



---

# CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN SUPLEMENTOS ALIMENTARIOS MEDIANTE ESPECTROSCOPÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA-LLAMA (FAAS)

---

**Trabajo de Fin de Grado**



JULIA CASANOVA CALVO

14 DE SEPTIEMBRE 2018, ZARAGOZA  
DIRECTORA. DRA. MARÍA TERESA GÓMEZ COTÍN  
Departamento de Química Analítica



## Acrónimos

- NPs – Nanopartícula.
- AgNPs - Nanopartícula de plata.
- Sinst - Incertidumbre instrumental.
- Scal - Incertidumbre de calibración.
- Sprep - Incertidumbre de preparación.
- DSR- Desviación estándar relativa.
- DSRmétodo - Desviación estándar relativa del método.
- FAAS - Espectroscopía de Absorción Atómica-Llama.
- HDC- Cromatografía Hidrodinámica.
- ICP-MS - Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente.
- FAAS - Espectrometría de Absorción Atómica en Llama.
- GFAAS - Espectroscopía de Absorción Atómica con Atomización Electrotérmica.
- UF - Ultrafiltración.
- FTIR - Espectrometría infrarroja por Transformadas de Fourier.
- DLS - Dispersión dinámica de la luz.
- FFF - Fraccionamiento en Flujo mediante Campos.
- SEC- Cromatografía por Exclusión de Tamaños.
- TEM - Microscopía de Transmisión Electrónica.

## Resumen

El uso de nanopartículas de plata está actualmente muy extendido debido a sus múltiples aplicaciones en distintos campos como medicina, electrónica, cosmética o alimentación. Se han desarrollado diversos métodos para su caracterización y cuantificación a lo largo de los últimos años. En este trabajo se ha utilizado la Espectrofotometría ultravioleta-visible (EAM) para estudiar la estabilidad de AgNPs tanto en patrones con nanopartículas de diferente diámetro, como en muestras complejas del campo de suplementos alimentarios. La Espectroscopía de Absorción en llama (FAAS) ha sido la técnica elegida para determinar el contenido total de plata en dichas muestras realizando previamente un ataque oxidante de las mismas. Para determinar el contenido de AgNPs se han realizado procesos de ultrafiltración para separar las dos especies de plata, y combinado con la medición por FAAS se determina el contenido de Ag iónica y AgNPs en las muestras reales.

## Abstract

The use of silver nanoparticles is currently very widespread due to its multiple applications in different fields such as medicine, electronic, cosmetics or even food. Several methods have been developed to characterize and quantify AgNPs, over the last few years. In this work, Ultraviolet-Visible Spectrophotometry (EAM) was used to study the stability of AgNPs both in different diameter patterns and in complex samples of the food supplement field. Flame Absorption Spectroscopy (FAAS) has been the technique chosen to determine the total silver content in said samples, previously carrying out an oxidative attack in that samples. To determine the content of AgNPs, ultrafiltration processes have been carried out to separate the two species (Ionic Silver and Silver Nanoparticles) and combined with the measurement by FAAS the content of ionic Ag and AgNPs in the real samples is determined.

## Índice

1. Introducción.....	5
1.1 Importancia de las Nanopartículas: AgNPs.....	5
1.2 Técnicas analíticas para el estudio de nanopartículas.....	6
1.3 Técnicas de separación de nanopartículas.....	7
2. Objetivos y planteamiento del trabajo.....	8
3. Parte experimental.....	9
3.1 Instrumentos y Aparatos.....	9
3.1.1 Instrumentos.....	8
3.1.2 Aparatos.....	9
3.2 Material empleado.....	10
3.3 Reactivos, disoluciones patrón y muestras.....	10
3.3.1 Reactivos.....	10
3.3.2 Disoluciones Patrón y Estándares.....	10
3.3.3 Muestras.....	10
3.4 Metodología.....	11
3.4.1 Caracterización de AgNPs mediante EAM.....	11
3.4.2 Contenido total de Ag(I) en las muestras: procedimiento de digestión....	12
3.4.3 Preparación de las calibraciones.....	13
3.4.4 Procedimiento de separación de AgNPs: Ultrafiltración.....	13
3.4.5 Ultrafiltración y FAAS: Determinación de contenido de Ag (I) y AgNPs en cada muestra comercial.....	14
4. Resultados y Discusión.....	15
4.1 Caracterización de las Nanopartículas.....	15
4.2 Determinación de los contenidos totales de Ag de las muestras comerciales por espectroscopía de absorción atómica (FAAS).....	20
4.3 Determinación del contenido de AgNPs: Aplicación de la ultrafiltración.....	23
4.4 Comparación del contenido de Ag (I) por los diferentes métodos.....	26
5. Conclusiones.....	26
6. Bibliografía.....	27

## 1. Introducción

### 1.1. Importancia de las Nanopartículas: AgNPs.

Actualmente el uso de nanomateriales es algo común que cada vez va tomando mayor importancia. La Comisión Europea en 2011 definió nanomaterial <sup>1</sup> como “un material natural, secundario o fabricado que contenga partículas, sueltas o formando un agregado o aglomerado y en el que el 50 % o más de las partículas en la granulometría numérica presente una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre 1 nm y 100 nm. En casos específicos y cuando se justifique por preocupaciones de medio ambiente, salud, seguridad o competitividad, el umbral de la granulometría numérica del 50 % puede sustituirse por un umbral comprendido entre el 1 % y el 50 %».

Se investiga el empleo de nanopartículas en diferentes campos, ya que éstas son de gran interés científico. Las propiedades de los nanomateriales son muy diferentes a las de los mismos materiales a gran escala.<sup>2</sup> Esto se debe a que las NPs poseen mayor relación superficie-volumen, y por lo tanto mayor superficie de contacto<sup>3</sup>, lo cual junto a su pequeño tamaño, confiere a los nanomateriales mejores propiedades mecánicas, catalíticas y ópticas<sup>4</sup>. Pueden encontrarse diferentes tipos de NPs como son las de titanio, cromo, sílice, plata, oro<sup>5</sup>, y todas ellas se utilizan en diferentes campos como son la química, biología, física, medicina, tecnología, industria textil, agricultura...

De entre todos los tipos de NPs, una de las más utilizadas son las nanopartículas de plata (AgNPs), esto es debido a sus propiedades físicas y químicas tales como su gran superficie, la estabilidad química que poseen, y sus destacables propiedades ópticas que hacen que su aplicabilidad esté presente en sectores como la electroquímica, la ciencia de materiales, en dispositivos electrónicos, en sensores químico-biológicos y en catálisis entre otros<sup>6</sup>. Pero sin lugar a dudas, una de las aplicaciones más destacable de las AgNPs es su actividad antibacteriana y antimicrobiana, como por ejemplo en el caso de las AgNPs como bactericida ante la *Listeria monocytogenes*<sup>7</sup>.

Según numerosos estudios <sup>8 9 10 11</sup>, las AgNPs son las más utilizadas en el campo de la medicina y en lo relacionado con la salud pública, ya que actúan como antibacterianas, antimicrobianas y antifúngicas. Su aplicación no solo abarca el sector farmacéutico y terapéutico, sino también muchos otros como pueden ser el textil o en el alimenticio. Por ejemplo, las AgNPs se utilizan en apósitos y tratamientos de úlceras gracias a su poder antibacteriano, y en el sector alimenticio el empleo de AgNPs es común en el envasado de alimentos<sup>10</sup>. Por estudios previos se conoce que el tamaño de las NPs afectan a la

actividad bacteriana, siendo las AgNPs de tamaño inferior a 100 nm<sup>12</sup>, y especialmente de 1 a 10 nm las más efectivas<sup>13</sup>.

Puesto que el empleo de AgNPs es muy común y cada vez es más demandado, también es interesante estudiar sus posibles efectos adversos, tanto en el consumo de productos que las contengan, como el consumo directo de éstas <sup>14</sup>. La toxicidad de las AgNPs parece estar asociada a su forma oxidada cuando la plata se encuentra como plata iónica. Aunque por ahora no se ha demostrado efectos toxicológicos en seres humanos, si se ha hecho sobre bacterias, hongos y plantas<sup>15</sup>.

Debido a estos posibles efectos toxicológicos es de interés el poder determinar y caracterizar las AgNPs en diferentes tipos de muestras.

## 1.2. Técnicas analíticas para el estudio de nanopartículas.

Para la determinación de NPs en nanomateriales pueden utilizarse diferentes técnicas.

La **Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente** es una técnica que ioniza a los componentes de las muestras y los separa según su relación de radio/carga, proporcionando información sobre éstas. Es muy utilizada debido a su bajo límite de detección del orden de ng L<sup>-1</sup>. Se han realizado estudios para la determinación de NPs en diferentes bebidas mediante esta técnica<sup>16</sup>.

La **Espectroscopia de Absorción Atómica en Llama (FAAS)** es otra técnica que se basa en la absorción de la radiación procedente de una lámpara por los átomos formados en la llama a partir de una muestra líquida. Con ella se puede detectar y determinar la presencia de cualquier metal siempre que la muestra susceptible a ser disuelta <sup>17</sup>. Los límites de detección en este caso son del orden de mg L<sup>-1</sup>.

**Espectroscopia de Absorción atómica con Atomización Electrotérmica (GFAAS)** <sup>18</sup> es una técnica basada en la absorción de radiación por parte de los átomos, que han sido formados en un tubo de grafito debido al paso de corriente eléctrica. La ventaja de esta técnica es que permite trabajar con muestras de un volumen muy pequeño (100 uL) e incluso con muestras orgánicas que han sido diluidas. Su límite de detección es del orden de ug L<sup>-1</sup>. Su uso más común es la detección de metales en agua, alimentos y cosméticos.

Las técnicas más comunes para la caracterización de nanopartículas incluyen técnicas capaces de diferenciar la morfología y/o el tamaño de estas.

La **Espectrofotometría de Absorción Molecular Ultravioleta Visible (EAM UV-VIS)** ha sido utilizada lo largo del tiempo para la caracterización de moléculas en química analítica. Las muestras son irradiadas con luz correspondiente al rango del ultravioleta-visible y al incidir sobre ella se produce la absorción. La información proporcionada por esta técnica son espectros en los que se relaciona la absorbancia con la longitud de onda (nm). Esta técnica ha sido previamente utilizada para la determinación de AgNPs junto con otras <sup>8</sup> ya que permite aproximar el diámetro de las NPs.

**Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)** es una técnica basada en la utilización de un haz de electrones que incide con la muestra y permite caracterizarla. Presenta una alta resolución lo que permite utilizarla para el estudio de minerales, metales y células a nivel molecular. Las imágenes proporcionadas por esta técnica proporcionan tanto el tamaño y morfología, así como el estado de agregación de las partículas. Por ello, se ha utilizado en varios estudios para la caracterización de AgNPs <sup>5 8</sup>.

**Espectrometría infrarroja por Transformadas de Fourier (FTIR)** El principio básico de esta técnica es que las moléculas absorben luz en longitudes de ondas específicas, en frecuencias de vibración. El barrido va desde unas longitudes de onda de  $400\text{ cm}^{-1}$  hasta  $600\text{ cm}^{-1}$ . Se han caracterizado AgNPs anteriormente con esta técnica <sup>5 8</sup>.

**Dispersión Dinámica de la Luz (DLS)** Es una técnica empleada para la determinación de la distribución de tamaños de macromoléculas o de partículas en dispersión. Se ha hecho uso de ella anteriormente para la determinación de AgNPs <sup>8</sup>.

### 1.3. Técnicas de separación de las nanopartículas.

Es interesante separar las nanopartículas en función de su tamaño, basándose en diferentes principios como la exclusión molecular.

Las técnicas de separación habituales se utilizan junto con diferentes técnicas de detección de los compuestos una vez han sido separados.

La **Ultrafiltración (UF)** es un procedimiento que se utiliza para separar material coloidal en diferentes rangos de tamaño <sup>19</sup>. La ultrafiltración se debe a la utilización de membranas con un tamaño de poro definido. El paso de la disolución a través de la membrana se debe a la presión hidrostática, y esto permite que las partículas coloidales, de diámetro mayor que el poro, queden retenidas en la membrana.

**Fraccionamiento en Flujo mediante Campos (FFF)** es una técnica en la que se aplica un campo en dirección perpendicular a un canal por el cual se desplazan las diferentes especies (NPs o no) en régimen laminar. Se ha empleado con distintas NPs, entre las cuales se encuentran las de Ag <sup>20</sup>.

## Métodos cromatográficos y electroforéticos (HCD) (SEC).

La **Cromatografía Hidrodinámica (HCD)** utiliza una columna la cual tiene un empaquetamiento interior con macropartículas no porosas y que permite la separación de muestras gracias a la diferencia de la velocidad del flujo y la velocidad de gradiente, se conjugan un efecto hidrodinámico y otro eléctrico en la separación <sup>21</sup>.

Mientras que la **Cromatografía por Exclusión de Tamaños (SEC)** utilizan una columna con un empaquetamiento poroso. Las partículas que tiene un tamaño igual o inferior al poro quedan retenidas, mientras que el resto avanza con el flujo <sup>22</sup>.

## 2. Objetivos y planteamiento del trabajo

El objetivo fundamental de este trabajo es la determinación del contenido de Plata en muestras complejas reales, suplementos alimentarios que operan como bebidas energéticas o favorables para la salud, tanto en forma iónica como en forma de nanopartículas, AgNPs.

Los objetivos específicos para llevar a cabo el objetivo general son:

- Caracterización previa y cualitativa de AgNPs tanto en patrones como en muestras por EAM UV-VIS y el estudio de su estabilidad a lo largo del tiempo.
- Determinación de los contenidos totales de plata en las muestras reales mediante FAAS.
- Determinación del contenido de AgNPs en las muestras combinando separación por ultrafiltración y detección por FAAS.

Además, los objetivos académicos que se persiguen son los siguientes:

- Realización de búsquedas bibliográficas para conocer antecedentes del tema y familiarizar con recursos electrónicos.
- Mejorar la formación adquirida en el Grado respecto de trabajar en un laboratorio e integración en un equipo de investigación.
- Mejorar la capacidad de interpretar datos y medidas experimentales aplicando conocimientos de la carrera y combinarlos con estudios de inicio de trabajo con un perfil más investigador.

### 3. Parte experimental

#### 3.1. Instrumentación y Aparatos

##### 3.1.1 Instrumentos

- Espectrofotómetro de absorción atómica en llama modelo Perkin Elmer AA200 equipado con lámpara de cátodo hueco de Ag.
- Espectrofotómetro de absorción UV-vis de doble haz Jasco V-730 (Jasco Oklhoma, EE.UU.).
- Balanza analítica GH-200 con precisión de  $\pm 0,1$  mg.

*Tabla 3.1 Para las determinaciones de contenidos totales que se llevan a cabo en el espectrofotómetro de absorción atómica, las condiciones instrumentales siempre son las indicadas a continuación.*

<b><math>\lambda</math> (nm)</b>	<b>328 nm</b>
<b>Slit (nm)</b>	<b>0.8</b>
<b>Caudal aire/acetileno (L/min)</b>	<b>10/ 2,5</b>
<b>Nº Replicas</b>	<b>3</b>
<b>Tiempo retraso de lectura (s)</b>	<b>2</b>

##### 3.1.2 Aparatos

- Centrífuga Thermo scientific Heraeus Multifuge X1R.
- Baño de ultrasonidos Ultrasons P Selecta.
- Sistema de agitación rotatorio Heidolph.
- Sistema de generación de agua ultrapura MILLIPORE.
- Micropipetas RAININ SL-1000 (100-1000 $\mu$ L), BIOHIT PROLINE (5-50  $\mu$ L), Bibby Sterilin (50-200 $\mu$ L).

### 3.2. Material empleado

- Ultrafiltros Nanosep 3 KDa OMEGA (Pall).
- Tubos Falcon de 15 y de 50 ml.
- Eppendorf.

### 3.3. Reactivos, disoluciones patrón y muestras.

#### 3.3.1 Reactivos

- Ácido nítrico  $\text{HNO}_3$  69,0-70,0 % (m/m) J.T.Baker.
- Ácido nítrico  $\text{HNO}_3$  69,0% (m/m) PanReac AppliChem.
- Agua Ultrapura (Millipore).

#### 3.3.2 Disoluciones patrón y estándares

- Patrón de Ag (I) para ICP de  $994 \pm 3$  mg/l (Sigma-Aldrich, Suiza)
- Disoluciones estándares de Nanopartículas de plata.
  - 10 nm Silver Nanospheres, citrate. Nanoxact 0.02 mg/ml (Marca nanoComposix San Diego, EE.UU.).
  - 20 nm Silver Nanospheres, citrate. Nanoxact 0.02 mg/ml (Marca nanoComposix San Diego, EE.UU.).
  - 40 nm Silver Nanospheres, citrate. Nanoxact 0.02 mg/ml (Marca nanoComposix San Diego, EE.UU.).
  - 60 nm Silver Nanospheres, citrate. Nanoxact 0.02 mg/ml (Marca nanoComposix San Diego, EE.UU.).

#### 3.3.3 Muestras

Se ha trabajado con tres muestras diferentes que son suplementos alimentarios en la dieta humana y tienen interés medicinal. En sus etiquetas se expresa el contenido total de plata para cada una de las muestras según el fabricante.

Una de las tres muestras comerciales, la muestra Wellness, se agotó durante la realización del trabajo, y se repuso una nueva. Todos los experimentos se han realizado con ambas muestras Wellness, a las cuales diferenciaremos como *Wellness Original* y *Wellness Nueva*.

- Rivers of Heath High Stability Colloidal Silver 10 mg/L (500 ml).

- Ionic Silver and Colloidal Biovedik 25 mg/L (100ml).
- Colloidal Silver Wellness 30 mg/L (59.14 ml).

El material utilizado para la preparación de disoluciones de patrones y muestras ha sido previamente sumergido en una disolución de  $\text{HNO}_3$  en agua MilliQ al 10% (v/v) durante 24 h, y posteriormente lavado con agua desionizada. Antes de ser utilizado, se deja secar en la estufa para la completa evaporación del agua. Así se asegura que el material está totalmente limpio y no contaminado.

### 3.4. Metodología

#### 3.4.1 Caracterización de AgNPs mediante EAM

Las nanopartículas de plata presentan absorción molecular en la zona del UV-visible debido su característica de resonancia superficial plasmónica<sup>23</sup> entorno a una longitud de onda de 300 a 400 nm.

Para poder realizar la caracterización y observar la estabilidad de las AgNPs hemos utilizado la EAM-UV-vis. Es la técnica de la cual se dispone en el laboratorio y que de forma aproximada y cualitativa nos puede dar información sobre el tamaño de las nanopartículas presentes en la muestra. Además, y es lo que se pretendía, nos puede ayudar a conocer la estabilidad de las nanopartículas tanto de patrones como en muestras en tiempo real, y saber si se han producido agregaciones que alteren el estado de las muestras estudiadas.

Se obtienen los espectros de las disoluciones de AgNPs de distintos tamaños, así como de las muestras de interés que pueden contener AgNPs.

Para realizar estas medidas se emplea el espectrofotómetro y se utilizan cubetas de 10 mm de espesor de cuarzo. Se eligen de este material puesto que es transparente en todo el rango de UV-VIS. Las medidas se llevan a cabo a temperatura ambiente<sup>9</sup>. En los espectros obtenidos se representa la absorbancia frente a la longitud de onda (nm) de cada muestra y patrón.

Antes de comenzar a medir cada una de las disoluciones, deben limpiarse las cubetas con agua MilliQ y deben ser homogeneizadas con la disolución correspondiente.

Para obtener los espectros adecuados se preparan disoluciones de concentración de 5 mg/L que entran dentro del rango lineal del método. Para la preparación de las disoluciones correspondientes, previamente es necesario sonicar cada una de las muestras y patrones que contienen AgNPs. Así trabajamos con disoluciones que contienen NPs y son homogéneas, el sólido está distribuido por todo el líquido.

Gracias al sonicado evitamos que las AgNs se agreguen y aseguramos la homogeneidad.

Una vez sonicadas las muestras y patrones originales se toman los correspondientes mL de éstas y se diluye en agua MilliQ hasta obtener una concentración de 5mg/L.

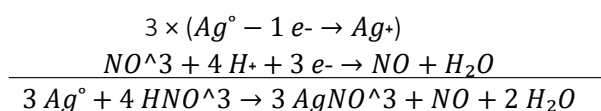
Previamente a realizar las medidas, deben optimizarse las condiciones. Se realiza la corrección con la línea base empleando agua MilliQ tanto en la cubeta de referencia como la de medida, realizando un barrido entre unas longitudes de onda de 200-300 nm a 500 nm.

Para determinar la estabilidad de las AgNPs tanto de muestras como de patrones, se medirá en distintos días la misma disolución preparada de concentración 5mg/L.

### 3.4.2. Contenido total de Ag (I) en las muestras: procedimiento de digestión.

Nuestro objetivo es determinar cuanta plata iónica y cuanta plata en forma de nanopartícula tienen las muestras comerciales. Para poder hacer esta distinción entre ambos tipos de plata, es necesario previamente determinar el contenido total de plata. La acción que se lleva a cabo es convertir toda la plata presente en la muestra en plata iónica. Para ello se realiza una digestión ácida con HNO<sub>3</sub> ya que mediante una reacción redox la Ag (0) se transforma en Ag (I).

A continuación, vemos el efecto de la digestión ácida sobre las muestras:



Una vez toda la plata de la muestra es convertida a plata iónica con ataque ácido, se determina el contenido total mediante FAAS utilizando métodos de calibración distintos: interpolación en calibración externa y adición estándar.

En la determinación del contenido total mediante FAAS las condiciones son las indicadas en el [punto 3.1.1. Instrumentos, en la Tabla 3.1.](#)

Las tablas correspondientes a la preparación de las muestras por ambos métodos, donde el ataque ácido se lleva a cabo con HNO<sub>3</sub> concentrado al 69%, se encuentran en los anexos indicados. [Anexos: Punto 1. Tabla 1. y Punto 2. Tablas 2.1 2.2 2.3 y 2.4.](#)

\*Se debe de tener en cuenta que para la calibración interna las preparaciones de las muestras implican la preparación de la recta de calibrado.

### 3.4.3 Preparación de las calibraciones.

Para la determinación de contenidos totales se proponen dos métodos distintos, la calibración externa y la calibración interna.

La calibración externa es también conocida como el método clásico de interpolación en la recta de calibrado. Para la obtención de ésta se preparan patrones en agua o en un método lo más parecido a la muestra. En nuestro caso utilizamos  $\text{HNO}_3$  al 1%. Todos los patrones se preparan por pesada como se indica en el [Anexo 3. Tabla 3.1](#).

Para el caso de la calibración interna, comúnmente conocida como adición estándar, los patrones incluyen una determinada cantidad de muestra o problema, de forma que el entorno químico de muestras problema es el mismo y se minimizan interferencias proporcionales. En el [Punto 2 de los Anexos en las Tablas 2.1, 2.2, 2.3 y 2.4](#) se indica mediante un ejemplo la preparación de estas rectas.

### 3.4.4. Procedimiento de separación de AgNPs: Ultrafiltración.

La ultrafiltración<sup>17</sup> es una técnica mediante la cual se permite la separación de sustancias sin producirse cambios de fase. Para que se produzca esta ultrafiltración se necesitan unos filtros permeables que tengan un tamaño de poro definido, además se necesita una presión de unas 4 u 8 atmósferas, que permita a las partículas fluir a través de la membrana permeable.

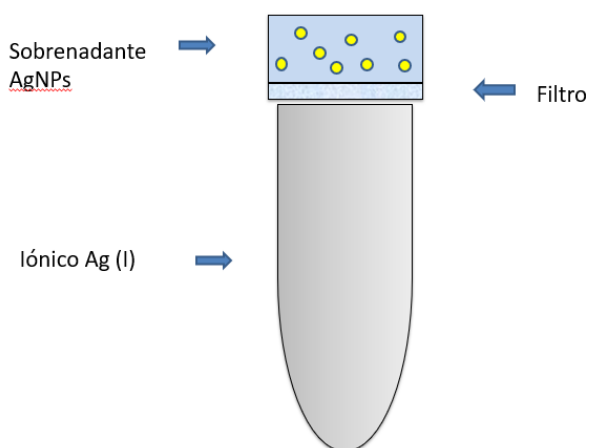


Imagen 1. Filtro utilizado para la Ultrafiltración.

En este caso, esta técnica es muy útil puesto que permite la separación de las AgNPs presentes en las muestras comerciales, de la  $\text{Ag(I)}$  que se encuentra en estas.

Para la realización de la ultrafiltración hay que acondicionar previamente los filtros a utilizar. Se realizó un estudio sobre como debían acondicionarse estos. En primer lugar, se pensó hacerlo lavándolos con  $\text{HNO}_3$  puesto que es el ácido con el que se trabaja junto con la manipulación de plata. Se vio que la

acidez de  $\text{HNO}_3$  era muy fuerte para los filtros y en consecuencia estos se estropeaban, permitiendo que pasara todo el contenido que se quería filtrar.

Finalmente se optó por hacer un lavado de los filtros con H<sub>2</sub>O MilliQ ya que esta no daña la membrana porosa.

Para poder llevar a cabo la ultrafiltración se acondicionan los tubos de UF de la siguiente manera: se adiciona a cada filtro con un 1ml de agua MilliQ y se centrifuga durante 10 minutos a 9000 rpm, esta operación se repite una vez más en cada filtro. Una vez hecho esto, se adiciona en cada filtro 0.5 gramos aproximadamente la muestra que se quiera separar, previamente estas muestras comerciales habrán sido sonicadas para evitar la aglomeración de AgNPs. Una vez añadida la muestra, esta se centrifuga durante 30 minutos a 9000 rpm.

#### **3.4.5. Ultrafiltración y FAAS: Determinación de contenido de Ag (I) y de AgNPs en cada muestra comercial.**

Las técnicas de separación, como es el caso de la UF, van acompañadas de técnicas de separación. En este estudio se combinan la UF con la FAAS para la determinación de la Ag (I) en disoluciones ultrafiltradas.

Tras ultrafiltrar las tres muestras comerciales, se obtiene de ellas el contenido de plata iónica, que por diferencia con el contenido total de plata iónica (tras haber sufrido digestión ácida) de cada una de las muestras nos permitirá obtener el contenido de AgNPs.

*Concentración de Ag(I) total tras digestión ácida*

*– Concentración de Ag(I) tras ultrafiltración*

*= Concentración de AgNPs en una muestra comercial*

Por lo tanto, una vez se separa la plata iónica de las AgNPs, se toma la disolución filtrada y se obtiene una muestra de concentración adecuada para ser medida mediante FAAS. Las condiciones para la determinación del contenido de Ag (I) se encuentran en el [Punto 3.1.1 Tabla 3.1](#).

Será necesario preparar una recta de calibrado mediante calibración externa, en la cual se interpolarán las muestras de la ultrafiltración. Adicionalmente se prepararán y ultrafiltrarán patrones de concentración conocida de Ag(I) para comprobar que la ultrafiltración se realiza con éxito, ya que estos deberían mantener su contenido de Ag(I) constante. La *preparación de los patrones de Ag(I) de concentración conocida* se encuentra en [los Anexos en el Punto 0 Tabla 0.2](#).

La preparación de las disoluciones las muestras y de los *patrones de concentración conocida* tras la ultrafiltración para la interpolación en la recta de calibrado se encuentra en el [Anexo Punto 4. Tabla 4.1. y Tabla 4.2.](#)

## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Caracterización de las nanopartículas.

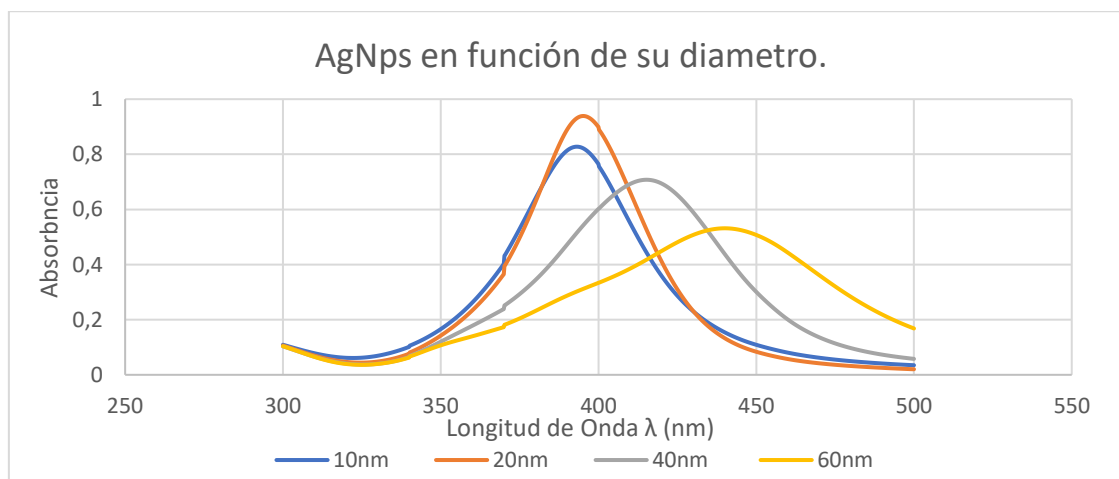
Se realiza una caracterización cualitativa de AgNPs por EAM puesto que es la técnica con la que contamos en el laboratorio, que proporciona una información aproximada sobre el tamaño de las AgNPs. Sin embargo, se encuentran técnicas como DLS, Luz Dispersa o bien Microscopía Electrónica, que por sí solos, o bien combinadas proporcionan una mejor caracterización más exhaustiva de las nanopartículas de las muestras.

Las AgNPs pueden tener diferentes diámetros en sus nanopartículas, a pesar de ello, por tratarse en todos los casos de AgNPs, presentan su máximo de absorbancia en torno a 400 nm, como se ha comentado previamente, debido a la resonancia del plasmón de superficie localizada<sup>24</sup>.

Se han caracterizado diferentes patrones de AgNPs de distintos diámetros.

Al representar conjuntamente los espectros de los diferentes patrones en la Figura 4.1.1., puede observarse que a medida que aumenta el diámetro de las nanopartículas, el máximo de absorbancia de estas se desplaza hacia valores mayores de longitud de onda.

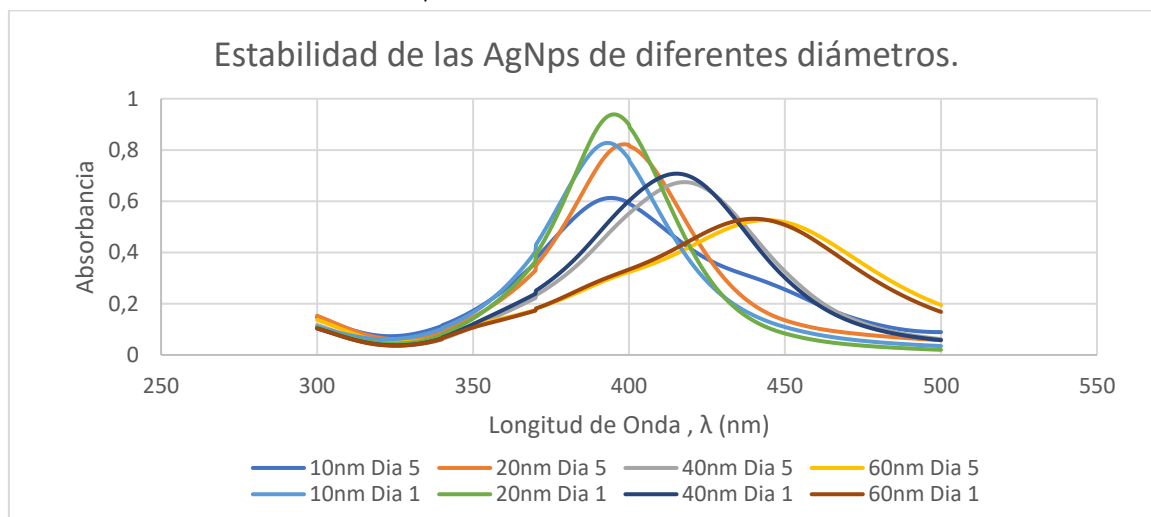
Figura 4.1.1. Espectro de absorción de los patrones de AgNPs. AgNPs (5 mg/L).



Se observa que para las AgNPs de 10 nm de máximo de absorbancia se sitúa en 393.20 y que las longitudes van aumentando progresivamente hasta las AgNPs de 60 nm cuyo máximo de absorbancia se encuentra en 439.80 nm.

La EAM también se ha utilizado para comprobar la estabilidad de las AgNPs. Se han obtenido los espectros de las mismas disoluciones durante distintos días, así se puede comprobar si la señal se mantiene a la misma  $\lambda$  o si el máximo se traslada a  $\lambda$  mayores, lo cual indicaría estados de agregación de las AgNPs. En la figura 4.1.2. se observa cómo influye el tiempo en la estabilidad de las AgNPs de los patrones.

*Figura 4.1.2. Estabilidad de las AgNPs en función de su diámetro, realizadas las mediciones en un intervalo de separación de 5 días.*



En la tabla 4.1.1., se observa que al cabo de 5 días los máximos se desplazan entre 1-4 nm a mayores  $\lambda$  y la señal disminuye, lo cual nos indica que los experimentos han de realizarse con disoluciones recién preparadas.

Las nanopartículas se agregan, y a efectos prácticos es como si aumentara el diámetro de éstas.

*Tabla 4.1.1 Variación de las Absorbancias en función del tiempo.*

Diámetro de AgNPs	$\lambda$ (nm) Día 1	Absorbancia Día 1	$\lambda$ (nm) Día 5	Absorbancia Día 5
10 nm	393,20	0,83	394,20	0,61
20nm	395,20	0,94	398,60	0,82
40nm	415,20	0,71	417,80	0,67
60nm	439,80	0,53	444,00	0,53

Además de realizar las medidas de los diferentes patrones, se midieron cada una de las muestras de interés obteniendo diferentes espectros. A partir de estos, y en comparación con los espectros de los AgNPs patrones, puede estimarse de forma aproximada el diámetro de las AgNPs que contienen las muestras comerciales.

El siguiente estudio consistió en correlacionar diámetros de AgNPs y  $\lambda$  correspondientes a los máximos de absorción. En la recta representada en la figura 4.1.3. se interpolarán los valores de las máximas longitudes de ondas para cada una de las muestras, y así se estimará el diámetro de las AgNPs de forma aproximada.

Figura 4.1.3. Recta de calibrado para aproximar el diámetro de las AgNPs de las muestras.

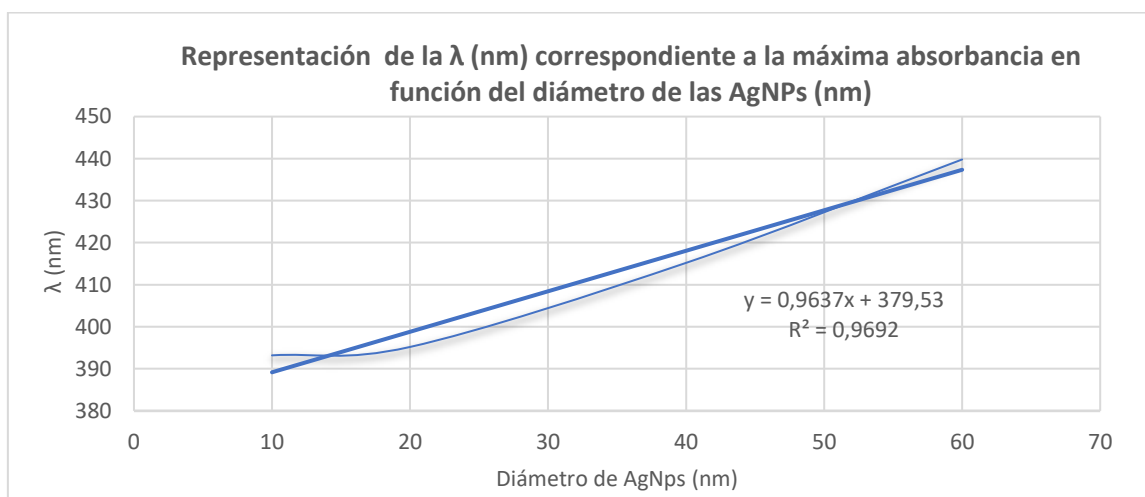
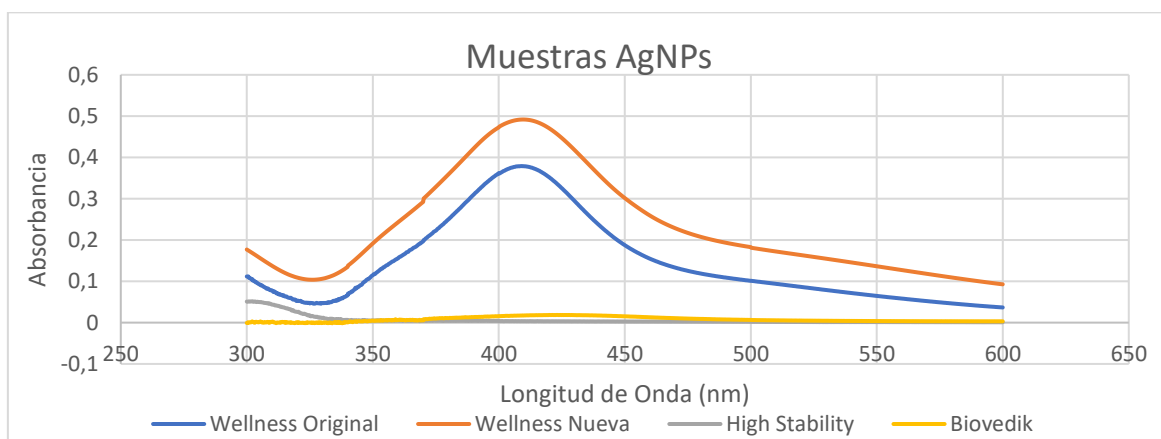


Figura 4.1.4. Espectros de absorción de las diferentes muestras de AgNPs para una concentración de 5 mg/L.



Por interpolación de los valores máximos de longitud de onda en la recta de calibrado obtenida anteriormente, se obtiene el diámetro aproximado.

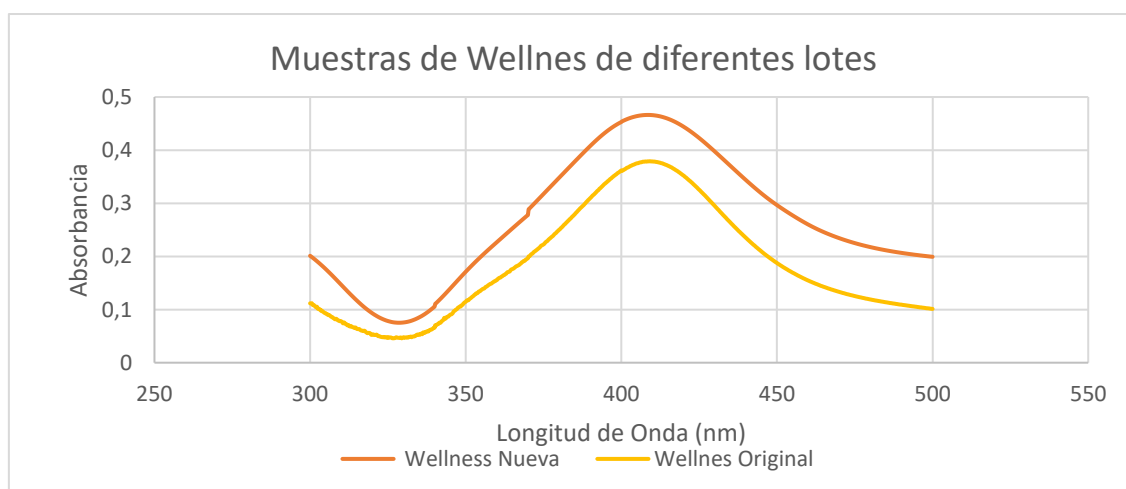
Tabla 4.1.2. Diámetros aproximados de las AgNPs por comparación con patrones de AgNPs.

Muestra	$\lambda$ (nm)	Máx. Absorbancia	Diaméto (nm) de las AgNPs
Wellness Original	409,80	0,38	31,41
Wellness Nueva	409,60	0,49	31,20
Biovedik	427,80	0,02	50,09

Mediante estas aproximaciones se pudo determinar los radios de las NPs presentes en las diferentes muestras. En el caso de la muestra Wellness su diámetro está en torno a 30 nm, y para la muestra de Biovedik sobre 50 nm. Para el caso de la muestra High Stability no se pudo determinar el diámetro de sus AgNPs.

Puesto que de la muestra de Wellness se tenía dos ejemplares diferentes, se decidió compararlas.

Figura 4.1.5 Comparación de dos muestras comerciales de Wellness.



Con la muestra de Wellness Original con la que se empezó a desarrollar el trabajo, no se ha podido ver cómo es la estabilidad de las AgNPs puesto que la muestra se terminó. Sin embargo, sí que se hace una comparación de AgNPs con el nuevo lote de muestra Wellnes, que nos permite obtener diferentes conclusiones.

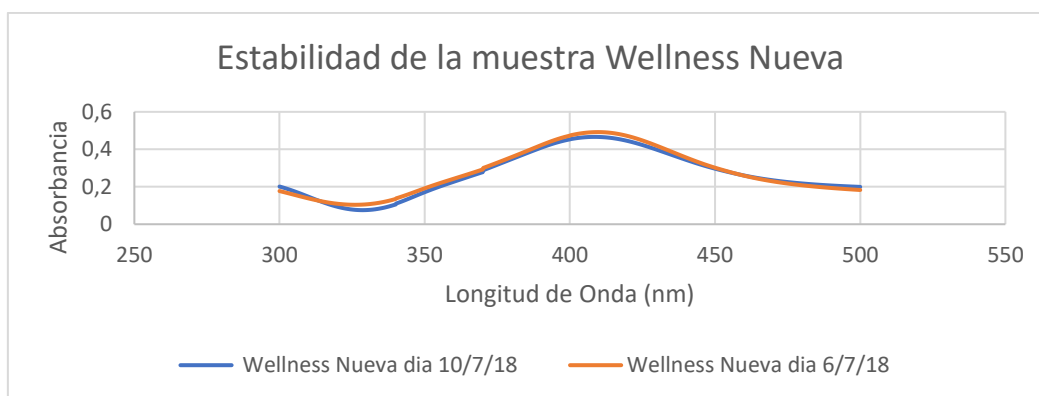
Por un lado, se observa que los máximos de absorbancia en ambos casos corresponden a la misma longitud de onda y por ello deducimos que el tipo de AgNPs de ambos lotes, es el mismo. La diferencia entre los espectros de ambas son los valores de absorbancia. Como era de esperar, los valores de la Wellness Nueva son mayores que los de la Wellness Original ya que esta última muestra tenía más tiempo cuando se realizó su espectro. La

pérdida de absorbancia se debe a el envejecimiento de las nanopartículas de la Muestra Original.

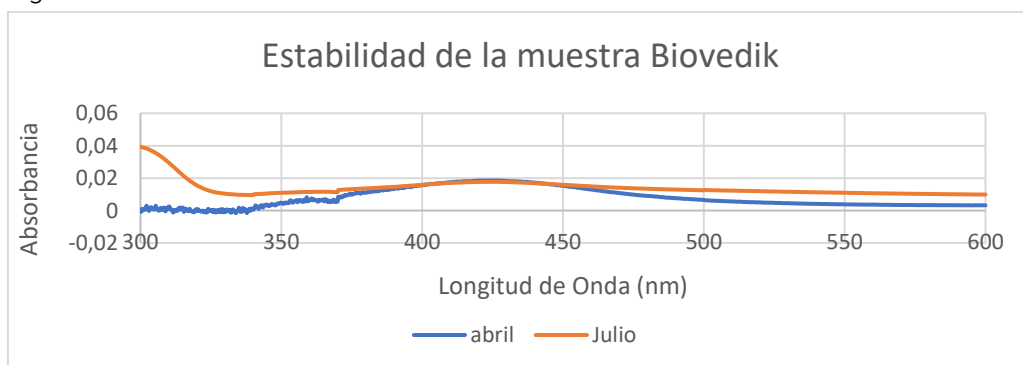
También hemos estudiado la estabilidad de las AgNPs de un miso tipo y lote a lo largo del tiempo.

Para el caso de la muestra Wellness de Nuevo lote realizamos el estudio viendo que era muy estable pasados 4 días.

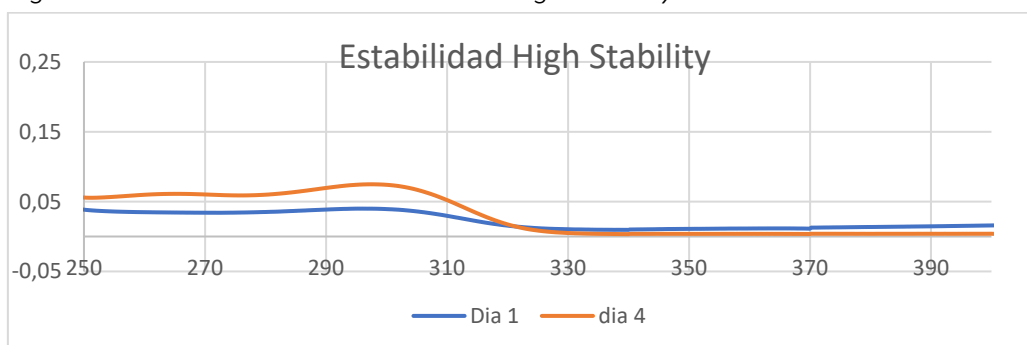
*Figura 4.1.6. Estabilidad de la muestra Wellness Nueva medida en un intervalo de cuatro días.*



*Figura 4.1.7. Estabilidad de la muestra de Biovedik en un intervalo de varios meses.*



*Figura 4.1.8. Estabilidad de la muestra High Stability en un intervalo de cuatro días.*



## 4.2 Determinación de los contenidos totales de Ag de las muestras comerciales por espectroscopia de absorción atómica (FAAS).

Como se comentó previamente en el apartado de metodología la determinación de contenidos totales se llevo a cabo tanto por el método de calibración externa como el de calibración interna. Una vez obtenidos los contenidos totales por ambos métodos, se realizó un estudio estadístico, en el cual se observó que para ambos métodos los contenidos totales eran prácticamente iguales.

Para todas las muestras los parámetros que se comparan de ambos métodos son sus pendientes, y las incertidumbres de éstas. El dato que nos interesa para saber si el contenido total se puede considerar igual, determinándolo por un método u otro, es la probabilidad t asumiendo varianzas comparables de dos colas. Cuando el valor dado por este sea mayor a un 15% consideraremos los dos métodos distintos.

*Tabla 4.2.1. Comparación de calibración directa y adición estándar para la muestra de High Stability de concentración 10 mg/L.*

Comparación High Stability		
	Valor 1	Valor 2
Magnitud	1,75E-02	2,63E-02
Incertidumbre	7,15E-04	4,71E-03
Grados de libertad	4,00E+00	3,00E+00
Parámetro z o t	1,85	
	<b>1 cola</b>	<b>2 colas</b>
probabilidad asumiendo z	3,20%	6,40%
probabilidad t asumiendo varianzas comparables	5,32%	<b>10,64%</b>
asumiendo varianzas no comparables	8,05%	16,11%

Tabla 4.2.2. Comparación de calibración directa y adición estándar para la muestra de Biovedik concentración 25 mg/L.

Comparación BiovediK		
	Valor 1	Valor 2
Magnitud	1,75E-02	2,46E-02
Incertidumbre	7,15E-04	4,23E-03
Grados de libertad	4,00E+00	3,00E+00
Parámetro z o t	1,67	
	1 cola	2 colas
probabilidad asumiendo z	4,74%	9,48%
probabilidad t asumiendo varianzas comparables	6,94%	<b>13,87%</b>
asumiendo varianzas no comparables	9,67%	19,34%

Tabla 4.2.3. Comparación de calibración directa y adición estándar para la muestra de Wellness concentración 30 mg/L.

Comparación Wellness		
	Valor 1	Valor 2
Magnitud	1,75E-02	1,22E-01
Incertidumbre	7,15E-04	2,47E-02
Grados de libertad	4,00E+00	3,00E+00
Parámetro z o t	4,25	
	1 cola	2 colas
probabilidad asumiendo z	0,00%	0,00%
probabilidad t asumiendo varianzas comparables	0,19%	<b>0,38%</b>
asumiendo varianzas no comparables	1,19%	2,39%

Puesto que, para los tres casos, ambos métodos no presentan diferencias significativas, se decidió optar por el método de calibración externa por ser más rápido, suponer un ahorro de reactivos, y evitar los efectos matriz propios de la calibración interna. No obstante, en los [Anexos en Punto 7](#) se encuentra la determinación de contenidos totales por el método de adición estándar.

Para la determinación de contenido total de Ag(I) se realizó un estudio en el cual se veía el efecto de oxidación del HNO<sub>3</sub> en diferentes proporciones y tiempos de ataque. Esto se hizo con el objetivo de encontrar la manera óptima para llevar a cabo la digestión en las muestras. El estudio se realizó con la muestra comercial Wellness.

Se atacaron 3 alícuotas de la muestra Wellness Original en diferentes condiciones.

*Tabla 4.2.4 Digestión ácida para una misma muestra en diferentes condiciones.*

<b>Muestra y condiciones</b>	<b>Concentración mg/L</b>	<b>DSR %</b>
Wellness 30 ppm 0,5:1 1h	27,68	32,4
Wellness 30 ppm 0,5: 1 2h	31,2	30,2
Wellness 30 ppm 0,5:0,5 2h	28,44	30,57

Como podemos observar, no influye mucho el hecho de estar agitando dos horas, por lo que, por comodidad, el ataque de HNO<sub>3</sub> se decidió llevar a cabo durante una hora y con una cantidad correspondiente al doble de la muestra.

Para la determinación del contenido total del Ag(I) mediante FAAS, es necesario preparar una recta de calibrado. En ellas se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras comerciales y se obtuvo el valor de contenido total de Ag(I) al multiplicar por la dilución correspondiente a cada muestra. Para la muestra “Wellness Nueva” se preparó otra recta de calibrado procediendo de la misma manera. En los [Anexos Punto 5. Tabla 5.1 y Tabla 5.2](#) se muestra la preparación de las rectas de calibrado para muestras originales y nuevas respectivamente, y sus [Figuras 5.1 y 5.2](#) correspondientes en las que se interpolan las muestras.

*Tabla 4.2.5. Contenidos totales de Ag(I) en mg/L tras la digestión ácida para muestras comerciales.*

<b>Muestra</b>	<b>Concentración Real mg/L</b>	<b>Concentración obtenida mg/L</b>	<b>DSR</b>
High Stability	10	9,91	9,15
Biovedik	25	20,06	4,73
Wellness Original	30	32,29	6,97
Wellness Nueva	30	29,35	0,58

En esta tabla se muestra el resultado de concentración obtenida con su DSR obtenida a partir del dato de So proporcionado por una plantilla estadística. Adicionalmente en los [Anexos en el Punto 8](#) se muestra un estudio estadístico sobre la precisión del método.

### 4.3 Determinación del contenido de AgNPs: aplicación de la ultrafiltración.

Tras realizar la ultrafiltración se determinaron los contenidos de Ag(I) resultantes y que quedaban en las disoluciones filtradas correspondientes a cada muestra comercial mediante FAAS. Para ello se prepararon *rectas de calibración externa*, como se indica en los [Anexos Punto 6 Tabla 6.1 y 6.2](#) en las cuales se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras obtenidos en FAAS. Se prepararon dos rectas de calibrado, una para las muestras compradas originalmente, y otra para la muestra de Wellness Nueva y los patrones de referencia.

Figura 4.3.1 Recta de calibrado para la determinación del contenido de Ag(I) tras la ultrafiltración de todas las muestras originales.

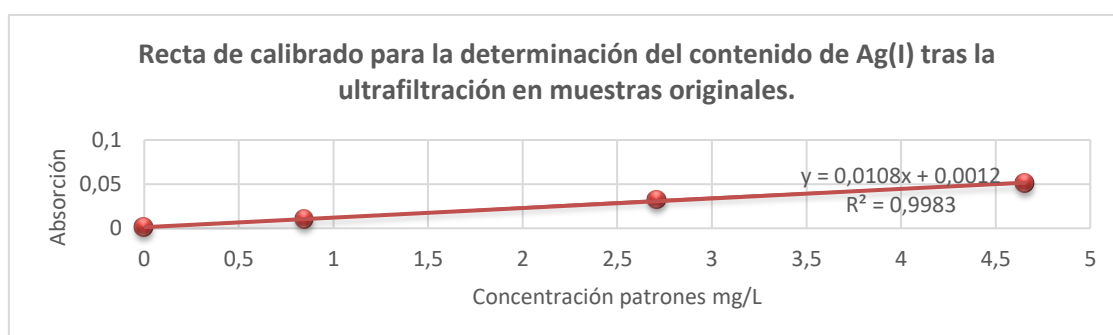


Tabla 4.3.1. Concentraciones de Ag(I) en la disolución filtrada obtenidas tras la ultrafiltración para las Muestras Originales.

Muestra	Concentración mg/L	DSR
Blanco (solo agua destilada)	-0,26	-349,46
Patrón de 4,60 mg/L	4,44	20,20
Patrón de 22,55 mg/L	19,11	5,28
Patrón de 22,55 mg/L	21,65	4,44
High Stability (10mg/L)	9,61	7,07
High Stability (10 mg/L)	9,52	6,52
Biovedik (25 mg/L)	18,46	5,28
Biovedik (25mg/L)	18,79	5,28
Wellness Original (30 mg/L)	0,81	138,47
Wellness Original (30mg/L)	1,90	57,13

Figura 4.3.2 Recta de calibrado para la determinación del contenido de Ag(I) tras la ultrafiltración de todas las muestras Nuevas.

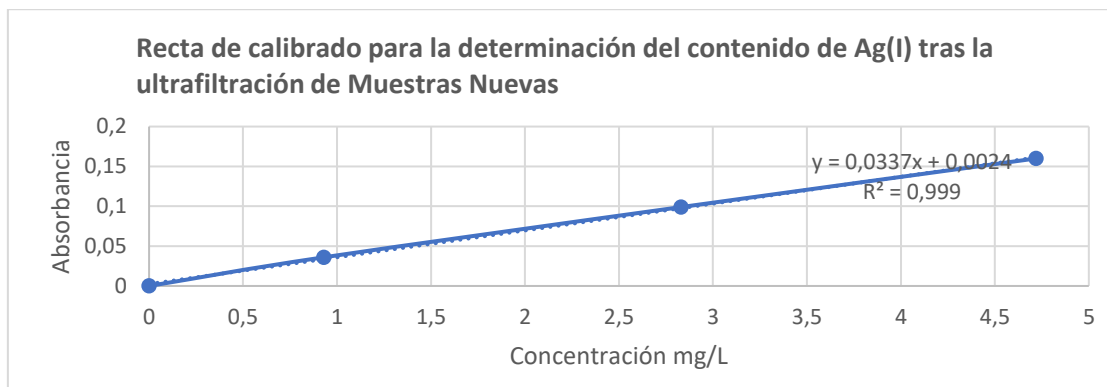


Tabla.4.3.2 Concentraciones de Ag(I) obtenidas tras la ultrafiltración para la muestra de Wellnes Nueva y un patrón de referencia.

Muestra	Concentración mg/L	DSR
Blanco (solo agua destilada)	-0,16	-391,46
Patrón de 22,55 mg/L	20,67	3,13
Wellness Nueva	0,92	85,53
Wellness Nueva	0,54	144,67

Además de las muestras, se sometió al mismo proceso de UF a una disolución de Ag iónica Ag(I) de 22.5 mg/L. Se midió la señal obtenida tras someter al patrón de Ag (I) al tratamiento de UF para comprobar que el método de análisis era adecuado. Se obtuvo el % de recuperación y salió una recuperación del 92%, es decir una recuperación alta.

Las tablas 4.3.1. y 4.3.2 muestran los resultados de concentración de plata iónica en el sobrenadante tras la Ultrafiltración. La DSR es la calculada a partir de la S proporcionada por la plantilla estadística. Esta DSR proporciona el valor de la desviación de preparación de la muestra junto con la de la calibración. Además, se calculó la DSR del método puesto que se hicieron dos réplicas de cada muestra.

Tabla 4.3.4. Concentraciones de Ag(I) en las muestras tras la ultrafiltración con la DSR de método.

Muestra	Concentración en mg/L de Ag(I) tras la ultrafiltración	DSR del método
High Stability	9,57	4,08E+00
Biovedik	18,63	4,78E-15
Wellness Original	1,36	4,26E+03
Wellness Nueva	0,73	5,73E+03

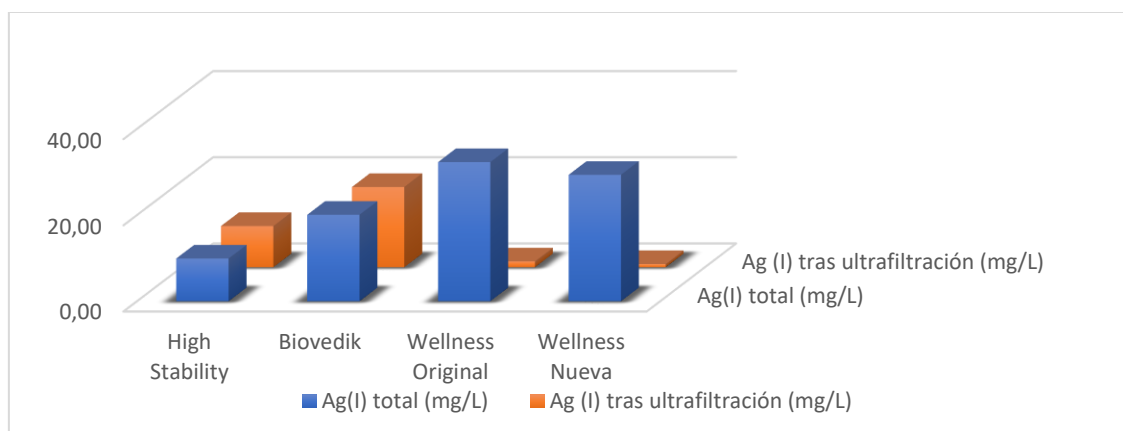
Al aplicar la Ultrafiltración, en el sobrenadante que atraviesa el filtro permanece la plata iónica; en el filtro queda toda la plata en forma de AgNP. Sabiendo la cantidad de plata total obtenida mediante ataque ácido y la plata iónica, podemos hacernos una idea de la cantidad AgNPs que hay originalmente en las muestras.

Tabla.4.3.5. Contenido de Ag(I) en las muestras comerciales.

Muestra	Ag(I) total (mg/L)	Ag (I) tras ultrafiltración (mg/L)
High Stability	9,91	9,57
Biovedik	20,06	18,63
Wellness Original	32,29	1,36
Wellness Nueva	29,35	0,73

Se puede observar que solo en el caso de la muestra Wellness el contenido original de plata corresponde a la plata en forma de AgNPs. En los otros dos casos prácticamente toda la plata es plata iónica.

Figura 4.3.3. Comparación del contenido de Ag(I) por diferentes métodos.



#### 4.4 Comparación del Contenido de las muestras por diferentes métodos de calibración.

Tabla 4.4.1 Comparación del contenido total de Ag(I) proporcionado por distintos métodos.

Muestra	Contenido total de Ag		
	Contenido total de Ag (I) calibración externa (mg/L)	(I) calibración interna (mg/L)	Contenido total de Ag (I) tras ultrafiltración (mg/L)
High Stability (mg/L)	9,91	11,65	9,57
Biovedik (25mg/L)	20,06	20,07	18,63
Wellness Original (30mg/L)	32,29	29,29	1,36
Wellness Nueva (30 mg/L)	29,35	28,78	0,73

La Tabla es un resumen de los resultados obtenidos para cada una de las muestras.

## 5. Conclusiones

- Se ha estudiado la estabilidad de muestras patrones y problemas que contienen NPs de plata que absorben luz Uv-Visible, encontrando que al cabo de cinco días las señales varían, se produce el desplazamiento de longitudes de onda. Las muestras deben ser analizadas recién preparadas para que su estabilidad sea la adecuada.
- Se han estimado de forma aproximada los tamaños de las AgNPs presentes en tres muestras comerciales de suplementos alimentarios. Los diámetros de las AgNPs varían entre 30 y 50 nm.
- Se han determinado los contenidos totales de plata en tres muestras reales, obteniendo valores aproximados a los fijados por los fabricantes.
- Se han comparado distintas formas de calibrar para realizar las determinaciones no encontrando diferencias significativas entre la calibración directa y externa.
- Se ha aplicado la ultrafiltración para separar plata iónica de AgNPs en tres muestras problema encontrando que en sólo una de ellas la mayoría de la plata se encuentra en forma de nanopartícula.

## 6. Bibliografía

- (1) Comunidades, D. E. L. A. S.; Bruselas, E.; Comisi, D. E. L. A.; Consejo, A. L.; Parlamento, A. L.; La, E.; Informe, U. E. Es Es. **2004**.
- (2) Jos, A.; Pichardo, S.; Puerto, M.; Sánchez, E.; Grilo, A.; Cameán, A. M. Cytotoxicity of Carboxylic Acid Functionalized Single Wall Carbon Nanotubes on the Human Intestinal Cell Line Caco-2. *Toxicol. Vitro*. **2009**, *23* (8), 1491–1496.
- (3) Maurer-Jones, M. A.; Lin, Y.-S.; Haynes, C. L. Functional Assessment of Metal Oxide Nanoparticle Toxicity in Immune Cells. *ACS Nano* **2010**, *4* (6), 3363–3373.
- (4) Scrinis, G.; Lyons, K. The Emerging Nano-Corporate Paradigm: Nanotechnology and the Transformation of Nature, Food and Agri-Food Systems. *Int. J. Sociol. Food Agric.* **2007**, *15* (December), 22–44.
- (5) Acharya, D.; Mohanta, B.; Pandey, P.; Nasiri, F. Antibacterial Properties of Synthesized Ag and Ag @ SiO<sub>2</sub> Core-Shell Nanoparticles : A Comparative Study. 1–13.
- (6) Rodríguez-Santana, P.; Jiménez-Abizanda, A. I.; Hernández-Creus, A.; Jiménez-Moreno, F. Synthesis and Physical Characterization of Ag Nanoparticles and Their Interaction with Fe. *J. Lumin.* **2017**, *190* (May), 207–214.
- (7) Belluco, S.; Losasso, C.; Patuzzi, I.; Rigo, L.; Conficoni, D.; Gallocchio, F.; Cibir, V.; Catellani, P.; Segato, S.; Ricci, A. Silver as Antibacterial toward *Listeria Monocytogenes*. *Front. Microbiol.* **2016**, *7* (MAR), 1–9.
- (8) Khandel, P.; Shahi, S. K.; Kanwar, L.; Yadaw, R. K. Biochemical Profiling of Microbes Inhibiting Silver Nanoparticles Using Symbiotic Organisms. **2018**, *9* (3), 273–285.
- (9) Pandit, R.; Rai, M.; Santos, C. A. Enhanced Antimicrobial Activity of the Food-Protecting Nisin Peptide by Bioconjugation with Silver Nanoparticles. *Environ. Chem. Lett.* **2017**, *15* (3), 443–452.
- (10) T., F.; A., W. Nanosilver and Global Public Health: International Regulatory Issues. *Nanomedicine* **2010**, *5* (4), 617–632.
- (11) Annu; Ahmed, S.; Kaur, G.; Sharma, P.; Singh, S.; Ikram, S. Fruit Waste (Peel) as Bio-Reductant to Synthesize Silver Nanoparticles with Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities. *J. Appl. Biomed.* **2018**, *16* (3), 221–231.
- (12) Pal, S.; Tak, Y. K.; Song, J. M. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia Coli*. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290* (42), 1712–1720.

- (13) Morones, J. R.; Elechiguerra, J. L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J. B.; Ramírez, J. T.; Yacaman, M. J. The Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles. *Nanotechnology* **2005**, *16* (10), 2346–2353.
- (14) Kulak, E.; Ognik, K.; Stępniewska, A.; Drazbo, A. Effect of Nanoparticles Silver on Redox Status and Accumulation Ag in Tissues Chicken. *J. Sci. Food Agric.* **2018**.
- (15) Amooaghaie, R.; Tabatabaei, F.; Ahadi, A. Alterations in HO-1 Expression, Heme Oxygenase Activity and Endogenous NO Homeostasis Modulate Antioxidant Responses of Brassica Nigra against Nano Silver Toxicity. *J. Plant Physiol.* **2018**, *228*, 75–84.
- (16) de la Calle, I.; Menta, M.; Klein, M.; Séby, F. Study of the Presence of Micro- and Nanoparticles in Drinks and Foods by Multiple Analytical Techniques. *Food Chem.* **2018**, *266*, 133–145.
- (17) Alpdogan, G. ; Zor, S.D.; Peksel, A. Analysis of Some Trace Metals in Milk Samples by FAAS After Preconcentration by Aspergillus niger Loaded on TiO<sub>2</sub> Nanoparticles. *CURRENT ANALYTICAL CHEMISTRY*.**2016**, *12*,642-650.
- (18) Wei, W.; Zhao, B.; He, M.; Chen, B.; Hu, B. Iminodiacetic Acid Functionalized Magnetic Nanoparticles for Speciation of Cr(III) and Cr(VI) Followed by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry Detection. *RSC Adv.* **2017**, *7* (14), 8504–8511.
- (19) Bolea, E.; Gorriz, M. P.; Bouby, M.; Laborda, F.; Castillo, J. R.; Geckeis, H. Multielement Characterization of Metal-Humic Substances Complexation by Size Exclusion Chromatography, Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation, Ultrafiltration and Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry Detection: A Comparative Approach. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1129* (2), 236–246.
- (20) Contado, C.; Argazzi, R.; Amendola, V. Sedimentation Field Flow Fractionation and Optical Absorption Spectroscopy for a Quantitative Size Characterization of Silver Nanoparticles. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1471*, 178–185.
- (21) Contado, C.; Pagnoni, A. TiO<sub>2</sub> in Commercial Sunscreen Lotion: Flow Field-Flow Fractionation and ICP-AES Together for Size Analysis. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (19), 7594–7608.
- (22) Dong, L.; Zhou, X.; Hu, L.; Yin, Y.; Liu, J. Simultaneous Size Characterization and Mass Quantification of the in Vivo Core-Biocrystalline Structure and Dissolved Species of Silver Nanoparticles. *J. Environ. Sci. (China)* **2017**, 1–9.
- (23) Cabrera, J.; Santiago, J.; López, A. Síntesis de Nanopartículas de Plata En Matrices Poliméricas Mediante Radiación Gamma. *Rev. Peru. Ing. Química* **2008**, *11* (1), 16–20.
- (24) Liang, A.; Liu, Q.; Wen, G.; Jiang, Z. The Surface-Plasmon-Resonance Effect of Nanogold/Silver and Its Analytical Applications. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2012**, *37*, 32–47

## Anexos

### 0.Preparación de patrones de Ag a partir del patrón de 954 mg/L.

Tabla 0.1. Preparación de patrón de Ag (I) aproximadamente de 100 ppm.

Patrón de Plata de 100 ppm aprox.		
g de Ag (I) de 954 mg/L	g H <sub>2</sub> O	Concentración mg/L
0,9923	10,1183	93,56

Tabla 0.2. Preparación de patrones de 25 y 30 mg/L para compararlos con las muestras comerciales en la ultrafiltración.

Patrón Teórico mg/L	Patrón de Ag 93,56±3 mg/L	g H <sub>2</sub> O	g totales	Concentración mg/L
25	1,25	3,95	5,21	22,55
5	0,50	9,73	10,23	4,60

### 1.Preparación de muestras para la determinación de contenidos totales mediante el método de calibración externa

Tabla 1.1. Preparación de muestras según el método de calibración externa.

Muestra	g de Muestra	g de HNO <sub>3</sub> concentrado	g de H <sub>2</sub> O	g totales
HS	0,50	0,60	4,30	5,40
Biovedik	0,20	0,48	4,55	5,24
Wellness Original	0,22	0,32	4,63	5,18
Wellness Nueva	0,49	0,39	4,32	5,21

## 2. Preparación de las rectas de calibración interna y las muestras en el método de adición estándar.

Tabla 2.1. Preparación de la calibración interna para la determinación del contenido total de la muestra High Stability (10 mg/L).

High Stability				
g de Muestra	g de HNO <sub>3</sub>	g H <sub>2</sub> O	g Ag añadida patrón	g totales
0,61	0,69	4,15	0	5,45
0,6	0,66	4,23	0,03	5,52
0,6	0,71	3,98	0,06	5,34
0,61	0,73	4,05	0,12	5,52
0,61	0,64	4,01	0,15	5,41

Tabla 2.2. Preparación de la calibración interna para la determinación del contenido total de la muestra Biovedik (25mg/L).

Biovedik				
g de Muestra	g de HNO <sub>3</sub>	g H <sub>2</sub> O	g Ag añadida patrón	g totales
0,3	0,36	4,64	0	5,31
0,3	0,21	4,85	0,03	5,39
0,3	0,35	4,71	0,05	5,42
0,3	0,21	4,66	0,13	5,3
0,3	0,26	4,72	0,15	5,43

Tabla 2.3. Preparación de la calibración interna para la determinación del contenido total de la muestra Wellness Original (30 mg/L).

Wellness Original				
g de Muestra	g de HNO <sub>3</sub>	g H <sub>2</sub> O	g Ag añadida patrón	g totales
0,30	0,30	4,60	0,00	5,21
0,30	0,31	4,60	0,04	5,24
0,30	0,30	4,67	0,11	5,38
0,30	0,30	4,84	0,05	5,50
0,30	0,29	4,64	0,16	5,39

Tabla 2.4. Preparación de la calibración interna para la determinación del contenido total de la muestra Wellness Nueva (30 mg/L).

Wellness Nueva				
g de Muestra	g de HNO <sub>3</sub>	g H <sub>2</sub> O	g Ag añadida patrón	g totales
0,30	0,35	4,60	0,00	5,25
0,30	0,39	4,60	0,03	5,33
0,30	0,30	4,70	0,05	5,35
0,30	0,23	4,85	0,10	5,48
0,30	0,23	4,70	0,15	5,38

### 3. Preparación de recta de calibrado para la determinación de los contenidos totales.

Tabla 3.1. Preparación de la recta de calibrado para la determinación de contenidos totales de las muestras comerciales.

Patrón Teórico mg/L	g Patrón de Ag(I) 93.56±3 mg/L	g totales de disolución con H <sub>2</sub> O	g HNO <sub>3</sub>	Concentración real del patrón en mg/L
0	0	10,25	2,15	0
1	0,11	10,37	2,11	0,95
2	0,2	10,44	2,26	1,83
3	0,3	10,26	2,29	2,77
4	0,4	10,18	2,47	3,7
5	0,5	10,35	2,68	4,52

\*Esta es la preparación de la recta de calibración externa para las muestras (excepto la muestra Wellness Nueva, que cuyo contenido total se determinó posteriormente y le pertenece a esta otra recta de calibrado diferente, pero se prepara de la misma manera).

#### 4.Preparación de las muestras comerciales y de patrones de concentración conocida tras la ultrafiltración para la determinación del contenido de Ag(I) mediante FAAS.

Tabla 4.1. **Experimento 1** de UF para las muestras originales. Preparación de muestras originales y patrones para determinar su contenido en Ag (I) en FAAS.

Muestra	g Muestra	g totales con HNO <sub>3</sub> al 1%
Blanco	0,50	5,10
Patrón 4.60 mg/L	0,50	5,35
Patrón 22.5 mg/L	0,49	6,30
Patrón 22.5 mg/L	0,49	6,14
High Stability 10 mg/L	0,55	5,23
High Stability " 10 mg/L	0,67	5,24
Biovedik 25 mg/L	0,50	6,21
Biovedik " 25 mg/L	0,50	6,29
Wellness Original 30 mg/L	0,48	6,16
Wellness Original " 30 mg/L	0,50	6,20

Tabla 4.2. **Experimento 2** UF para la muestra Wellness Nueva. Preparación de muestras Nuevas y patrones para determinar su contenido en Ag (I) en FAAS.

Muestra	g Muestra	g totales con HNO <sub>3</sub> al 1%
Blanco (solo agua destilada)	0,50	5,10
Patrón de 22,55 mg/L	0,50	5,97
Wellness Nueva	0,49	6,29
Wellness Nueva	0,49	6,22

#### 5. Preparación de las rectas de calibrado para la determinación del contenido total del Ag(I) en muestras comerciales.

Tabla 5.1. Preparación de patrones de concentración conocida para la recta de calibrado (Muestras Originales)

Patrón Teórico mg/L	g Patrón de Ag(I) 93.56±3 mg/L	g totales de disolución con H2O	g HNO3 al 5%	Concentración real del patrón en mg/L
0	0	10,25	2,15	0
1	0,11	10,37	2,11	0,95
2	0,2	10,44	2,26	1,83
3	0,3	10,26	2,29	2,77
4	0,4	10,18	2,47	3,7
5	0,5	10,35	2,68	4,52

Figura 5.1. Recta de calibrado para la determinación de contenidos totales.

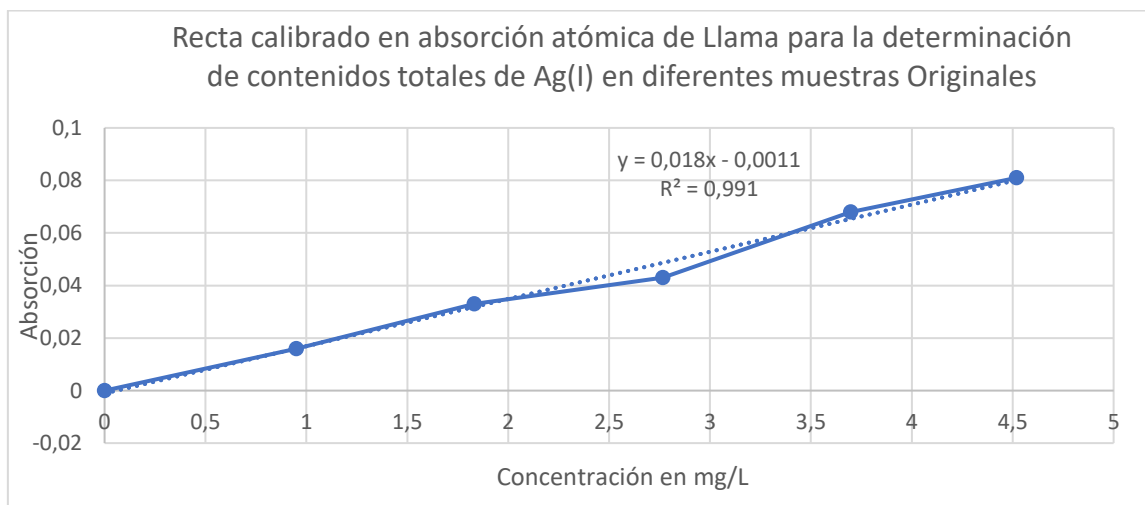
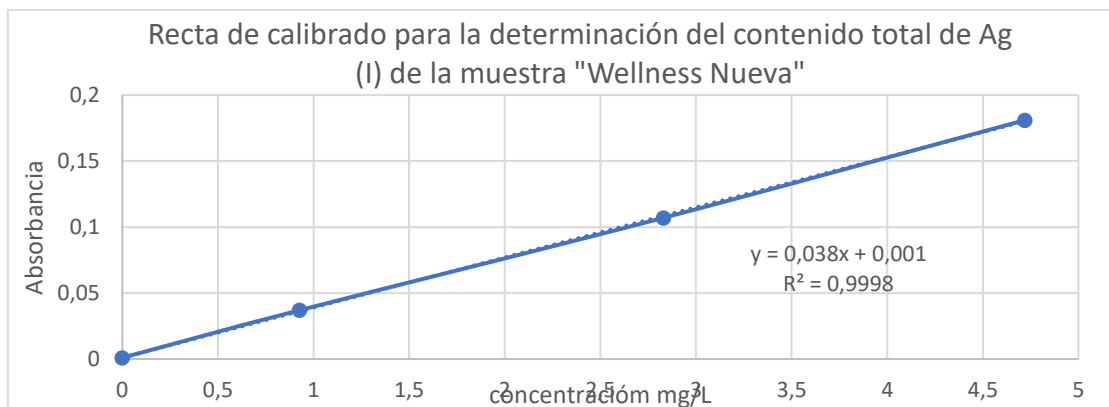


Tabla 5.2. Preparación de patrones de concentración conocida para la recta de calibrado (Muestra Nueva)

Patrón mg/L	g de patrón de Ag 93,56±3	g HNO3 al 5%	g totales de disolución con H2O	Concentración en mg/L
0	0,00	2,11	10,20	0,00
1	0,10	2,15	10,42	0,93
3	0,31	2,30	10,15	2,83
5	0,52	2,51	10,27	4,72

Figura 5.2 Recta de calibrado para la determinación del contenido total de la muestra.



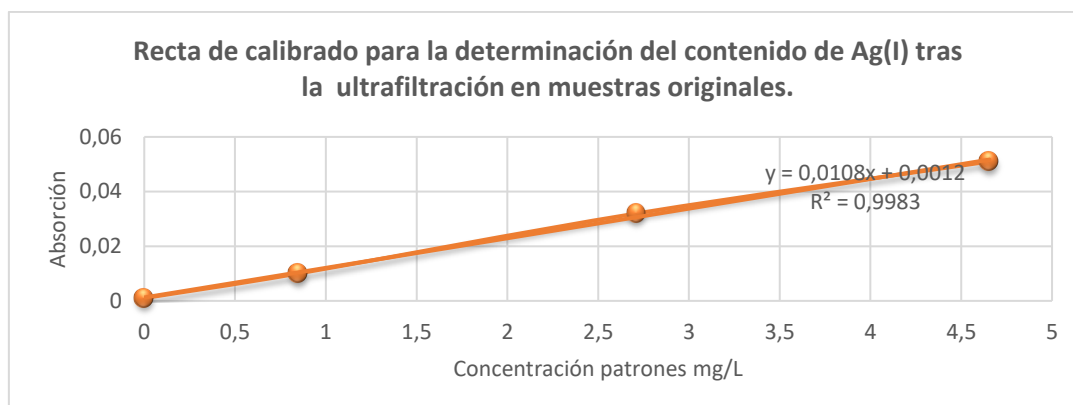
## 6. Ultrafiltración: Rectas de calibrado.

Se preparó una recta de calibrado para poder interpolar las muestras una vez estas habían sido ultrafiltradas.

Tabla 6.1. Preparación de los puntos de la recta de calibrado para la ultrafiltración de las muestras originales.

Patrones a preparar en mg/L	g Patrón de Ag(I) 93.56±3 mg/L	g HNO <sub>3</sub> al 5%	g totales de disolución con H <sub>2</sub> O	Concentración en mg/L
0	0,00	2,16	10,30	0,00
1	0,09	2,13	10,41	0,85
3	0,30	2,33	10,31	2,71
5	0,50	2,50	10,01	4,66

Figura 6.1. Recta de calibrado para la determinación de contenidos totales mediante ultrafiltración.

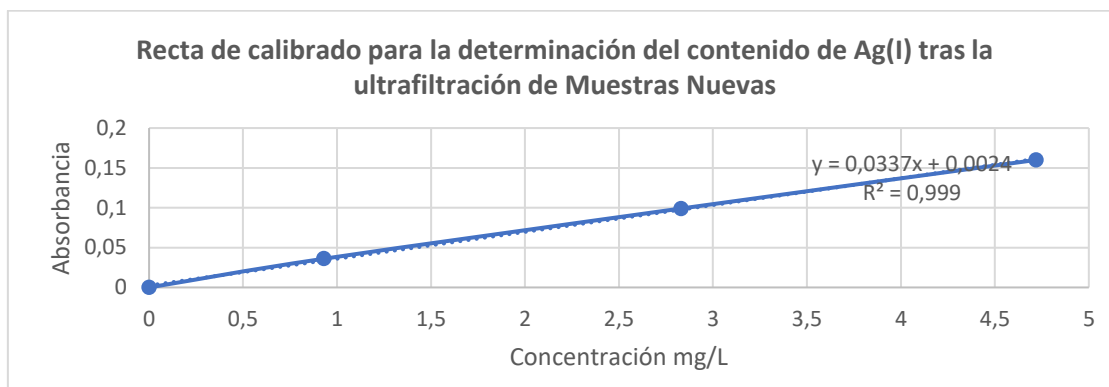


### Ultrafiltración Muestra Nueva de Wellness.

Tabla 6.2. Preparación de los puntos de la recta de calibrado para la ultrafiltración de las muestras Nuevas.

Patrón mg/L	g de patrón de Ag 93,56±3	g totales con HNO <sub>3</sub> 5%	g totales de disolución con H <sub>2</sub> O	Concentración en mg/L
0	0	2,11	10	0
1	0,1072	2,17	10,1484	0,93
3	0,3168	2,2	10,455	2,83
5	0,4935	2,18	10,2385	4,72

Figura 6.2. Recta de calibrado para la determinación de contenidos totales mediante ultrafiltración.



## 7. Determinación del contenido total de Ag (I) con digestión ácida por el método de adición estándar.

Tabla 7.1 Contenidos totales de Ag(I) tras digestión ácida por el método de adición estándar para diferentes muestras comerciales.

Muestra	Concentración Adición Éstandar mg/L	DSR %
High Stability (10 mg/L)	11,65	10,84
Biovedik (25 mg/L)	20,07	42,67
Wellness Original (30 mg/L)	29,29	4,23
Wellness Nueva (30 mg/L)	28,78	5,29

Estos contenidos totales se obtienen con las rectas de adición estándar que se muestran a continuación.

Figura7.1. Adición estándar de la muestra de High Stability correspondiente a 10 mg/L teóricos.

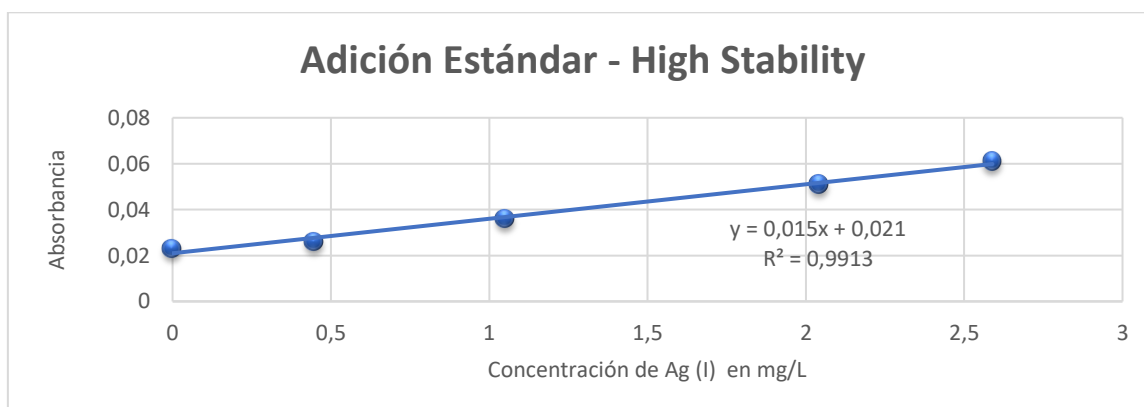


Figura 7.2. Recta de adición estándar de Biovedik correspondiente a 25 mg/L.

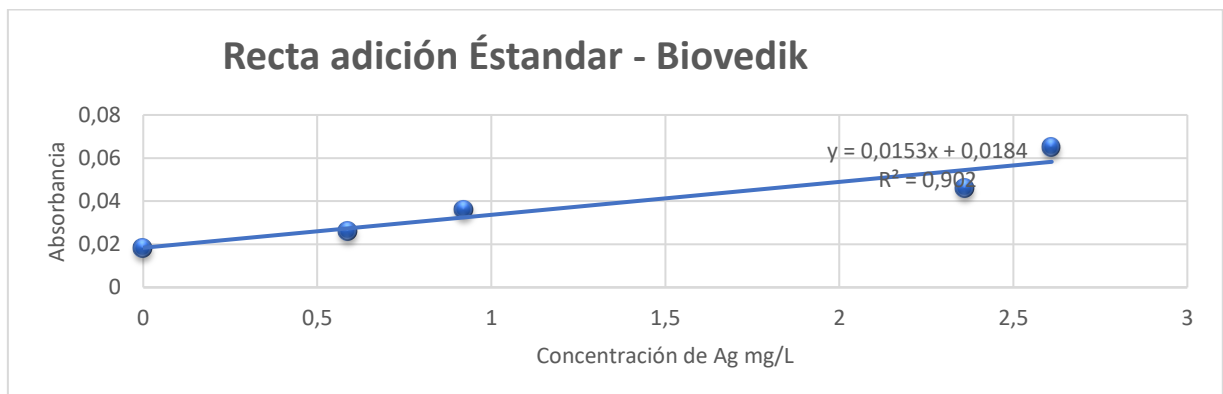


Figura 7.3. Recta de adición estándar de la muestra comercial Wellness correspondiente a 30 mg/L.

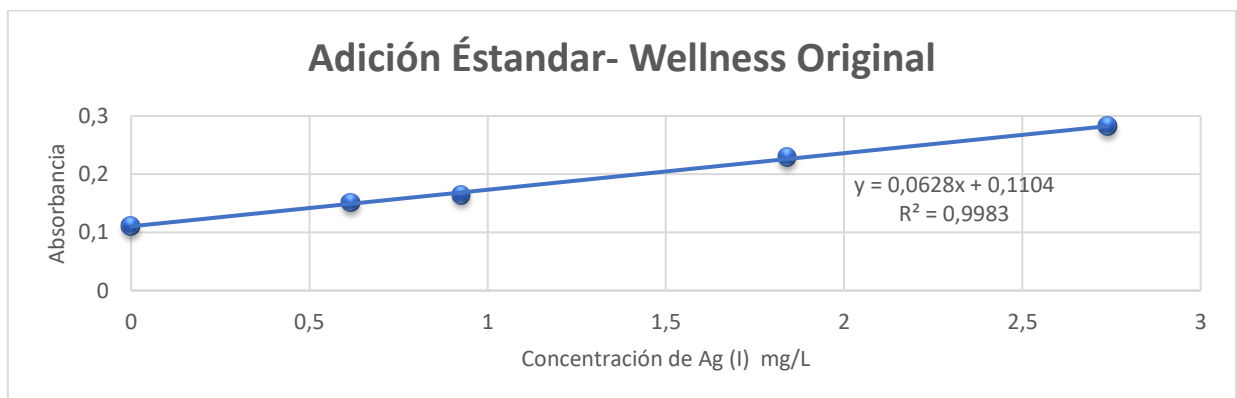
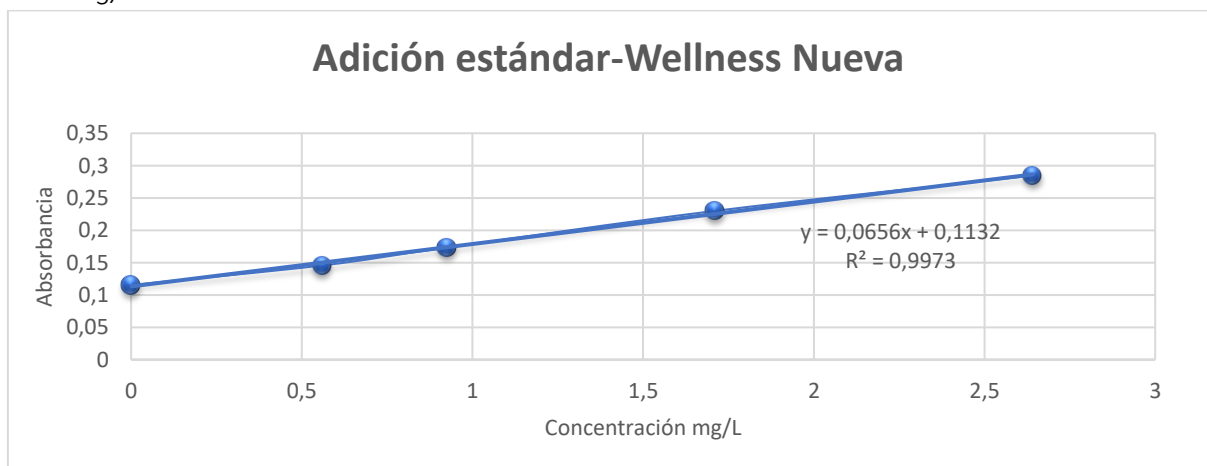


Figura 7.4. Recta de adición estándar de la muestra comercial Wellness correspondiente a 30 mg/L.



## 8. Estudio estadístico sobre la incertidumbre de los resultados obtenidos

Se ha realizado un estudio para obtener la incertidumbre del resultado y además, para determinar la contribución de las distintas etapas del método analítico a dicha incertidumbre. Se ha realizado con el método de calibración externo y la determinación del contenido total de plata en la muestra Wellness Nueva.

Cada etapa del proceso analítico realizado lleva asociada una fuente de incertidumbre. El esquema del proceso aplicado en este caso es el siguiente:

Muestra —► Ataque ácido —► Medida FAAS —► (recta de calibrado)  
—► concentración

La recta de calibrado son patrones acuosos en este caso y el proceso de ataque se ha realizado dos veces con dos muestras iniciales (ataque 1 y ataque 2)

Por tanto tenemos incertidumbre de:

1. Preparación de muestra (ataque oxidante). La llamo  $s_{\text{prep}}$
2. Medida instrumental. La llamo  $s_{\text{inst}}$
3. Incertidumbre de calibración. La llamo  $s_{\text{cal}}$

En este apartado se trata de obtener de forma aislada cada una de las incertidumbres. La imprecisión total sería la contribución de las tres fuentes de error. En términos de desviación estándar  $s_{\text{total}}$  la expresión es:

$$s_{\text{total}}^2 = s_{\text{prep}}^2 + s_{\text{inst}}^2 + s_{\text{cal}}^2$$

### a) Estimación de la incertidumbre de la preparación de la muestra

Para realizar este estudio se toman dos pesos diferentes de muestra inicial problema Wellness Nueva y se someten por separado al tratamiento ácido. En nuestro caso el número de réplicas es dos, el valor promedio es 29,37 y la  $s$  es 1,8E-02 mg/L. ( $s_{\text{prep}}$ )

### b) Estimación de la incertidumbre instrumental

La imprecisión instrumental se ha tomado mediante el valor del promedio y la desviación (datos estadísticos) que nos proporciona el instrumento para un patrón de concentración conocida. Se ha tomado el valor para el patrón de Ag de 5 ppm, que se ha medido tres veces y el instrumento nos da la estadística de esa medida. En este caso la  $s$  es ( $s_{\text{inst}}$ ) con un valor de 0,222 mg/L en unidades de absorbancia.

### c) Estimación de la incertidumbre de la calibración

El error asociado a la calibración al realizar un ajuste por mínimos cuadrados entre concentración y señal instrumental se puede determinar mediante expresiones establecidas en el libro y ecuación de Miller. La siguiente expresión nos da el valor de la imprecisión al determinar la concentración de un compuesto, y que lleva asociada la incertidumbre de la calibración y la instrumental.

$$S_0 = \frac{s_{M/C}}{S} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(M_{\text{obt}} - M_{\text{medio}})^2}{S^2 \sum (C_i - C_{\text{medio}})^2}}$$

Donde

- nº patrones, puntos (m)
- nº de réplicas de muestra (n)
- Sensibilidad (S)
- Distancia entre patrones ( $C_i - C_{\text{medio}}$ )
  - Distancia ente señal obtenida y centroide ( $M_{\text{obt}} - M_{\text{media}}$ )

Teniendo en cuenta todos los datos, la scal es 0.0792 mg/L