICP-MS, realizando mediciones en una base partícula por partícula<sup>7</sup>.

Un estudio compara la técnica AF4 con HDC, ambas acopladas a ICP-MS. Se obtiene que las primera proporciona mayor resolución pero con la segunda se obtienen mejores recuperaciones<sup>8</sup>.

## 1.2 Caracterización de AgNP empleando EAM-UV-vis

Esta técnica sirve para caracterizar AgNP dado que la aparición de bandas de absorción en el espectro alrededor de longitudes de onda de 350 a 500 nm indica la

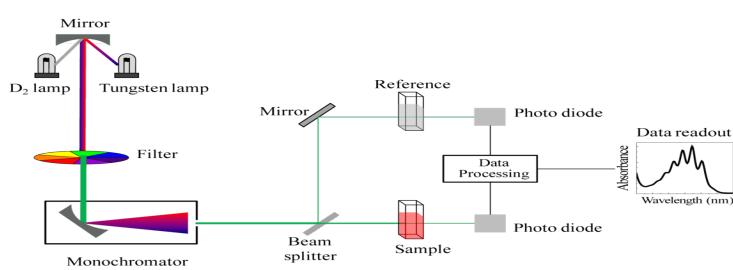


Fig. 1 Esquema del funcionamiento de EAM-UV-vis

presencia de nanopartículas metálicas. El máximo de la banda de absorción y, por tanto, el color de la disolución coloidal se asocia al tamaño y la forma de las nanopartículas. Estas bandas se deben a la absorción por resonancia de los plasmones superficiales localizados (LSPR); es una oscilación resonante de sus electrones libres en presencia de luz<sup>9-12</sup>.

### 1.3. Caracterización de AgNP empleando EAA-llama

Técnica basada en la absorción de radiación por los átomos formados en una llama a partir de una muestra líquida. Ésta es nebulizada y posteriormente atomizada en una llama de composición aire/acetileno. Dichos átomos son irradiados con luz UV-vis procedente de la LCH, de forma que los átomos son excitados y la cantidad de energía absorbida depende de la cantidad de analito presente en la muestra<sup>13</sup>. Sirve para determinar el contenido total de metales pesados de forma sencilla. Un estudio reciente utilizó la técnica FAAS para cuantificar el contenido total de plata en muestras de antibióticos no solubles, obteniéndose resultados representativos. De esta forma, se caracterizaron nanopartículas de plata mediante este técnica<sup>14</sup>.

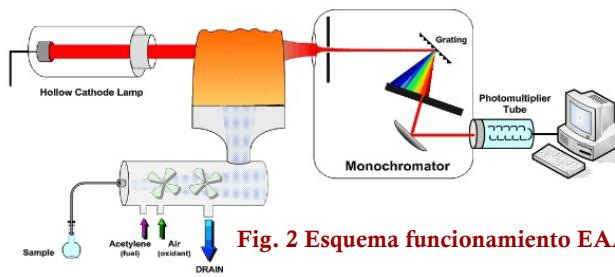


Fig. 2 Esquema funcionamiento EAA-llama

### 1.3 Caracterización de AgNP por Cromatografía Hidrodinámica

En este trabajo se utiliza HDC para separar las AgNPs. La columna de HDC está llena de micropartículas no porosas y la separación se consigue por la velocidad de flujo y el gradiente de velocidad a través de ellos. Otros estudios utilizan el mismo método en muestras ambientales mediante el agregado de AgNP en lodos de aguas residuales<sup>15-19</sup>.

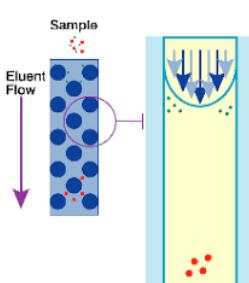


Fig. 3 Gradiente de la columna de HDC

Esta técnica sirve para determinación del tamaño de partícula en rango micro. Tiene similitudes con FFF Y SEC<sup>20</sup>. Las columnas empaquetadas que se utilizan en HDC tienen micropartículas no porosas que crean canales capilares en el interior de la columna (ver figura 3). 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 dado que pasan menos tiempo cerca de los bordes de los capilares<sup>21-23</sup>.

De esta forma, se realiza una separación por tamaños independiente de la matriz. La instrumentación es similar a la de HPLC, aunque, en este caso, los analitos no son solubles en la FM.

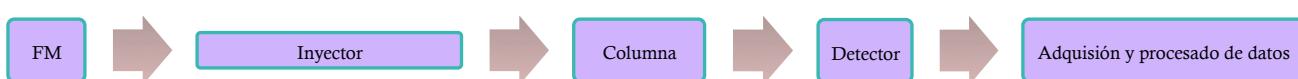


Fig. 4 Fases de la instrumentación de HDC por las que pasan las AgNPs

Este tipo de cromatografía tiene una resolución baja y, además, se ha observado que la superficies de recubrimiento tiene efectos en los tiempos de elución de AuNP en el rango de 5 a 100nm<sup>22</sup>. Por otro lado, se obtienen altas recuperaciones para AuNP, siendo ésta una de las razones por las que se utiliza esta técnica para caracterización de AgNP. Es necesario tener en cuenta que la composición del eluyente debe optimizarse para cada tipo de muestra cuando se requiere resultados cuantitativos. Siendo ésta la razón por la que se realiza este trabajo de fin de grado. Aunque HDC tenga baja resolución puede acoplarse con otra técnica para obtener mejores resultados, como ICP-MS.

Se ha desarrollado un método analítico basado en cromatografía hidrodinámica (HDC) acoplado a espectrometría de masas de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) para estudiar los procesos que involucran AgNPs en plasma humano y sangre. En dicho estudio se implementan algoritmos para conseguir deconvolución de las señales, lo que proporciona valores de Ag disuelto y distribución de AgNP según diámetro. En este caso, se utilizaron estándares de AgNP de diámetro 20, 40, 60 y 100 nm. HDC separa las NP en función de su diámetro y sp-ICP-MS proporciona información sobre su distribución de masa. La combinación de ambas técnicas discrimina física y estadísticamente la señal de NPs de Ag disuelto consiguiéndose una caracterización completa de las AgNPs<sup>5</sup>.

Se utilizó HDC-ICP-MS para separar muestras medioambientales reales mediante la adición de AgNPs en aguas residuales. Su fraccionamiento por HDC podía llevarse a cabo sin filtración o centrifugación. Se considera una herramienta altamente prometedora para la caracterización del tamaño y detección multielemental de varios tipos de NPs en un amplio rango de tamaño<sup>24</sup>.

Ventajas: Separación de especies según el tamaño con mayor rapidez de medida en medio sin tratar y facilidad de operación del equipo.

Desventajas: Baja resolución, necesidad de corrección de la dispersión de los picos y calibración de la intensidad de la señal según tamaño.

En este trabajo se pretende optimizar distintas fases móviles para caracterizar AgNPs mediante la técnica HDC.

## 2. OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO

El objetivo de este trabajo es caracterizar diferentes tipos de patrones de AgNPs y muestras comerciales aplicando distintas técnicas analíticas como EAM-UV-vis, EAA-llama y HDC.

Para ello, se realizan los siguientes objetivos específicos:

- Recopilar información de la técnica HDC y sobre AgNPs mediante búsqueda bibliográfica.
- Caracterizar AgNPs mediante EAM-UV-vis y su estabilidad con el tiempo.
- Determinar el contenido total de Ag en muestras comerciales por EAA-llama de suplementos alimentarios que contienen AgNPs.
- Caracterizar AgNPs mediante HDC-UV-vis. Valoración y optimización de distintas fases móviles para la separación de AgNPs de 10, 20, 40, 60 nm en base a parámetros cromatográficos y parámetros analíticos.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Caracterización de AgNP por EAM-UV-vis

Se ha procedido a la caracterización de distintos tamaños de AgNPs por EAM-UV-vis. Se miden distintos patrones disponibles de diferente diámetro de AgNP ( $\phi = 10,20,40,60$  nm). Dependiendo del tamaño absorbe a una longitud de onda determinada, obteniéndose el pico de absorción en un rango de 390-440 nm.

En los datos experimentales que se presentan en la tabla 1 se comprueba que, al aumentar el tamaño de partícula, el máximo de absorción se desplaza a longitudes de onda mayores. Para comprobar la estabilidad de las AgNPs se realizan medidas en distintos días y períodos de tiempo.

$\phi$ (nm)	fecha	19/12/17	20/12/17	8/1/18	7/2/18
10	$\lambda$	392	393,5	392	395
	abs	0,41895	0,40751	0,425788	0,365189
20	$\lambda$	398,5	400	400	400
	abs	0,46295	0,4682	0,529078	0,456649
40	$\lambda$	416,5	417,5	415	419
	abs	0,334503	0,370807	0,382019	0,438166
60	$\lambda$	435,5	435	435	435,5
	abs	0,287275	0,305865	0,237465	0,279631

Tabla 1. Valor máximo de  $\lambda$  y absorción en los espectros obtenidos por EAM-UV-vis para los distintos tamaños de AgNPs en un periodo de tiempo determinado.

Se puede observar que las AgNPs son estables dado que se obtienen valores de  $\lambda$  y abs semejantes en las medidas de los diferentes días.

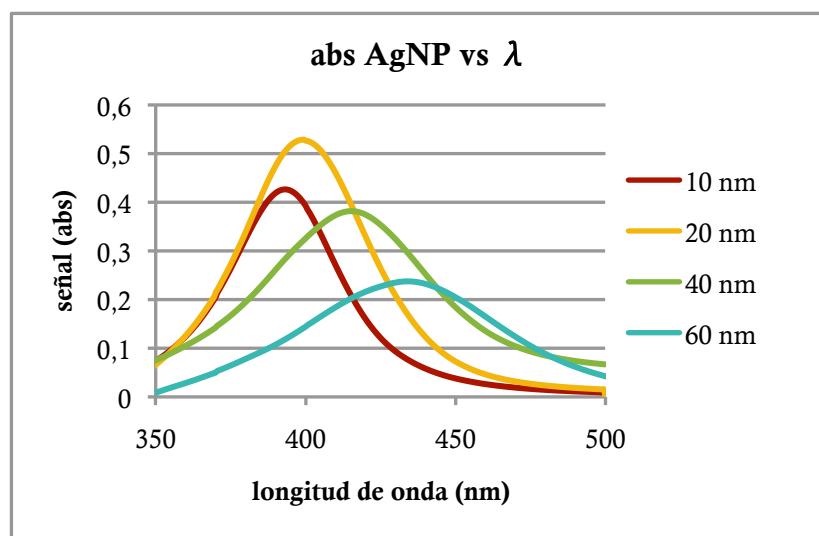


Fig. 5 Espectro de absorción de AgNPs ( $0,02\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )

En la Fig. 5 se observa el espectro de absorción de las AgNPs, donde se comprueba gráficamente el aumento de la longitud de onda al aumentar el diámetro de la nanopartícula de plata.

Se realizaron también los espectros de muestras de suplementos alimentarios comercialmente conocidas como *Biovedik* y *High Stability*, las cuales son descritas en el apartado 4.2 de reactivos, muestras y disoluciones.

*Biovedik* da un valor de  $\lambda = 411,2$  nm (Abs = 0,504) cuyo valor se puede relacionar con la  $\lambda$  obtenida para el patrón de 40 nm de diámetro (ver tabla 1) .

Por otro lado, la muestras *High Stability* presenta una  $\lambda = 405$  nm (Abs = 0, 0618). Dicha longitud de onda corresponde al diámetro de AgNP de 20 nm de diámetro, tal y como puede relacionarse al observar los datos de la tabla 1.

### **3.2 Determinación del contenido total de AgNP en muestras reales contenido AgNP en EAA-llama**

La EAA-llama es capaz de medir el contenido total de plata (Ag(I) + AgNP). Se procede a la determinación del contenido total de Ag en dos muestras comerciales *Biovedik* y *High Stability* descritas en el apartado 4.2 de reactivos, muestras y disoluciones. Para la determinación del contenido total de Ag en las muestras se realizaron las correspondientes rectas de calibrado así como la determinación de parámetros instrumentales. En el apartado 4.3 se explica el procedimiento para la realización de estas medidas.

#### **BIOVEDIK**

Todos los cálculos y resultados de estas medidas para la muestra comercial *Biovedik* están en el apartado A1 de anexos. Se obtuvo una recta de calibrado  $y = 0,028x + 0,002$  con  $R^2=0,996$  y parámetros analíticos: LD=0,043 mg/L y LC = 0,143 mg/L.

Los valores de concentración obtenidos de la muestra se reflejan en la tabla 2. Se obtiene una  $[AgNPs]= 22,62$  ppm y SD = 1,90. La etiqueta comercial marca un contenido de AgNPs de 25 ppm, cuya concentración es ligeramente mayor que la obtenida experimentalmente. Se realiza el test t con los resultados obtenidos por otros miembros del grupo de investigación, obteniéndose resultados estadísticamente iguales.

<b>BIOVEDIK</b>	<b>[ ] (ppm)</b>	<b>SD</b>	<b>Prob. t 2 colas</b>	<b>Resultado estad.</b>
Operario 1	22,6190	1,90	----	-----
Operario 2	20,9443	0,40	47,87	Estadistic. =
Operario 3	20,8674	0,78	48,31	Estadístic. =

**Tabla 2. Comparación intralaboratorio de medidas de muestra *Biovedik* con EAA-llama.**

## HIGH STABILITY

Los cálculos, resultados y parámetros instrumentales de estas medidas de la muestra comercial HS están en el apartado A2 de anexos. Se obtuvo una recta de calibrado  $y = 0,017x + 0,000$  con  $R^2=0,999$  y parámetros analíticos: LD=0,035 mg/L y LC = 0,118 mg/L. La etiqueta comercial muestra un contenido de AgNPs de 10 ppm, aunque los resultados muestran un contenido ligeramente mayor (ver tabla 3). Se realiza una comparación intralaboratorio, obteniéndose resultados estadísticamente iguales.

<b>HIGH STABILITY</b>	<b>[ ] (ppm)</b>	<b>SD</b>	<b>Prob. t 2 colas</b>	<b>Resultado estad.</b>
Operario 1	12,5490	3,381	----	-----
Operario 2	12,3887	0,52	96,69	Estadistic. =

**Tabla 3. Comparación intralaboratorio de medidas de muestra High Stability con EAA-llama.**

Ante los resultados obtenidos, hay que señalar que los contenidos de AgNPs indicados en la etiqueta comercial no son valores certificados.

### **3.3 Caracterización de AgNP por HDC con detección UV-vis**

Para la caracterización de AgNPs mediante HDC se utilizó, en un principio, la fase móvil recomendada por la casa comercial que suministra la columna del cromatógrafo y la más utilizada en la bibliografía<sup>15,18</sup>. Esta fase móvil está compuesta por 0,013% SDS, 0,05% formaldehido, 0,05% Tritón X-100 y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5mM. El estudio se realiza sobre 4 tamaños de nanopartícula: 10, 20 , 40 y 60 nm. Cada uno de los componentes de la FM tienen una función determinada. El SDS es un tensioactivo aniónico que asegura una baja fuerza iónica y, junto al Tritón X-100 –surfactante no iónico-, sirve para la evitar la aglomeración de las AgNPs. El formaldehido actúa como antimicrobiano en la columna y el hidrogenofosfato sirve para mantener constante la fuerza iónica<sup>20</sup>.

Se estudian distintas fases móviles, las cuáles varían en composición y se nombran como FMs en la tabla 4.

<b>Fase móvil</b>	<b>Composición</b>	<b>pH</b>
FM1	0,013%SDS, 0,05% CH <sub>2</sub> O, 0,05% Tritón X-100, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5mM	7,4
FM2	FM1 sin Tritón X-100	7,6
FM3	FM1 sin Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5mM	7,6
FM4	FM1 con Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5 mM	7,6
FM5	SDS 0,45 mM	7,6
FM6	FM1 sin tritón con Penicilamina 0,2mM	7,5

**Tabla 4. Composición de las fases móviles utilizadas.**

### 3.3.1. Optimización de la fase móvil

Para todas las fases móviles se utiliza el caudal recomendado por el fabricante; 1,6 mL/min. La presión de trabajo para dichas FM está entre 1400-1700 psi, inferior a la presión máxima recomendable con la columna.

Se trabaja con disoluciones patrón de  $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de los distintos tamaños de AgNPs, preparadas a partir de disoluciones de 20 ppm para cada diámetro.

Los cálculos de concentración para la preparación de estas disoluciones se reflejan en el apartado B1-B6 del anexo, donde también puede encontrarse los datos obtenidos de tiempos de retención, área y altura de las 3 réplicas realizadas para cada diámetro de AgNP.

#### 3.3.1.1. Fase móvil 1

Dicha fase móvil contiene los componentes mencionados anteriormente para la correcta separación de las AgNPs y poder obtener un cromatograma para cada tamaño de partícula y, de esta forma, caracterizarlas.

El cromatograma obtenido se muestra en la figura 6 obteniéndose tiempos de retención de 8,22 ; 8,14 ; 8,05 y 8,01 minutos para los diámetros de AgNP de 10, 20 40 y 60 nm respectivamente.

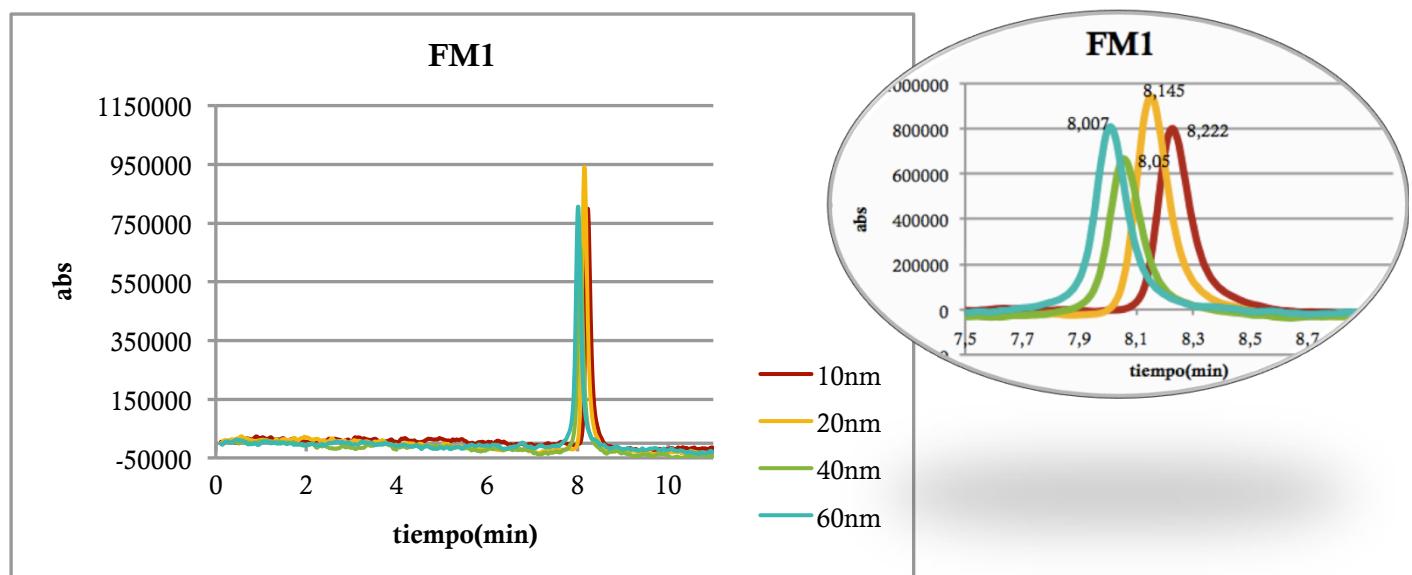
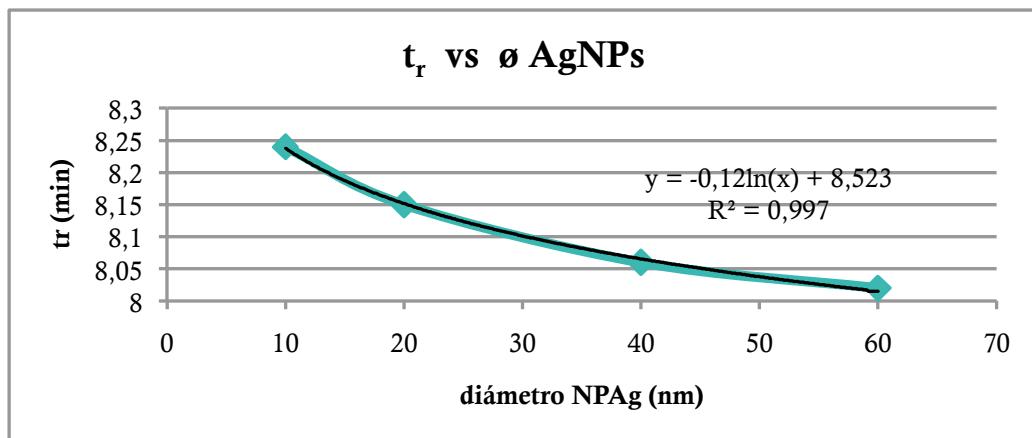


Fig 6. Cromatograma de AgNPs de distinto diámetro en fase móvil 1.

Se realiza un gráfico de calibración del tiempo de retención de cada muestra frente los distintos diámetros de AgNPs (ver fig. 7), obteniéndose una buena correlación ( $R^2=0,997$ ), similar a la encontrada en la bibliografía<sup>18</sup>.

**Fig. 7. Gráfico de calibración de la FM1 de  $t$  vs tamaño NP.**



Los tiempos de retención, como era de esperar por los datos bibliográficos, disminuyen

media tiempo r	s	dsr(%)
8,24	0,0000	0,0000
8,15	0,0058	0,0708
8,06	0,0058	0,0716
8,01	0,0058	0,0720

conforme aumenta el tamaño de AgNP. Los datos son muy reproducibles dado que la DSR es muy baja. Ver tabla 5.

**Tabla 5.  $t_r$ , s y dsr para los distintos diámetros de AgNP**

Por otro lado, la resolución es muy pobre en todos los casos (0,072-0,183), característica que ya conocíamos de esta técnica, HDC. Los parámetros cromatográficos están en la tabla 8 de la página 18. El número de platos (N) está en torno a 183-231, siendo necesarios menos platos al aumentar el diámetro de NP. Es lógico este valor tan bajo de N debido a que no existe interacción en la columna.

Para poder evaluar si existen posibles retenciones de las AgNPs en la columna se realizan estudios de recuperación. Estos estudios evalúan si hay pérdidas en la columna. Para ello, las medidas se realizan con y sin columna y así obtener los valores de recuperación mediante la fórmula<sup>8</sup>:

$$R = \frac{\text{señal CON columna}}{\text{señal SIN columna}} \cdot 100$$

**Tabla 6. Valores de recuperación de distintos diámetros de AgNP con FM 1.**

RECUPERACIONES	diámetro AgNP (nm)			
	10	20	40	60
AREA	82,38	87,54	72,40	80,96
	71,88	75,92	71,62	79,71
		79,11	73,87	85,18
MEDIA	77,13	80,85	72,63	81,95
s	7,422	6,003	1,142	2,867
DSR (%)	9,622	7,424	1,572	3,498

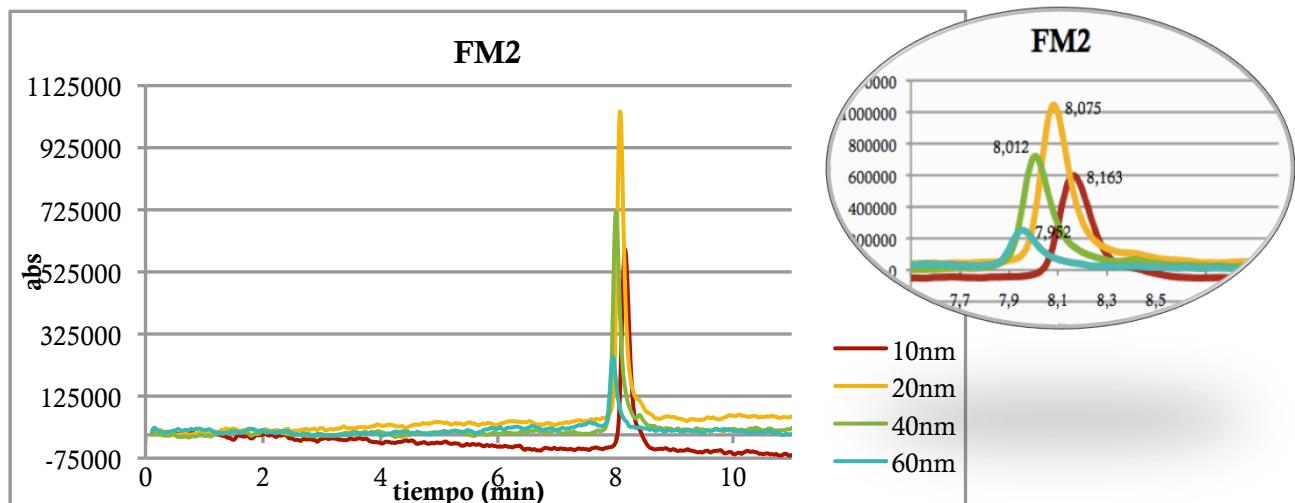
En la tabla 6 se observan los valores de recuperación obtenidos, cuyo valor está comprendido entre 77-82 %. Dichos valores se mejoran posteriormente al modificar la FM. Por otro lado, se observa que los valores de DSR disminuyen al aumentar el diámetro de nanopartícula.

### **3.3.1.2. Fase móvil 2: 0,013% SDS, 0,05% CH<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5mM**

Uno de los objetivos de este trabajo es encontrar una fase móvil óptima para caracterización de AgNPs mediante HDC. Por ello, en esta y sucesivas FM se analizan las muestras modificando alguno de los componentes de la FM1 para ver el efecto que tienen en los valores de recuperación obtenidos. Por ello, en FM2 no se ha añadido Tritón X-100.

Se trabaja también con disoluciones patrón de 500  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para cada diámetro de AgNP. Las concentraciones exactas de estas disoluciones están en la tabla 1 del apartado B2 de anexos.

En la fig. 8 se muestra el cromatograma de las AgNPs para 10, 20, 40 y 60 nm, cuyos tiempos de retención son 8,16 ; 8,08 ; 7,96 y 8,01 minutos, respectivamente. Los tiempos de retención son ligeramente menores que con la FM1.



**Fig. 8 Cromatograma de AgNPs de distinto diámetro en fase móvil 2.**

Para esta FM se obtiene la misma buena correlación ( $R^2=0,997$ ) entre los  $t_r$  y el diámetro de NP (ver fig.9), así como valores reproducibles por la DSR tan pequeña (ver tabla 7).

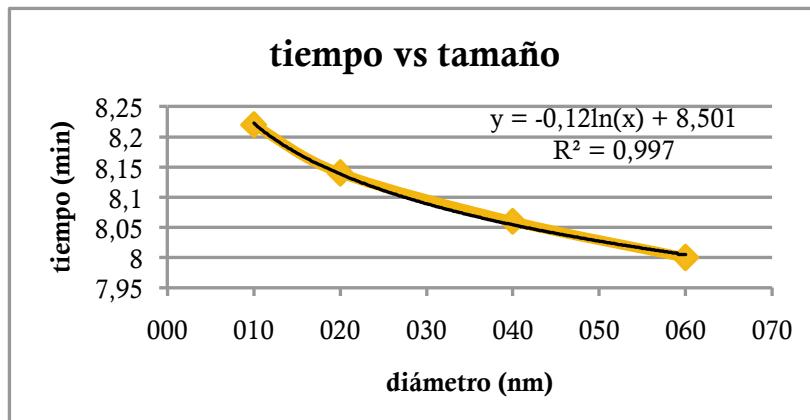


Fig. 9. Gráfico de calibración de la FM2 de tiempo frente al tamaño NP

media tiempo r	s	dsr(%)
8,2167	0,0058	0,0703
8,1367	0,0058	0,0710
8,0567	0,0058	0,0717
8,0033	0,0058	0,0721

Tabla 7.  $t_r$ , s y dsr para los distintos diámetros de AgNP

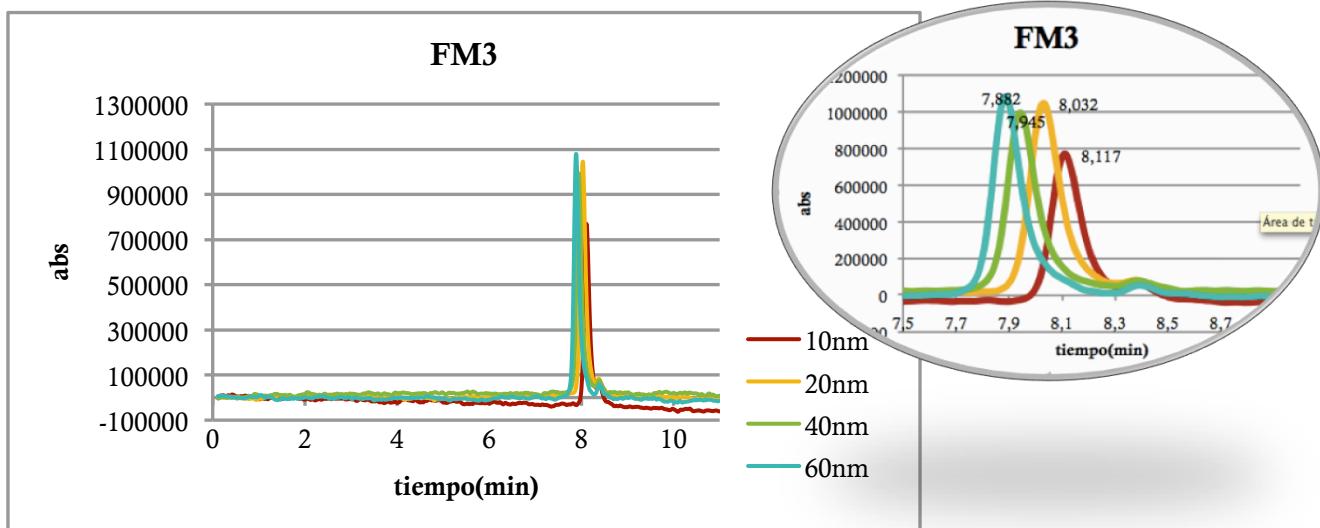
Los parámetros cromatográficos para este caso pueden observarse en la tabla 8 de la página 18. En ella se ve que los tiempos de retención son semejantes a la FM previa. Aunque difiere en la resolución y N, siendo menor con FM sin Tritón X-100 para ambos parámetros. En este caso, se obtuvieron mejores recuperaciones, con rango entre 86,21-98,53 (próximas al 100%), tal y como refleja la tabla 9 de la página 19.

En este caso, la presencia de tritón X-100 como surfactante no iónico no sería estrictamente necesario.

### 3.3.1.3. Fase móvil 3: 0,013%SDS, 0,05% CH<sub>2</sub>O, 0,05% Tritón X-100

Esta FM no contará con el componente que mantiene constante la fuerza iónica. Factor importante para las NP, ya que éstas se desestabilizan a mayor fuerza iónica<sup>20</sup>.

En la fig. 10 se muestra el cromatograma de las AgNPs para 10, 20 , 40 y 60 nm, cuyos tiempos de retención son 8,12 ; 8,03 ; 7,94 y 7,88 minutos respectivamente



**Fig.10. Cromatograma de AgNPs de distinto diámetro en fase móvil 3.**

En el apartado B3 del anexo se muestra la gráfica de calibración de tiempo frente a tamaño de NP cuya ecuación es:  $y = -0,12\ln x + 8,403$  y el valor de correlación:  $R^2 = 0,993$  es semejante a los casos anteriores. Los datos siguen siendo igual de reproducibles, tal y como se observa en la baja DSR de los  $t_r$  en la tabla adjunta en B3 de anexos (0,000 – 0,073 %).

Para dicha fase móvil los parámetros cromatográficos varían con respecto a las anteriores FM. En la tabla 8 y 9 (pág.18 y 19) se ven estas diferencias: mientras que los tiempos de retención se reducen (8,11 minutos para 10nm y 7,88 minutos para 60nm) para todos los diámetros, las recuperaciones (60,21–86,29) empeoran considerablemente para los diámetros de AgNP de 10 y 20 nm.

#### 3.3.1.4. Fase móvil 4: 0,013%SDS, 0,05% CH<sub>2</sub>O, 0,05% Tritón X-100, con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 mM

Esta FM cuenta con una concentración de hidrogenofosfato cinco veces mayor que en los casos anteriores. De esta forma, se pretende comprobar qué resultados se obtienen con una concentración elevada del componente que mantiene la fuerza iónica de la disolución.

En la figura B4.3 de anexos se muestra el chromatograma de las AgNPs para 10, 20 , 40 y 60 nm, cuyos tiempos de retención son 8,40 ; 8,34 ; 8,27 y 8,23 minutos, respectivamente.

En el apartado B4 del anexo se muestra la gráfica de calibración de tiempo frente a tamaño de NP, cuya ecuación es  $y = -0,10\ln x + 8,646$ , y el valor de correlación es idóneo dado que  $R^2=1$ . Los datos siguen siendo igual de reproducibles, tal y como se observa en la baja DSR de los  $t_r$  en la tabla adjunta en el apartado B4 (DSR= 0,069-0,086%).

En este caso, no se observa una mejoría en ninguno de los parámetros cromatográficos (Ver tabla 8 y 9). El tiempo de retención es considerablemente mayor para los distintos diámetros de AgNPs y las resoluciones son semejantes a FM1 y FM2. Las recuperaciones (63,17 – 99,12) son similares excepto para el  $\phi = 10$  nm, la cuál es mucho menor que en FM1 y FM2, y semejante a la recuperación de FM3.

### **3.3.1.6. Fase móvil 5: SDS**

Esta FM de SDS actúa como estabilizador de las NPs. Tal y como se ha demostrado los surfactantes iónicos rodean los núcleos de metal y prevenienen su aglomeración por repulsión electrostática entre las nanopartículas<sup>12</sup>.

En la fig. B5.3 de anexos se muestra el cromatograma de las AgNPs para 10, 20 , 40 y 60 nm, cuyos tiempos de retención son 8,00 ; 7,89 ; 7,80 y 7,78 minutos respectivamente.

La relación logarítmica entre el  $t_r$  y el diámetro se presenta en el apartado B5 de anexos, cuya ecuación es:  $y=-0,12\ln x + 8,273$  y  $R^2=0,986$ . Si se elimina el último punto, se obtiene una correlación válida  $R^2=0,999$  para  $y=-0,14\ln x + 8,31$ . Debido a que la primera recta es similar a las de otras FMs y  $R=0,993$ , se acepta por válida la recta sin eliminación del último valor.

Por otro lado, esta FM ofrece parámetros cromatográficos diferentes: menores tiempo de retención y mejores resoluciones (ver tabla 8 en la página 18), aunque bajas recuperaciones (45,65-88,92) para diámetros de AgNPs de 40 y 60 nm (ver tabla 9).

### **3.3.1.5. Fase móvil 6: 0,013%SDS, 0,05% CH<sub>3</sub>O, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5mM , PA 0,2 mM**

Una de las principales ventajas de la HDC para caracterización de nanomateriales es que se pueden detectar simultáneamente NPs y especies iónicas<sup>9</sup>. Algunos autores, mediante electroforesis capilar-ICP-MS han utilizado un agente quelante para la determinación simultanea de AuNPs, AgNPs y las correspondientes especies iónicas<sup>12</sup>. La PA formaría

complejos con la Ag iónica permitiendo su estabilización e impidiendo su posible pérdida en columna<sup>25</sup>.

En la fig. B6.3 de anexos se muestra el cromatograma de las AgNPs para 10, 20, 40 y 60 nm, cuyos tiempos de retención son 8,51 ; 8,19 ; 8,04 y 7,96 minutos respectivamente.

En el apdo B6 del anexo se halla la calibración de  $t_r$  frente a tamaño de NP, cuya ecuación es:  $y = -0,11\ln x + 8,469$ , obteniéndose una buena correlación ( $R^2=0,999$ ). Los datos siguen siendo igual de reproducibles, tal y como se observa en la baja DSR de los  $t_r$  en la tabla adjunta en el mismo apartado de anexos (DSR= 0,07-0,08%).

Los resultados obtenidos son representativos para  $\phi= 10$  y 20 nm de AgNP. Para los  $\phi= 40$  y 60 nm no se obtuvieron picos medibles. Por esta razón, de los datos disponibles se puede decir que los tiempos de retención son similares a los de FM2, las recuperaciones (64,6 – 71,8) son mucho menores (ver tabla 9) y el dato de la única resolución (0,151) que se obtiene es semejante a la FM2 (ver tabla 8).

**Tabla 8. Parámetros cromatográficos y calibración de tiempo de retención frente a tamaño en la separación de AgNPs mediante HDC**

$\phi$ (nm)	FASE MOVIL	$t_r$ (min)	DSR(%)	Anchura (min)	Resolución	N	recta tiempo vs diametro	R
10	FM1	8,24	0,0000	0,542	0,161	231,13	$y=-0,12\ln x+8,523$	0,998
	FM2	8,22	0,0703	0,550	0,144	223,37	$y=-0,12\ln x+8,501$	0,998
	FM3	8,11	0,0000	0,417	0,183	313,55	$y=-0,12\ln x+8,403$	0,996
	FM4	8,41	0,0690	0,442	0,140	362,03	$y=-0,10\ln x+8,646$	1,000
	FM5	7,99	0,0000	0,434	0,207	338,93	$y=-0,12\ln x+8,273$	0,986
	FM6	8,20	0,0704	0,400	0,151	420,25	$y=-0,11\ln x+8,469$	0,999
20	FM1	8,15	0,0708	0,575	0,158	200,90	$y=-0,12\ln x+8,523$	0,998
	FM2	8,14	0,0710	0,559	0,140	212,04	$y=-0,12\ln x+8,501$	0,998
	FM3	8,03	0,0000	0,458	0,166	307,40	$y=-0,12\ln x+8,403$	0,996
	FM4	8,34	0,0690	0,558	0,137	223,39	$y=-0,10\ln x+8,646$	1,000
	FM5	7,89	0,0000	0,658	0,171	219,13	$y=-0,12\ln x+8,273$	0,986
	FM6	8,12	0,0711	0,658	x	152,29	$y=-0,11\ln x+8,469$	0,999
40	FM1	8,06	0,0716	0,567	0,072	202,07	$y=-0,12\ln x+8,523$	0,998
	FM2	8,06	0,0717	0,550	0,109	214,76	$y=-0,12\ln x+8,501$	0,998
	FM3	7,95	0,0730	0,508	0,130	244,91	$y=-0,12\ln x+8,403$	0,996
	FM4	8,27	0,0700	0,467	0,087	313,60	$y=-0,10\ln x+8,646$	1,000
	FM5	7,80	0,0907	0,517	x	227,62	$y=-0,12\ln x+8,273$	0,986
	FM6	x	x	x	x	x	$y=-0,11\ln x+8,469$	0,999
60	FM1	8,02	0,0720	0,592		183,53	$y=-0,12\ln x+8,523$	0,998
	FM2	8,00	0,0721	0,550		211,57	$y=-0,12\ln x+8,501$	0,998
	FM3	7,88	0,0000	0,567		193,15	$y=-0,12\ln x+8,403$	0,996
	FM4	8,23	0,0860	0,450		334,48	$y=-0,10\ln x+8,646$	1,000
	FM5	7,77	0,0000	0,583		177,63	$y=-0,12\ln x+8,273$	0,986
	FM6	7,99	0,0886	x		x	$y=-0,11\ln x+8,469$	0,999

Según datos bibliográficos, la resolución aumenta con el decrecimiento del diámetro de nanopartícula<sup>23</sup>, lo cual puede comprobarse en esta tabla 8.

**Tabla 9. Recuperaciones de las distintas fases móviles**

$\varnothing$ (nm)	FASE MOVIL	Recuperación	DSR(%)
10	FM1	77,1	9,6
	FM2	94,67	3,91
	FM3	60,21	14,86
	FM4	63,17	10,65
	FM5	88,92	4,1
	FM6	71,8	1,9
20	FM1	80,9	7,4
	FM2	97,33	6,38
	FM3	77,43	6,17
	FM4	99,12	2,45
	FM5	73,59	7,68
	FM6	64,6	6,6
40	FM1	72,6	1,6
	FM2	98,53	5,34
	FM3	86,29	1,24
	FM4	84,04	20,93
	FM5	65,05	3,64
	FM6	x	x
60	FM1	81,9	1,5
	FM2	86,81	9,13
	FM3	79,58	2,61
	FM4	81,43	x
	FM5	45,65	12,93
	FM6	x	x

### 3.3.1.7 Estudio de parámetros analíticos

Tras evaluar las distintas fases móviles se observa que la FM2 es la que proporciona mejores recuperaciones con valores próximos al 100% y unos parámetros cromatográficos similares a los de FM1. Se procedió al estudio de parámetros analíticos utilizando dicha FM. Para ello, se prepara una recta de calibrado de 100, 250, 400 y 500 ppb para cada diámetro de AgNP. Posteriormente se realizan una serie de medidas de la línea base para poder calcular el LD y el LC. Las rectas de calibrado obtenidas corresponden a la relación del área y la concentración

de la muestra.  
Todos estos resultados se reflejan en la tabla 10.

	[ ] (ppb)	tr(min)	AREA	ALTURA	Parámetros analíticos
10nm	94,94	8,17	19769,28	132822	$y = 285,8x - 6379$ areas R = 0,996
	242,09	8,16	64780,74	381388	
	389,03	8,17	103822,23	602383	
	482,83	8,17	116483,29	643561	LD = 0,0972 mg/L LC = 0,3241 mg/L
20nm	94,90	8,07	29909,73	198197	$y = 333,5x - 2815$ areas R = 0,992
	240,68	8,08	109038,27	513365	
	388,06	8,08	122387,44	501519	
	486,91	8,08	162779,94	997721	LD = 0,0873 mg/L LC = 0,2909 mg/L
40 nm	91,86	8,01	28771,24	151428	$y = 261,7x + 4172$ areas R = 0,998
	239,3	8,01	65850,13	382869	
	448,53	8,01	121951,26	704274	
	509,4	8,01	---	---	LD = 0,1968 mg/L LC = 0,6560 mg/L
60nm	89,84	7,95	18985,91	120567	$y = 251,2x - 6454$ areas R = 0,994
	243,41	---	---	---	
	383,32	7,96	76306,83	463960	
	499,31	7,95	32831,61	223213	LD = 0,2966 mg/L LC = 0,9889 mg/L

**Tabla 10. Parámetros analíticos de las rectas de calibrado con la FM óptima**

Para todos los tamaños de AgNPs se obtuvieron buenas calibraciones de area frente a concentración con R entre 0,992 y 0,998. Los límites de detección y cuantificación está en el rango de 0,0873 - 0,2966 mg/L y 0,2909 – 0,9889 mg/L respectivamente.

Los valores de precisión se calcularon para la concentración de 500  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , siendo DSR = 1,71 ; 1,99 ; 4,51 y 4,71 % para los diámetros de AgNPs 10 ; 20 ; 40 y 60 nm respectivamente.

### 3.4. Caracterización de AgNP por HDC-ICP-masas

La técnica ICP-MS es muy popular para determinar iones metálicos debido a su alta velocidad de determinación, precisión, sensibilidad y selectividad, amplio rango lineal, capacidad de análisis de múltiples elementos/isótopos. Hoy en día es ampliamente utilizada<sup>26</sup> utilizando como método de detección la detección individual de partículas (sp-ICP-MS). Con objeto de llevar a cabo la posible caracterización de AgNPs y especies iónicas por HDC-ICP-MS en las muestras de suplementos alimenticios estudiados en los apartados 3.1-3.3, en este trabajo de fin de grado se realizaron una serie de estudios previos que posteriormente serán completados por el grupo de investigación.

En concreto se realizaron estudios de comparación de sensibilidad para la determinación y cuantificación de Ag iónica por ICP-MS preparada en diferentes matrices alguna de las cuales contenían las FMs estudiadas en el apartado 3.3. para la posible caracterización de AgNPs y especies disueltas por HDC-ICP-MS. Se preparan rectas de Ag(I) en  $\text{HNO}_3$  1%;  $\text{H}_2\text{O}$  milli Q ; PA 0,2 mM ; y  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  1mM. El objetivo de los diferentes medios es estudiar en qué medio la Ag iónica es más estable.

En la tabla 11 se observan las rectas obtenidas con ICP-MS en continuo. Se ha obtenido que la ecuación de la recta para ácido nítrico es:  $y = 16694x + 25866$  con R=0,999 ; para el agua :  $y = 16693x + 6542$  con R= 0,991 ; para el tiosulfato:  $y = 16192x + 71734$  con R = 0,999 ; y para la penicilamina:  $y = 18582x - 40980$  con R= 0,999.

**Tabla 11. Rectas de calibrado con distintas matrices**

$\text{Ag}^+$ isótopo 107	$\text{HNO}_3$ 1%	$\text{H}_2\text{O}$ milliQ	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 1mM	PA 0,2mM
Recta calibrado	$y = 16694x + 25866$	$y = 16693x + 6542$	$y = 16192x + 71734$	$y = 18582x - 40980$
R	0,999	0,991	0,999	0,999
$\sigma$ (pte. Recta)	302,3	29004	273,8	1893

Se realiza una comparación de las pendientes de las rectas lineales aplicando el test estadístico t a dos colas para comprobar si los resultados difieren al utilizar matrices distintas. Se obtiene que los resultados son estadísticamente iguales. De esta forma, se comprueba que la  $\text{Ag}^+$  es igual de estable en cualquiera de los medios estudiados, lo que puede ser interesante en posteriores estudios por HDC-ICP-MS ya que se podría utilizar PA ó  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  como ligandos estabilizantes que eviten la adsorción de Ag iónica en la columna. Ver apartado C de anexos.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1. Instrumentación

#### 4.1.1. Instrumentación

- Balanza de precisión PL2001-L, precisión de  $\pm 0,1$  mg
- Medidor de pH micropH 2001 (Crison, Barcelona, España)
- Espectrofotómetro de absorción UV-Vis de doble haz Jasco V-730 (Jasco, Oklahoma)
- Espectrofotómetro de llama Perkin Elmer AAnalyst 200
- ICP-MS Elan DRC-e Perkin Elmer (Perkin Elmer, Massachusetts, EE.UU.)
  - HDC:
- Cromatógrafo: Waters 2796 Bioseparations Module (Waters Corporation, Milford, EE.UU.);
- Detector de diodos en array: Waters 996 Photodiode Array Detector (Waters Corporation)
- Columna PL-PSDA Type 1 (5-300nm)

#### 4.1.2 Aparatos

- Micropipetas 50-200  $\mu\text{L}$  (Bibby Sterilin, Stone, Reino Unido)
- Baño de ultrasonidos (JP Selecta S.A., Barcelona, España).
- Sistema de filtración de PTFE con filtro de membrana de nylon 0,45  $\mu\text{m}$  Filter Lab (Filtros Anoia, Barcelona, España)

#### **4.1.3 Materiales**

- Tubos tipo Falcon de 15 y 50 mL
- Vasos de precipitados, botes de plástico y recipientes de plástico de distintos volúmenes.
- Cuentagotas de plástico
- Espátula de laboratorio
- Viales de vidrio
- Jeringuillas de plástico de 2 mL

#### **4.2 Reactivos, muestras y disoluciones**

##### **Disoluciones patrón de nanopartículas:**

- 10 nm Silver Nanosphere. Nanoxact 0,02 mg/mL, 25 mL (Nanocomposix)
- 20 nm Silver Nanospheres. Nanoxact 0,02 mg/mL 25 mL (Nanocomposix)
- 40 nm Silver Nanospheres, citrate. Nanoxact 0,02 mg/mL, 25 mL (Nanocomposix)
- 60 nm Silver Nanospheres, citrate. Nanoxact, 0,02 mg/mL, 25 mL (Nanocomposix)
- Plata estándar para ICP 994±3 mg/L (Sigma Aldrich)

##### **Reactivos:**

- Ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) 69/70% (J.T. Baker, Phillipsburg, EE.UU.)
- Dodecilsulfato de sodio (SDS) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.)
- Formaldehído 35/40% (Probus, Barcelona, España)
- Hidrógenofosfato de sodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Sigma –Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania)
- Triton X-100 (Sigma –Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania)
- DL-Penicilamina, 97+% (AlfaAesar-ThermoFisher, Kandel, Alemania)

## Muestras

### Biovedik



Es una muestra que se comercializa como antibiótico natural con contenido de plata iónica y coloidal de 25ppm y agua desionizada, para ayudar a regenerar tejidos y huesos fracturados, sin efectos en la flora intestinal y efectivo contra más de 650

**Fig 11. 1 Botella comercial Biovedik**

bacterias, virus, hongos...así como efectivo contra infecciones y para mejorar el sistema inmune. Distribuido por: *Alex Healthy and Natural Pvt Ltd*, Puducherry.

### High Stability



La muestra HS se comercializa como un antimicrobiano multiusos, cuyo contenido en plata coloidal es 10 ppm. Producido en: Rivers of Health Ltd.

**Fig 11. 2 Botella comercial High Stability**

Las disoluciones se preparan a partir de los reactivos y patrones citados utilizando agua ultrapura (Milli-Q) obtenida a partir de agua tratada con un purificador Milipore. Su preparación se indica de forma detallada en el apartado 4.3 en procedimientos.

Todo el material que se ha utilizado se sumerge en una disolución de  $\text{HNO}_3$  en agua ultrapura al 10% (v/v) durante 24 horas al menos, posteriormente se lava con agua ultrapura y se dejan secar para su utilización.

## Fases móviles

La preparación de las fases móviles parte de tomar un recipiente de plásticamente de 1L de tamaño donde se realizan las pesadas de los componentes de la FM. Se adiciona  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ hasta 1L de disolución. Se adecua el pH a 7,6 aproximadamente con  $\text{HNO}_3$  al 1%. Se filtra y se sonica durante 10 minutos. Una vez finalizado este tiempo, se conecta la FM al cromatógrafo.

componente	FM1	FM2	FM3	FM4	FM5	FM6
SDS	0,1379 g	0,1329 g	0,1356 g	0,1334 g	0,1341 g	0,1393 g
TRITÓN X-100	0,521 g	---	0,5255 g	0,5208 g	---	---
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0,0709 g	0,075 g	---	0,7416 g	---	0,0735 g
Formaldehido	0,9329 g	0,533 g	0,5308 g	0,5265 g	---	0,5422 g
PA	---	---	---	---	---	0,0328 g

**Tabla 12. Pesadas reales de los componentes de las distintas fases móviles estudiadas**

## 4.3 Procedimientos

### 4.3.1 Caracterización de NPs mediante EAM-UV-vis

Se sonican los tubos eppendorf que contienen los patrones de AgNPs de los distintos diámetros (10, 20, 40 y 60 nm) durante 5 minutos y se trasvasan a cubetas de plastico de volumen reducido. Se utiliza el software Spectra Manager. Se ajusta el intervalo en el que absorbe la plata (380-600nm). Se realiza la linea base (baseline) con agua milliQ en ambas cubetas (de referencia y de muestra). Entonces se mide la muestra, obteniéndose los espectros que representan la absorbancia frente a la longitud de onda para cada uno de los patrones. Los valores reflejados en este trabajo son el máximo de absorbancia y la longitud de onda de dicho máximo para cada una de las AgNPs estudiadas.

### 4.3.2 Caracterización de NPs mediante EAA-llama

Para la caracterización de AgNP mediante esta técnica se preparan rectas de calibrado de 1, 2, 3, 4 y 5 ppm de patrón de plata en 15 mL HNO<sub>3</sub>1%. Como el contenido indicado en las muestras es superior al rango lineal, se prepara una disolución de 3 ppm de la muestra real, dado que para esta concentración estamos en el punto centroide de la recta, donde menor dsr hay. Primero se midió la muestra comercial *Biovedik* y, posteriormente, la *High Stability*.

Se toman 1,2mL de la muestra comercial Biovedik de 25 ppm para obtener una disolución de 3ppm en 10mL. Para que toda la plata esté en forma de Ag(I), se ataca la muestra con el mismo volumen de ácido nítrico (1,2mL) durante una hora y se enrasa con agua milliQ hasta los 10mL de muestra. Los puntos de las rectas de calibrado de 1, 2, 3, 4 y 5 ppm se preparan a partir de una disolución patrón de plata de 100ppm por lo que se toman 0,15 ; 0,30 ; 0,45 ; 0,60 y 0,75 mL respectivamente. Preparadas las disoluciones se procede a la preparación del espectrofotómetro para la medida: Se instala la lámpara de plata, se elige la  $\lambda=328,07$  nm al ser la longitud de onda más sensible de la plata, ancho de rendija (W)= 2,7nm. Se enciende la llama aire/acetileno (1:4, relación recomendada para la plata), el tiempo de lectura es de 1segundo y se realizan 3 réplicas. Se analiza el blanco y posteriormente las muestra obteniéndose valores de señal, SD y DSR, los cuales se reflejan en el apartado A de anexos.

Para High Stability se procedió de la misma manera. Se tomaron 3 mL de la botella para preparar la muestra de 3ppm en 10mL dado que HS tiene una concentración de 10ppm.

#### 4.3.3. Separación de NPs mediante HDC

Se utiliza la cromatografía hidrodinámica para separar las nanoparticulas de plata en función de su tamaño. Para ello, se estudian las distintas fases móviles del apartado 3.3. Se prepara 1L de disolución de FM. Tras la preparación, todas deben ser filtradas a vacío para evitar que se introduzca algún resto sólido en el cromatógrafo. Por último, se sonican durante 10 minutos en un baño de ultrasonidos.

Para el estudio de parámetros cromatográficos se utilizan patrones de plata de distintos diámetros (10, 20, 40 y 60 nm). Se preparan muestras de  $500 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  en 6mL de disolución, por lo que se toman 0,15mL de patrón cuya concentración es 20mg/L.

Para el estudio de parámetros analíticos (LD, LQ, rango lineal y precisión) se preparan rectas de calibrado de 100, 250, 400 y  $500 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para los distintos diámetros de nanopartícula de plata (10, 20, 40 y 60 nm).

Antes de cada medición en el cromatógrafo se realiza el protocolo de acondicionamiento. Se purga el sistema para la eliminación de burbujas, se lava y homogeneiza la jeringuilla de inyección (volumen de 20  $\mu\text{L}$ ) y se acondiciona la columna con cada fase móvil utilizada durante, al menos, 15 minutos.

#### 4.3.4 Caracterización de NPs por HDC-ICP-masas

Con objeto de estudiar la estabilidad de la Ag(I) se realizaron una serie de estudios previos a la posterior caracterización por HDC-ICP-MS. Todo el material a utilizar debe ser de plástico previamente sumergido en  $\text{HNO}_3$  durante, al menos, un día para su limpieza. Se realizan rectas de calibrado de 10, 25, 50 y  $100 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{Ag}^+$  por lo que se toman 10 ; 25 ; 50 y 100 $\mu\text{L}$  respectivamente partiendo de una disolución de 10 ppm de  $\text{Ag}^+$ . El enrase hasta 10 mL depende de la matriz utilizada:  $\text{HNO}_3$  1%,  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ, PA 0,2mM ó  $\text{S}_2\text{O}_3$  1mM.

En cada medición que se realiza se anota el voltaje, las cuentas de indio y las cuentas de plata. La optimización del voltaje de la lente sirve para focalizar los iones en la lente. Antes de comenzar con la medición, se selecciona el elemento a medir, en este caso, los dos isótopos de plata. Finalizadas las mediciones, el tratamiento de resultados se lleva a cabo con el software *Origin Pro*.

RECTA PONDERADA				
Ag isótopo 107	HNO <sub>3</sub> 1%	H <sub>2</sub> O milli Q	S203	PA 0,2mM
recta calibrado	y=16694x + 25866	y = 16693x - 6542	y= 16192x - 71734	y = 18582x - 40980
R	0,999	0,991	0,999	0,999
sigma pendiente	302,3	1506	273,8	1893
sigma o.o	10723	29004	10380	

Tabla 13. Parámetros de las rectas de calibrado en los distintos medios utilizados

## CONCLUSIONES

- Se ha llevado a cabo la caracterización de AgNPs de distintos tamaños (10, 20, 40 y 60 nm) obteniéndose valores de longitud de onda, entre 392 y 435,5 nm y mostrando ser estables a lo largo del tiempo.
- Se ha determinado la concentración total de Ag en muestras comerciales obteniéndose una concentración de Ag<sup>+</sup> de 22,62 ppm para Biovedik y 12,55 ppm para High Stability, valores comparables mediante test t con otras determinaciones realizadas en el grupo de investigación.
- Se ha llevado a cabo la optimización de la fase móvil utilizada para la caracterización de AgNPs de diámetros 10, 20, 40 y 60 nm por HDC obteniéndose como FM óptima la que contiene 0,013% SDS, 0,05%CH<sub>2</sub>O y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5mM. Los tiempos de retención son 8,16 ; 8,08 ; 7,96 y 8,01 para las AgNPs de 10, 20, 40 y 60 nm respectivamente. Se ha obtenido una calibración lineal de tiempos frente a tamaños con valores de R=0,998. Los valores de recuperación están en el rango de 86,21-98,53.
- Utilizando la FM óptima se han calculado los parámetros analíticos obteniéndose calibraciones lineales hasta 500 ppm (R entre 0,992 y 0,998), LD y LC está en el rango de 0,0873 – 0,2966 mg/L y 0,2909-0,9889 mg/L respectivamente, y valores de DSR = 1,71 ; 1,99 ; 4,51 y 4,71 % para los diámetros de AgNPs 10 ; 20 ; 40 y 60 nm respectivamente.
- Se han realizado estudios previos a la caracterización de las AgNPs por HDC-ICP-MS. En concreto, se ha estudiado la estabilidad de la Ag<sup>+</sup> en diferentes medios (HNO<sub>3</sub> 1%, H<sub>2</sub>O milliQ, PA 0,2mM, S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> 1mM) obteniéndose sensibilidad comparable mediante test t para todos ellos. Esto puede ser útil para el uso de PA y S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> como ligandos de Ag<sup>+</sup> por HDC-ICP-MS.

## Bibliografía

- [1]. M. Gràcia, L.Pujol. "Riesgos asociados a la nanotecnología" INSHT, pp 1-6, 2008.
- [2]. B. Nowack, T. D. Bucheli, "Occurrence, behaviour and effects of nanoparticles in the environment" Environmental Pollutions, ed. Elsevier, vol. 150, pp.5-22, 2007.
- [3]. J.L.Elechiguerra, J.L.Burt, J.R.Morones, A.C.Bragado, X. Gao, H.H.Lara, M.J.Yacaman. "Interaction of Silver nanoparticles with HIV-I". *Journal of nanobiotechnology* pp 1-10, 2005.
- [4]. A. Ávalos, AI. Haza, D. Mateo, P. Morales. "Nanoparticulas de Plata; Aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente" *Revista complutense de Ciencias Veterinarias* pp 1-23, 2013
- [5]. G. Oberdörster, E. Oberdörster. "Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles". *Environmental Health Perspectives* vol.113, pp 823-839, 2005
- [6]. M. Roman, C. Rigo, M.Castillo, I. Munivrana, V. Vindigni. "Hydrodynamic chromatography coupled to single-particle ICP-MS for the simultaneous characterization of AgNPs and determination of dissolved Ag in plasma and blood of burn patients" *Analytical and Bioanalytical Chemistry* Vol.408, pp 5109-5124, 2016.
- [7]. Francisco Laborda, Eduardo Bolea, and Javier Jiménez-Lamana. "Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Nanoanalysis" *Analytical chemistry*, pp 2270-2278, 2013.
- [8]. Jing-fu Liu, Su-juan Yu, Yong-guang Yin, Jing-bo Chao. "Methods for separation, identification, characterization and quantification of silver nanoparticles". *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 33, pp. 95-106, 2012.
- [9]. L. Tong, Q. Wei, A. Wei, and J.-X. Cheng, "Gold Nanorods as Contrast Agents for Biological Imaging: Optical Properties, Surface Conjugation and Photothermal Effects," *Photochem. Photobiol.*, vol. 85, pp. 21–32, 2009.
- [10]. Jorge Morales, José Morán, María Quintana, Walter Estrada, "Synthesis and characterization of silver nanoparticles by sol-gel route from silver nitrate" *Rev. Soc. Quím. Perú* vol.75, pp177-184, 2009

- [11]. P. K. Jain, X. Huang, I. H. El-Sayed, and M. A. El-Sayed, “Noble metals on the nanoscale: Optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine,” *Acc. Chem. Res.*, vol. 41, pp. 1578–1586, 2008.
- [12]. F. K. Liu, F. H. Ko, P. W. Huang, C. H. Wu, and T. C. Chu, “Studying the size/shape separation and optical properties of silver nanoparticles by capillary electrophoresis,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1062, pp. 139–145, 2005.
- [13]. Sierra, I., Pérez, D., Gómez, S. & Ruiz, Morante, S. “Análisis Instrumental: algunas herramientas de enseñanza-aprendizaje adaptadas al espacio europeo de educación superior”, Vol.1, ed. Netbiblo, pp 75 – 80, 2009
- [14]. Ana C. Giménez I, “Metodologías analíticas para el estudio de efectos sinérgicos bactericidas entre nanomateriales base plata y antibióticos”, trabajo fin de máster, Universidad de Zaragoza, pp 1-58, 2017.
- [15]. Evan P. Gray, Thomas A. Bruton, Christopher P. Higgins, Rolf U. Halden, Paul Westerhoff and James F. Ranville “Analysis of gold nanoparticle mixtures: a comparison of hydrodynamic chromatography (HDC) and asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) coupled to ICP-MS”. *J. Anal. At. Spectrom.*, vol 27, pp. 1532-1539, 2012.
- [16]. D. J. Lewis. “Hydrodynamic chromatography – inductively coupled plasma mass spectrometry, with post-column injection capability for simultaneousdetermination of nanoparticle size, mass concentration and particle number concentration (HDC-PCi-ICP-MS)” *Analyst*, pp. 1624-1628, 2015.
- [17]. Ying-jie Chang, Yang-hsin Shiha, Chiu-Hun Sub, Han-Chen Ho. “Comparison of three analytical methods to measure the size of silver nanoparticles in real environmental water and wastewater samples”. *Journal of Hazardous Materials*, pp 95-104, 2017.
- [18]. Karen Tiede, Alistair B. A. Boxall,ab Dirk Tiede,c Steven P. Tear,d Helen Davide and John Lewis. “A robust size-characterisation methodology for studying nanoparticle behaviour in ‘real’ environmental samples, using hydrodynamic chromatography coupled to ICP-MS”. *J. Anal. At. Spectrom.*, pp. 964–972, 2009.
- [19] Karen Tiede, Alistair B. A. Boxall, Xinmei Wang, David Gore, Dirk Tiede, Malcolm Baxter, Helen David, Steven P. Tear and John Lewis, “Application of hydrodynamic chromatography-ICP-MS to investigate the fate of silver nanoparticles in activated sludge” *J. Anal. At. Spectrom.*, pp 1149–1154, 2010.

- [20]. A. Revillon, “Hydrodynamic Chromatography” Handbook of Methods and Instrumentation in Separation Science, pp. 307-321, 2000.
- [21]. Amanda K. Brewer, André M. Striegel. “Characterizing the size, shape, and compactness of a polydisperse prolate ellipsoidal particle via quadruple-detector hydrodynamic chromatography”. *Analyst*, Vol. 136, pp. 515-519, 2011
- [22]. Jingfu Liu, “Silver nanoparticles in the environment” pp. 9-42, 2015.
- [23]. André M. Striegel, Amanda K. Brewer, “Hydrodynamic chromatography” Annual Review of Analytical Chemistry pp 15-34, 2012.
- [24]. Francisco Laborda, Eduardo Bolea, Gemma Cepriá, María T. Gómez, María S. Jimenez, Josefina Pérez-Arantegui, Juan R. Castillo. “Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of samples”. *Analytica Chimica Acta*, pp 10-32, 2016.
- [25]. C. Sotebier, S. Weidner, N. Jakubowski, U. Panne, “Separation and quantification of silver nanoparticles and silver ions using reversed phase high performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry in combination with isotope dilution analysis”, *Journal of Chromatography*, pp. 102-108, 2016.
- [26]. F. Laborda, J. Jimenez-Lamana, E. Bolea, J. R. Castillo. “Selective identification, characterization and determination of dissolved silver(I) and silver nanoparticles base don single particle detection by inductively coupled plasma mass spectrometry”. *J. Anal. At. Spectrom.* pp.1362-1371, 2011.

## ANEXOS

### A) EAA-llama. Caracterización AgNPs en muestras reales

#### A1) Biovedik

Tabla A1.1. Concentraciones reales recta de calibrado

[ ] (ppm)	tomar ( $\mu$ L)	pesada (g)	Vtotal (g)	[ ] real (ppm)
1	150	0,150	15,008	0,998
2	300	0,300	15,017	2,000
3	450	0,445	15,009	2,962
4	600	0,604	15,015	4,019
5	750	0,754	15,025	5,016

Tabla A1.2. Valores obtenidos del espectrofotómetro mediante EAA-llama

[ ] (ppm)	Señal promedio	SD	DSR
Blanco	0	0,0004	---
1	0,03	0,0002	0,8
2	0,061	0,0002	0,3
3	0,088	0,0006	0,7
4	0,11	0,0013	1,2
5	0,143	0,0008	0,6
Muestra	0,078	0,0003	0,4

Gráfico A1.1. Recta de calibrado

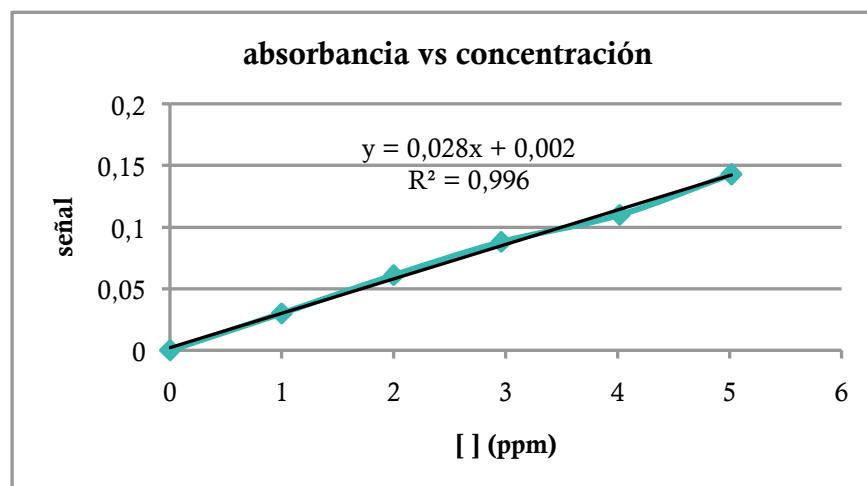


Tabla A1.3 Concentración obtenida y parámetros analíticos

[ ] (ppm)	[ ] (ppm)*	LD (mg/L)	LC (mg/L)	S <sub>total</sub>	S <sub>calibración</sub>	S <sub>instrum</sub>
2,7143	22,619	0,043	0,143	1,897	1,896	0,061

\*teniendo en cuenta el factor de dilución

## A2) HIGH STABILITY

Tabla A2.1. Concentraciones reales recta de calibrado

[ ] (ppm)	tomar (microL)	pesada (g)	Vtotal (g)	[ ] (ppm)
1	150	0,1492	15,1424	0,9853
2	300	0,2922	15,0156	1,9460
3	450	0,4488	15,0343	2,9852
4	600	0,591	15,1753	3,8945
5	750	0,7421	15,0292	4,9377

Tabla A2.2. Valores obtenidos del espectrofotómetro mediante EAA-llama

[ ] (ppm)	Señal promedio	SD	DSR
Blanco	0,001	0,0002	17,8
1	0,017	0,0002	1,4
2	0,037	0,0002	0,5
3	0,054	0,0013	2,3
4	0,07	0,0002	1,7
5	0,088	0,0022	2,6
Muestra	0,064	0,0014	2,4

Gráfico A2.1. Recta de calibrado

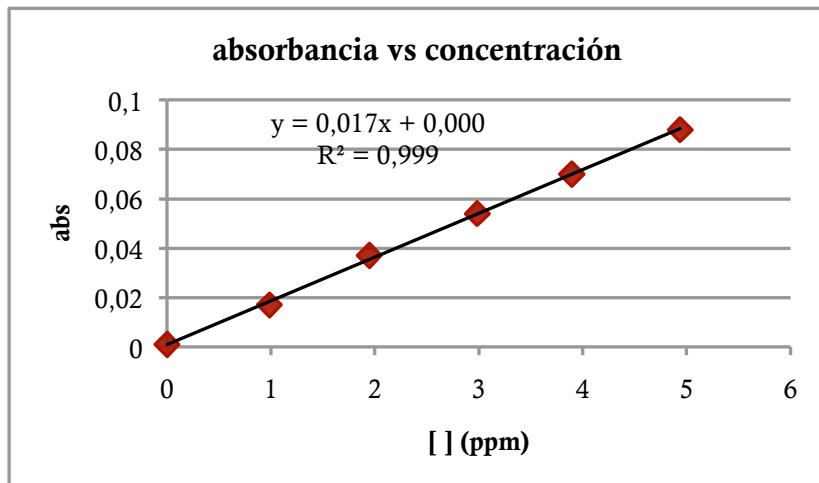


Tabla A2.3 Concentración obtenida y parámetros analíticos

[ ] (ppm)	[ ] (ppm)*	LD (mg/L)	LC (mg/L)	S <sub>total</sub>	S <sub>calibración</sub>	S <sub>instrum</sub>
3,7647	12,549	0,035	0,118	3,381	3,381	0,012

\*teniendo en cuenta el factor de dilución

## B) HDC

### B1) FASE MÓVIL 1.

Tabla B1. Concentraciones reales de las disoluciones de patrones de AgNPs de 0,5 ppm

DIÁMETRO (nm)	NPAgs(g)	V <sub>T</sub> (g)	[ ] (ppm)
10	0,1488	6,0034	0,4957
20	0,1486	6,0507	0,4912
40	0,1476	6,0725	0,4861
60	0,1567	6,0323	0,5195

Tabla B1.1. Valores de área y altura con y sin columna mediante HDC

ø(nm)	CON COLUMNA			SIN COLUMNA		
	t <sub>r</sub> (min)	AREA	ALTURA	t <sub>r</sub> (min)	AREA	ALTURA
10	8,24	130565	844479	0,2	158489	1593905
	8,24	126813	794575	0,2	176412	1731512
	8,24	122298	796231	0,2		
	media	126786	811761	media	167451	1662708
	s	3792	2835,00	s	12673,000	97303
	DSR (%)	2,991	3,492	DSR (%)	7,568	5,852
20	8,15	168755	1053553	0,2	192779	1892253
	8,16	148530	975452	0,2	195639	1931396
	8,15	152116	975321	0,2	192294	1914759
	media	156467	1001442	media	193571	193571
	s	10792	45129	s	1807	19645
	DSR (%)	6,897	4,506	DSR (%)	0,934	1,027
40	8,07	127636	768917	0,2	176286	1748808
	8,06	123187	764018	0,2	171996	16773785
	8,06	124933	771352	0,2	169123	1644956
	media	125252	125252	media	172468	1689183
	s	2241	3735	s	3605	53611
	DSR (%)	1,790	0,486	DSR (%)	2,090	3,174
60	8,02	162597	937423	0,2	200825	1955036
	8,01	159984	952068	0,2	200720	1959443
	8,01	173235	972565	0,2	203377	1962563
	media	165272	954018	media	201641	1959014
	s	7019	17652	s	3782,000	3782,00
	DSR (%)	4,247	1,850	DSR (%)	0,746	0,193

## B2) FASE MÓVIL 2

Tabla B2. Concentraciones reales de las disoluciones de patrones de AgNPs de 0,5ppm

DIÁMETRO (nm)	NPAgs(g)	V <sub>T</sub> (g)	[ ] (ppm)
10	0,1466	6,0866	0,4817
20	0,1494	6,0562	0,4934
40	0,1478	6,0526	0,4884
60	0,1476	6,0098	0,4912

Tabla B2.1. Valores de area y altura con y sin columna mediante HDC

ø(nm)	CON COLUMNA			SIN COLUMNA		
	t <sub>r</sub> (min)	AREA	ALTURA	t <sub>r</sub> (min)	AREA	ALTURA
10	8,22	99032,76	651542	0,2	143124,47	1439823
	8,21	139458,4	869255	0,2	143353,2	143353,2
	8,22	131735	799910	0,2	143110,98	143110,98
	media	135596,7	773569	media	143232,09	575429,06
	s	5461,261	49034,32	s	171,275	171,275
	DSR (%)	4,028	6,339	DSR (%)	0,120	0,030
20	8,13	166290,5	1064733	0,2	163294,38	163294,38
	8,14	149288,2	947962	0,2	165421,88	165421,88
	8,14	157902,8	962253	0,2	158035,92	158035,92
	media	153595,5	991649,333	media	161728,9	162250,727
	s	6091,407	10105,263	s	5222,662	5222,662
	DSR (%)	3,966	1,019	DSR (%)	3,229	3,219
40	8,06	146709,2	927045	0,2	1471962	144037
	8,05	134571,8	841471	0,2	1476375	145541,42
	8,06	151849,3	940376	0,21	1475439	149963,05
	media	143210,5	902964	media	1475907	146513,823
	s	12217,02	69936,3962	s	661,852	3126,565
	DSR (%)	8,531	7,745	DSR (%)	0,045	2,134
60	8	126547,7	854723	0,2	157571,13	854723
	8,01	143661,8	930597	0,2	150219,47	930597
	8	129685,9	870581	0,2	153502,36	870581
	media	136673,8	885300,333	media	900589	885300,33
	s	9882,418	42437,7206	s	42437,721	40021,37
	DSR (%)	7,231	4,794	DSR (%)	4,712	4,521

Tabla B2.2 Recuperaciones

RECUPERACIONES	diámetro AgNP (nm)			
	10	20	40	60
AREA	69,19	101,83	101,86	80,31
	97,28	90,25	92,46	95,63
MEDIA	92,05	99,92	101,26	84,48
	94,67	97,33	98,53	86,81
s	3,700	6,210	5,260	7,920
	3,908	6,380	5,340	9,130
DSR (%)				

### B3) FASE MÓVIL 3

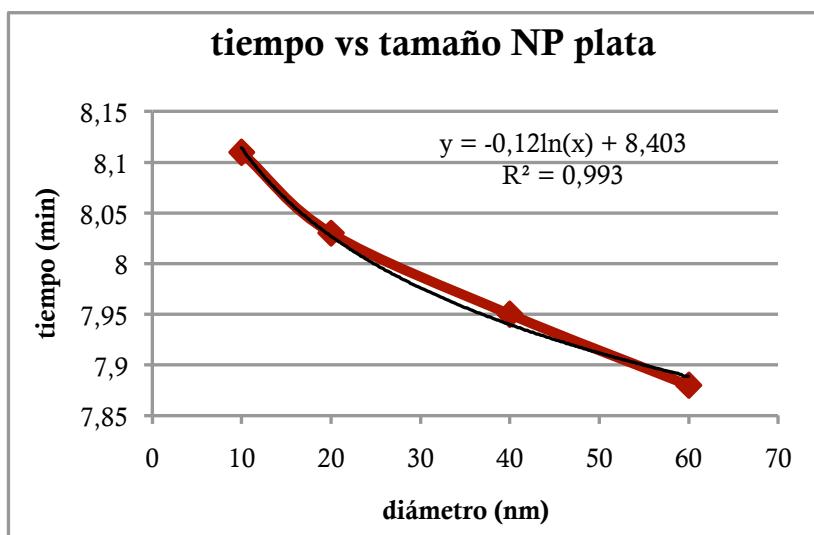
Tabla B3. Concentraciones reales de las disoluciones de patrones de AgNPs de 0,5ppm

DIÁMETRO (nm)	NPAgs(g)	V <sub>T</sub> (g)	[ ] (ppm)
10	0,1512	6,004	0,5037
20	0,1483	6,0073	0,4937
40	0,1487	6,031	0,4931
60	0,1485	6,0416	0,4916

Tabla B3.1. t<sub>r</sub>, s y dsr para los distintos diámetros de AgNP

media tiempo t	s	dsr(%)
8,11	0,0000	0,000
8,03	0,0000	0,000
7,95	0,0058	0,073
7,88	0,0000	0,000

Fig. B3.2. Gráfico de calibración de la FM3 de tiempo frente al tamaño NP



**Tabla B3.3. Valores de area y altura con y sin columna mediante HDC**

<b>ø(nm)</b>	<b>CON COLUMNA</b>			<b>SIN COLUMNA</b>		
	<b>t<sub>r</sub>(min)</b>	<b>AREA</b>	<b>ALTURA</b>	<b>t<sub>r</sub>(min)</b>	<b>AREA</b>	<b>ALTURA</b>
<b>10</b>	8,11	102823	766255	0,2	184146	1766140
	8,11	115465	749367	0,2	163790	1705432
	8,11	95002	705944	0,2	175012	1696701
	media	104430	740522	media	174316	1722758
	s	10326	31113	s	10196	37823
	DSR (%)	9,888	4,202	DSR (%)	5,849	2,195
<b>20</b>	8,03	146375	1021889	0,2	187355	1929018
	8,03	130381	908071	0,2	180224	1918526
	8,03	143427	1005642	0,2	175307	1846069
	media	140061	978534	media	180962	1897871
	s	8512	61561	s	6057,810	45168
	DSR (%)	6,077	6,291	DSR (%)	3,348	2,380
<b>40</b>	7,95	139754	947247	0,2	160405	1662870
	7,94	141107	960185	0,2	162802	1677439
	7,95	138895	1075607	0,21	163247	1666294
	media	139918,667	994346	media	162151,333	1668868
	s	1115	70671	s	1529	7618
	DSR (%)	0,797	7,107	DSR (%)	0,943	0,456
<b>60</b>	7,88	162769	1075607	0,2	200491	2131263
	7,88	163607	1096786	0,19	203713	2174460
	7,88	162429	1091536	0,19	210310	2219971
	media	162935	1087976	media	204838	2175231
	s	606,3	11029	s	5005	44359
	DSR (%)	0,372	1,014	DSR (%)	2,444	2,039

**Tabla B3.4 Recuperaciones**

		<b>diámetro AgNP (nm)</b>			
		<b>10</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>
<b>AREA</b>	55,84	78,13	87,13	81,19	
	70,5	72,34	86,67	80,31	
	54,28	81,81	85,08	77,23	
<b>MEDIA</b>	60,21	77,43	86,29	79,58	
<b>s</b>	8,950	4,770	1,070	2,080	
<b>DSR (%)</b>	14,86	6,170	1,240	2,610	

## B4) FASE MÓVIL 4

Tabla B4. Concentraciones reales de las disoluciones de patrones de AgNPs de 0,5ppm

DIÁMETRO (nm)	NPAgs(g)	V <sub>T</sub> (g)	[ ] (ppm)
10	0,148	6,002	0,4932
20	0,1553	6,0518	0,5132
40	0,1298	6,0458	0,4294
60	0,1471	6,0103	0,4895

Tabla B4.1.  $t_r$ , s y dsr para los distintos diámetros de AgNP

media tiempo r	s	dsr(%)
8,407	0,006	0,069
8,337	0,006	0,069
8,273	0,006	0,070
8,235	0,007	0,086

Fig. B4.2. Gráfico de calibración de la FM4 de tiempo frente al tamaño NP

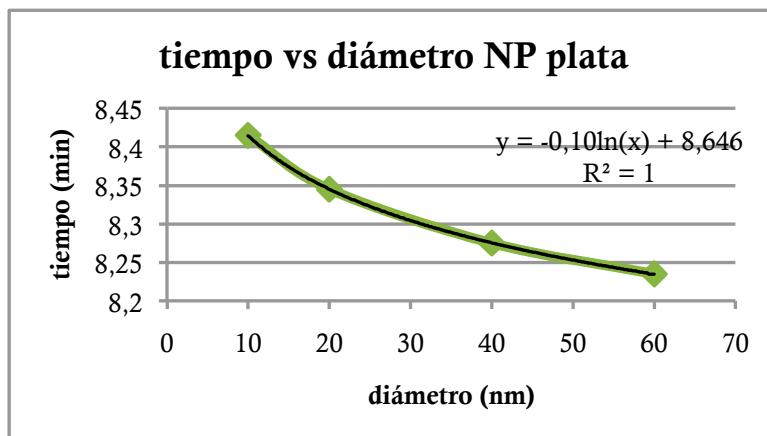


Fig B4.3 Cromatograma de AgNPs de distinto diámetro en fase móvil 4

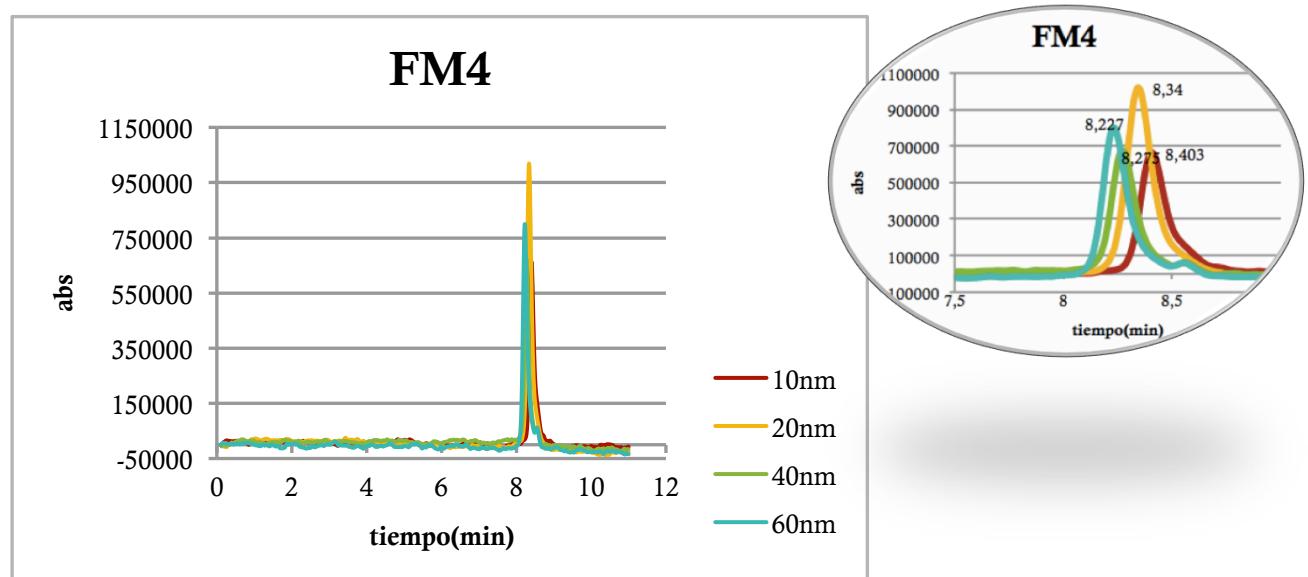


Tabla B4.4. Valores de area y altura con y sin columna mediante HDC

<b>ø(nm)</b>	<b>CON COLUMNA</b>			<b>SIN COLUMNA</b>		
	<b>tr(min)</b>	<b>AREA</b>	<b>ALTURA</b>	<b>tr(min)</b>	<b>AREA</b>	<b>ALTURA</b>
<b>10</b>	8,41	124807	705335	0,2	176777	1870765
	8,4	110961	657898	0,2	180626	1875162
	8,41	100986	668345	0,2	175661	1870648
	media	112251	677193	media	177688	1872192
	s	10326	24925	s	2605	2573
	DSR (%)	9,199	3,681	DSR (%)	1,466	0,137
<b>20</b>	8,34	179557	1030944	0,2	176683	1840399
	8,34	163490	955028	0,2	168940	1766872
	8,33	174469	986510	0,2	176312	1789661
	media	172505	990827	media	173978	1798977
	s	8212	38142	s	4367	37638
	DSR (%)	4,760	3,849	DSR (%)	2,510	2,092
<b>40</b>	8,28	89298	642333	0,2	139900	1479250
	8,27	132123	843983	0,2	142929	1468678
	8,27	136964	806232	0,21	142877	1459292
	media	134544	825108	media	141902	1469073
	s	3423	26694	s	1734	9985
	DSR (%)	2,544	3,235	DSR (%)	1,222	0,680
<b>60</b>	8,23	110240	783476	0,2	135386	1441881
	8,24	43081	299450	0,2	136938	1472676
	anomalo			anomalo		
	media	76660,5	541463	media	136162	1457279
	s	47488,6	342258	s	1097	21775
	DSR (%)	61,95	63,21	DSR (%)	0,806	1,494

Tabla B4.5 Recuperaciones

		<b>diámetro AgNP (nm)</b>			
		<b>10</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>
<b>AREA</b>	70,6	101,63	63,83	81,43	
	61,43	96,77	92,44	31,46	
<b>MEDIA</b>	57,49	98,95	95,86	anomalo	
	63,17	99,12	84,04	---	
<b>s</b>	6,730	2,430	17,59	---	
<b>DSR (%)</b>	10,65	2,450	20,930	---	

## B5) FASE MÓVIL 5

Tabla B5. Concentraciones reales de las disoluciones de patrones de AgNPs de 0,5ppm

$\phi$ (nm)	CON COLUMNA			SIN COLUMNA		
	$t_r$ (min)	AREA	ALTURA	$t_r$ (min)	AREA	ALTURA
10	8,22	99032,76	651542	0,2	143124,47	1439823
	8,21	139458,4	869255	0,2	143353,2	143353,2
	8,22	131735	799910	0,2	143110,98	143110,98
	media	135596,7	773569	media	143232,09	575429,06
	s	5461,261	49034,32	s	171,275	171,275
	DSR (%)	4,028	6,339	DSR (%)	0,120	0,030
20	8,13	166290,5	1064733	0,2	163294,38	163294,38
	8,14	149288,2	947962	0,2	165421,88	165421,88
	8,14	157902,8	962253	0,2	158035,92	158035,92
	media	153595,5	991649,333	media	161728,9	162250,727
	s	6091,407	10105,263	s	5222,662	5222,662
	DSR (%)	3,966	1,019	DSR (%)	3,229	3,219
40	8,06	146709,2	927045	0,2	1471962	144037
	8,05	134571,8	841471	0,2	1476375	145541,42
	8,06	151849,3	940376	0,21	1475439	149963,05
	media	143210,5	902964	media	1475907	146513,823
	s	12217,02	69936,3962	s	661,852	3126,565
	DSR (%)	8,531	7,745	DSR (%)	0,045	2,134
60	8	126547,7	854723	0,2	157571,13	854723
	8,01	143661,8	930597	0,2	150219,47	930597
	8	129685,9	870581	0,2	153502,36	870581
	media	136673,8	885300,333	media	900589	885300,33
	s	9882,418	42437,7206	s	42437,721	40021,37
	DSR (%)	7,231	4,794	DSR (%)	4,712	4,521

Tabla B5.1.  $t_r$ , s y dsr para los distintos diámetros de AgNP

media tiempo	s	dsr(%)
7,99	0	0
7,89	0	0
7,795	0,007	0,091
7,77	0	0

Fig. B5.2. Gráfico de calibración de la FM5 de tiempo frente al tamaño NP

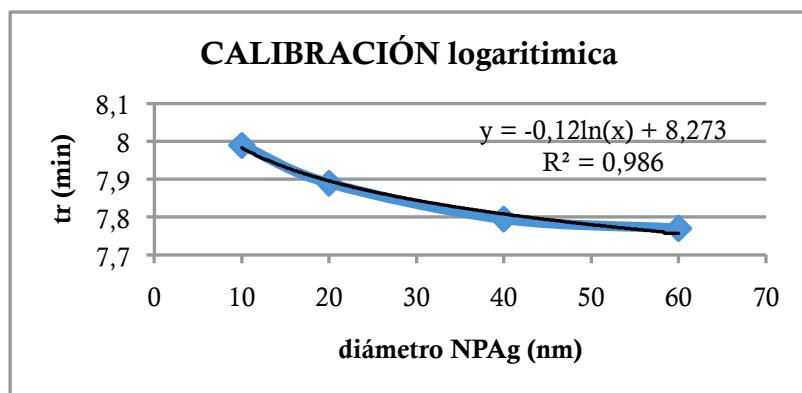


Fig B5.3 Cromatograma de AgNPs de distinto diámetro en fase móvil 5

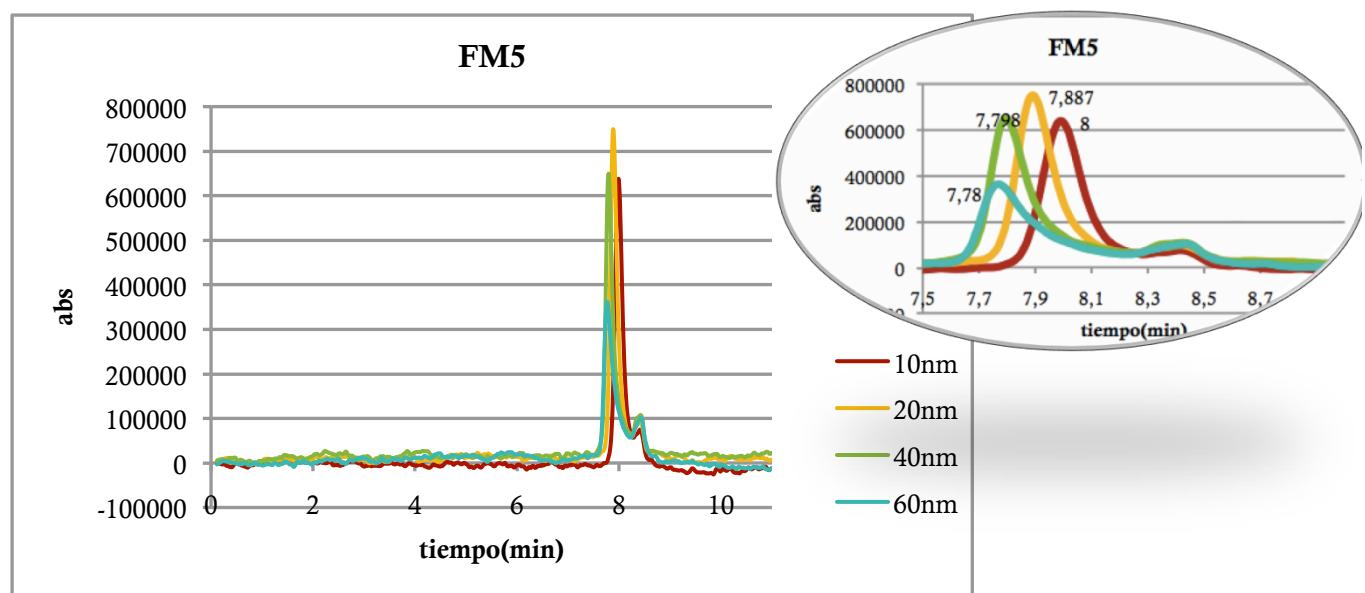


Tabla B5.4. Valores de area y altura con y sin columna mediante HDC

Ø(nm)	CON COLUMNA			SIN COLUMNA		
	tr(min)	AREA	ALTURA	tr(min)	AREA	ALTURA
10	anómalo			0,2	157103	1870765
	7,99	134181	660894	0,2	146660	1875162
	7,99	128332	648968	0,2	148635	1870648
	media	131257	654931	media	150799	1872192
	s	4136	8433	s	5548	2573
	DSR (%)	3,151	1,288	DSR (%)	3,679	0,137
20	anómalo			0,2	179894	1813608
	7,89	136159	736848	0,2	175486	1645308
	7,89	117963	706365	0,2	169497	1627381
	media	127061	721607	media	174959	1695432
	s	12867	21555	s	5218	102735
	DSR (%)	10,13	2,987	DSR (%)	2,983	6,060
40	anómalo			0,2	146781	1524976
	7,79	101048	593180	0,19	159449	1567700
	7,8	110569	614560	0,2	165710	1606256
	media	105809	603870	media	157313	1566311
	s	6732	15118	s	9644	40658
	DSR (%)	6,363	2,504	DSR (%)	6,130	2,596
60	anómalo			0,2	172169	1776148
	7,77	71014	330778	0,19	171223	1692998
	7,77	88171	346341	0,2	176976	1739146
	media	79593	338560	media	171696	1736097
	s	12132	11005	s	669	41659
	DSR (%)	15,24	3,250	DSR (%)	0,390	2,400

Tabla B5.5 Recuperaciones

RECUPERACIONES	diámetro AgNP (nm)			
	10	20	40	60
AREA	anómalo	anómalo	anómalo	anómalo
	91,49	77,59	63,37	41,47
	86,34	69,6	66,72	49,82
MEDIA	88,92	73,59	65,05	45,65
S	3,642	5,652	2,37	5,902
DSR (%)	4,096	7,681	3,643	12,93

## B6) FASE MÓVIL 6

Tabla B6. Concentraciones reales de las disoluciones de patrones de AgNPs de 0,5ppm

$\phi$ (nm)	V AgNP (g)	V total (g)	[ ] (ppm)
10	0,1463	6,032	0,4851
20	0,1498	6,0716	0,4934
40	0,1477	6,0122	0,4913
60	0,1562	6,0378	0,5174

Tabla B6.1.  $t_r$ ,  $s$  y  $dsr$  para los distintos diámetros de AgNP

media tiempo $t_r$	s	dsr(%)
8,1967	0,0058	0,0704
8,1167	0,0058	0,0711
NO HAY PICO		
7,9850	0,0071	0,0886

Fig. B6.2. Gráfico de calibración de la FM6 de tiempo frente al tamaño NP

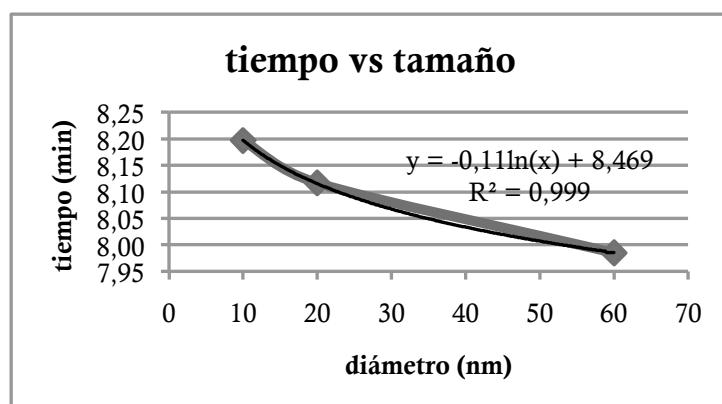


Fig. B6.3 Cromatograma de AgNPs de distinto diámetro en fase móvil 6

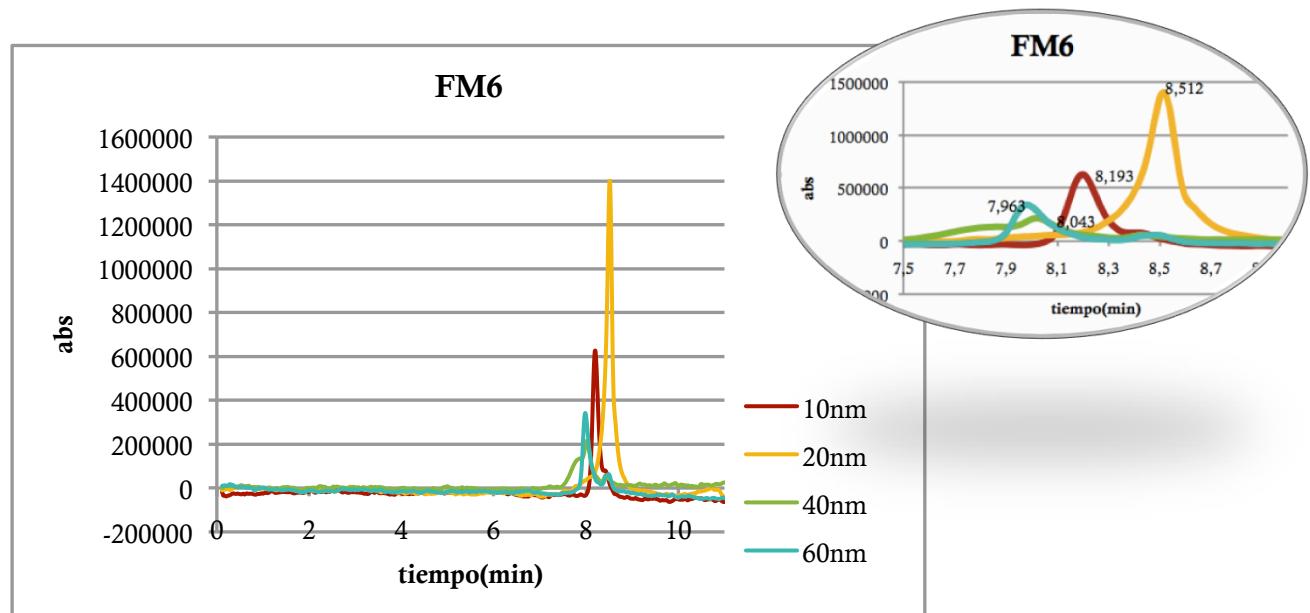


Tabla B6.4. Valores de area y altura con y sin columna mediante HDC

<b>Ø(nm)</b>	<b>CON COLUMNA</b>			<b>SIN COLUMNA</b>		
	<b>tr(min)</b>	<b>AREA</b>	<b>ALTURA</b>	<b>tr(min)</b>	<b>AREA</b>	<b>ALTURA</b>
<b>10</b>	8,2	107629,4	665807	0,2	152239	1478770
	8,2	104079,4	619739	0,2	142060	1376884
	8,19	99225,8	615486	0,2	139131	1350550
	media	103645	633677	media	144477	1402068
	s	4219	27906	s	6880	67718
	DSR (%)	4,070	4,404	DSR (%)	4,762	4,830
<b>20</b>	8,12	96524	635907	0,2	153953	1489091
	8,11	92981	605751	0,2	151011	1472851
	8,12	105260	615398	0,2	151606	1492282
	media	98255	619019	media	152190	1484741
	s	6320	15401	s	1556	10420
	DSR (%)	6,432	2,488	DSR (%)	1,022	0,702
<b>40</b>	no hay pico	---	---	0,2	160405	1662870
		---	---	no hay picos	---	---
		---	---		---	---
	media			media		
	s			s		
	DSR (%)			DSR (%)		
<b>60</b>	7,98	80797	375230	no hay picos	---	---
	7,99	16280	96126		---	---
	anomalo				---	---
	media	48538,5	235678	media		
	s	45620	197356	s		
	DSR (%)	93,99	83,74	DSR (%)		

Tabla B6.5 Recuperaciones

	<b>diámetro AgNP (nm)</b>			
	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>
<b>AREA</b>	70,7	62,7	---	---
	73,26	61,57	---	---
	71,32	69,43	---	---
<b>MEDIA</b>	71,76	64,56	---	---
	1,339	4,250	---	---
<b>s</b>	1,866	6,582	---	---
<b>DSR (%)</b>				

## C) HDC-ICP-MASAS

### C1) rectas calibrado

Tabla C1.1. Rectas de calibrado de distintas matrices

Ag <sup>+</sup> isótopo 107	HNO <sub>3</sub> 1%	H <sub>2</sub> O milliQ	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 1mM	PA 0,2mM
Recta calibrado R	y = 16694x + 25866 0,999	y = 16693x + 6542 0,991	y = 16192x + 71734 0,999	y = 18582x - 40980 0,999
σ	302,3	29004	273,8	1893

Tabla C1.2. test t a dos colas

disoluciones	probabilidad t 2colas (%)	conclusión
HNO <sub>3</sub> vs H <sub>2</sub> O	99,95	estadisticamente iguales
HNO <sub>3</sub> vs S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	34,39	estadisticamente iguales
HNO <sub>3</sub> vs PA	42,85	estadisticamente iguales
H <sub>2</sub> O vs S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	77,45	estadisticamente iguales
H <sub>2</sub> O vs PA	51,66	estadisticamente iguales
S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> vs PA	33,79	estadisticamente iguales