

Isabel Abad Álvaro

Desarrollo de una plataforma de métodos analíticos para el análisis de nanomateriales en sistemas medioambientales y biológicos

Departamento
Química Analítica

Director/es
Laborda García, Francisco
Bolea Morales, Eduardo

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA DE
MÉTODOS ANALÍTICOS PARA EL ANÁLISIS DE
NANOMATERIALES EN SISTEMAS
MEDIOAMBIENTALES Y BIOLÓGICOS

Autor

Isabel Abad Álvaro

Director/es

Laborda García, Francisco
Bolea Morales, Eduardo

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Química Analítica

2017

**INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN EN
CIENCIAS AMBIENTALES DE ARAGÓN
GRUPO DE ESPECTROSCOPIA ANALÍTICA Y SENSORES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

**DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA
DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA EL
ANÁLISIS DE NANOMATERIALES EN
SISTEMAS MEDIOAMBIENTALES Y
BIOLÓGICOS**



**ISABEL ABAD ÁLVARO
TESIS DOCTORAL 2017**

D. Francisco Laborda García, Catedrático de la Universidad de Zaragoza y D. Eduardo Bolea Morales, Profesor Titular de la Universidad de Zaragoza, del Departamento de Química Analítica

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria:

“DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA EL ANÁLISIS DE NANOMATERIALES EN SISTEMAS MEDIOAMBIENTALES Y BIOLÓGICOS”,

correspondiente al Proyecto de Tesis aprobado por el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza en fecha 26 de mayo de 2014, ha sido realizada por Dña. Isabel Abad Álvaro en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza bajo nuestra dirección, para optar al grado de Doctor en Ciencia Analítica en Química.

Y asimismo,

AUTORIZAN

la presentación de dicha Memoria para que sea defendida ante el Tribunal correspondiente.

Zaragoza, 8 de junio de 2017

Francisco Laborda García

Eduardo Bolea Morales

Este trabajo ha sido realizado con cargo a los proyectos:

- “Plataformas nanometrológicas analíticas para la detección, caracterización y cuantificación de nanomateriales inorgánicos en muestras complejas” (CTQ2015-68094-C2-1-R) del Ministerio de Economía y Competitividad.
- “Innovaciones en especiación funcional-química en nanotecnología medioambiental (Nanometrología). Caracterización de nanopartículas artificiales y materia orgánica natural” (CTQ2012-38091-C02-01) del Ministerio de Economía y Competitividad.
- “Nuevas técnicas de caracterización de nanomateriales de uso industrial base plata y métodos de determinación de su movilidad y biodisponibilidad” (CTPP06/10) del Gobierno de Aragón en el marco de cooperación de la Comunidad de Trabajos de los Pirineos.

En sus inicios, este trabajo fue realizado gracias a una beca de Iniciación a la Investigación concedida por el Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA).

Distintas partes de esta Tesis Doctoral se han realizado en colaboración con las siguientes empresas, grupos de investigación y servicios de apoyo:

Laboratorios Enosán S.L.

Laboratorios Argenol S.L.

Perkin Elmer España.

Grupo de Elementos Traza, Espectroscopía y Especiación (GETEE) de la Universidad de Santiago de Compostela.

Laboratoire de Chimie Analytique Bio-inorganique et Environnement (LCABIE) del CNRS-Université de Pau et des Pays de l'Adour (Francia).

Grupo de Investigación en Nutrición Animal de la Universidad de Zaragoza.

Grup de Recerca en Nutrigenòmica de la Universidad Rovira i Virgili de Tarragona.

Surface Engineering Group del Centro de Engenharia Mecânica de la Universidad de Coimbra (SEG-CEMUC) y Grupo Revestimentos Funcionais de la Universidad de Minho (GRF) en Portugal.

Centre d'Elaboration de Matériaux et d'Études Structurales-CNRS de la Universidad de Toulouse (CEMES-CNRS), Laboratoire Plasma et Conversion d'Énergie de la Universidad de Toulouse (LAPLACE) e Instituto Pirenaico de Ecología-CSIC (IPE-CSIC).

Servicios de Análisis Químico, de Microscopia Electrónica de Materiales y de Microscopía Óptica e Imagen del Servicio General de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Zaragoza.

Y llegó el momento de dar las gracias. Afortunadamente, a lo largo de todo este tiempo he tenido la suerte de poder contar con personas que han hecho el camino mucho más sencillo.

Al Profesor Juan Ramón Castillo por brindarme la oportunidad de realizar mi Tesis Doctoral en este grupo de investigación. Sin duda alguna los años son experiencia y conocimiento, y él siempre ha tratado de transmitirnos su cariño y su lucha por otorgarle a la, a veces no tan comprendida, Química Analítica el lugar que se merece.

A mis directores de tesis, Francisco Laborda y Eduardo Bolea por dirigirme, aconsejarme y acompañarme durante todos estos años. Me habéis dado la oportunidad de introducirme en la investigación, transmitiéndome vuestro conocimiento y permitiéndome dar a conocer y continuar nuestro trabajo en mis estancias "fuera de casa". Habéis sabido llevarme por el buen camino y, sin ninguna duda, habéis sido una guía imprescindible en estos últimos meses de escritura, en los que es fácil perder la cabeza. He aprendido mucho con vosotros durante este tiempo.

A todos los profesores, compañeros y personal del Departamento de Química Analítica y en especial a los del Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores, con los que por razones obvias he compartido más tiempo. A Sierra y Teresa por su disposición a echar siempre una mano y su buen humor; a Gemma y sus téis matutinos con la que he podido compartir risas, ratos de distracción y por haber estado siempre preocupada en si había tenido tiempo para comer o no; a Josefina por tener siempre buenas palabras y una sonrisa en la cara. A las chicas del Servicio Central de Análisis: Maite, Ana y Teresa; sin duda alguna habéis sido una parte importante en todo esto. Siempre dispuestas a ayudarme y dándome ánimos en momentos en los que los necesitaba. A Belén y Sofía de las que sólo me salen palabras de cariño, siempre haciéndonos el trabajo más fácil. A Ángel López, "culpable" de que me picara el gusanillo de la Química Analítica cuando aún estaba en mis años de carrera. Es probable que sin su admirable pasión por lo que hace, nada de esto hubiera tenido lugar.

A Alba, Walvin, Laura Sánchez... y al resto de compañeros de laboratorio que en un momento u otro han estado ahí para compartir tanto alegrías como penas. Gracias por todo chicos. Es difícil olvidarse de los buenos ratos pasados dentro y fuera del laboratorio, y de las aventuras vividas en alguno de los congresos. A Juan Ramón, quien, a pesar de nuestros constantes e incesantes piques, se merece una justa

mención. Trabajador y temperamental donde los haya, pero sobre todo un apoyo, fuente de risas y discusiones filosóficas y, aunque quiera ocultarlo, un trozo de pan. Alegraba verlo con su musiqueta puesta desde el punto de la mañana. Gracias.

A Carlota, Laura Cervera y Filipa, mis tres últimas compañeras de laboratorio y con las que más he compartido.

A Carlota, de la que únicamente me salen palabras buenas y de cariño. Conozco poca gente que valga tanto como tú. Al final todos se marcharon y nos quedamos tú y yo solas; pero sinceramente no imagino mejor compañía. Has estado siempre dentro y fuera apoyándome en lo bueno y en lo malo. Nos hemos visto reír y también llorar y has hecho que los momentos duros no lo fueran tanto. Hace mucho tiempo que dejaste de ser una compañera de laboratorio y pasaste a convertirte en una buena amiga.

Laura, es evidente que tu risa, optimismo y buen rollo son contagiosos. Como alguna te dice por ahí: "la vida es para ti". Aunque no te lo quisiéramos reconocer, estábamos esperando a que vinieras para alegrarnos un poquito el día a todas (y para meternos contigo también, no nos vamos a engañar). No pierdas nunca ese buen humor; yo espero poder seguir disfrutándolo como hemos seguido haciendo hasta ahora.

A Filipa, "la portuguesa que se enamoró de España" y que hizo que los que la conocimos nos enamoráramos también un poquito de Portugal. Muchas gracias por todo: por tu alegría, tu compañía, tus "choques culturales", tus deliciosos postres y hasta por tus cantos. Para mí fue un placer hacer de guía turística y embarcarme contigo en la casi imposible aventura de encontrar piso. Al final supimos reírnos y tomarnos con humor todas nuestras desgracias. Creo que apareciste cuando más lo necesitaba. Muito obrigado Filipiña, porque a pesar de la distancia, sigues estando muy presente en mi vida.

A la Profesora Pilar Bermejo y a toda la gente de Santiago de Compostela: Elena, Antonio, Manolo, Maricarmen, Paloma... por brindarme la oportunidad y proporcionarme todas las facilidades necesarias para que mi experiencia allí fuera lo más provechosa y sencilla posible. A Mercedes, con la que compartí muchos momentos de risas, viajes descubriendo Galicia e insomnios por culpa del café.

Y sobre todo, a Juan. Gracias Juan por haberme hecho sentir como si estuviera en casa y por seguir haciéndolo a día de hoy. Esta maña te estará siempre agradecida.

A la Profesora Joanna Szpunar por darme la oportunidad de realizar mi estancia de investigación en Pau y a toda la gente del LCABIE por facilitarme todo lo necesario para que ésta fuera lo más productiva posible. A Nagore por su apoyo, su

ayuda constante, los paseos para despejarnos y por sus sorpresas en forma de Huevos Kinder. A Javi, Laura, Nico, Oriol, Patricia... gracias a todos.

A Jota, al que podría estar páginas y páginas dando las gracias (a sabiendas de que él odia que lo haga) y aun así sé que me quedaría corta en agradecimientos. Has estado siempre ahí sin dudarle ni un momento. Pasaste de ser el chico poco hablador que me mandaba limpiar los tubos en nítrico a un amigo de los de verdad, de esos que uno puede contar con los dedos de una mano. Creo que soy afortunada de haber podido conocer al Jota de verdad. Tus ánimos, tus consejos, tus resoluciones de dudas 2.0... y sobre todo, toda la confianza que has tenido siempre en mí, en mis capacidades y en tu empeño por que confíe un poquito más en mí misma. Hemos pasado muy buenos momentos, compartido risas casi asesinas y confidencias; y en los malos momentos hemos sabido apoyarnos. Somos un buen equipo, de eso sí estoy segura. Hiciste lo posible y lo imposible durante mi estancia en Pau. Así que, aún a riesgo de que me dejes de hablar: "no gracias" Jota, "no gracias" por todo una vez más.

A mis amigas de casi toda la vida. Mapi, Sandra, Marta: gracias porque, a pesar de no vernos tanto como me gustaría, habéis estado siempre ahí al pie del cañón y cuando nos reunimos todas parece que no haya pasado el tiempo. Tened seguro que la próxima botella de vino blanco la pongo yo.

A Laura Comas, María Gil y Vero, compañeras de carrera y amigas. Últimamente me habéis tenido un poco desaparecida en combate, pero sé que siempre puedo contar con vosotras para lo que haga falta (y viceversa). Gracias por tantos momentos juntas a lo largo de estos últimos nueve años, que se dicen pronto y han dado para mucho.

A Carmen, Sonia y Vanessa, "mis chicas de alemán". Habéis sido un apoyo importante en estos últimos tiempos. Gracias por vuestros ánimos, por los ratos de café (aunque casi siempre llegue tarde a ellos) y por los momentos caóticos en los que ninguna nos enterábamos de lo que teníamos que hacer. Aprender con vosotras, en todos los sentidos posibles, ha sido un gran regalo y un placer.

A mi grupo de amigos: Andrea, Bea, Borja, Jaro, Jorge, Megan, Pablo, Patri y Willy. Habéis sido un soplo de aire fresco cuando lo he necesitado y, como habéis podido, habéis logrado subirme el ánimo cuando éste andaba por los suelos. Con vosotros las risas y los buenos ratos están asegurados. Gracias por todo chicos.

A Willy, probablemente la persona que más veces me ha visto reír y llorar, e incluso hacerlo todo a la vez. Me quedan pocas cosas por decirte que no te haya dicho

ya; sin embargo, nunca me cansaré de agradecerte todo. La lista interminable de anécdotas que hemos vivido daría para una nueva tesis doctoral sobre comportamientos humanos; pero esa ya te la dejo para ti. Pueden pasar mil cosas, que sé con seguridad que siempre vas a estar ahí (aunque sea porque soy consciente de que me necesitas para nuestras recetas de bizcochos). Y es que... lo que el Camino de Santiago hace años que unió, que no lo separe nuestra cabezonería.

A Darío, al que necesitaría también varias páginas para agradecerle todo lo que ha hecho por mí en este tiempo. Llegaste por casualidad y te has quedado. A pesar de la distancia, siempre estás cerca y consigues sacarme una sonrisa en mis momentos malos. Gracias por la confianza, tus ánimos, tu paciencia, tu lucha por que tenga más seguridad en mí y, por supuesto, por los viajes a rincones desconocidos en los que en ocasiones el GPS nos ha jugado malas pasadas, por tus especialidades culinarias, los doguillos, tu servicio técnico 24 horas... y un largo etcétera de momentos. Eres alguien a quien admirar, nunca te has rendido ni has dejado de luchar. Simplemente gracias por estar; gracias, de corazón.

A Chirag, mi familia india afincada en Reino Unido. No sabes la ilusión que hace que te acuerdes y te preocupes siempre por nosotros. Espero que la próxima vez que nos veamos seas ya un experto del español.

A Javi, el positivismo personificado. Gracias por todo lo que haces por nosotros y, por supuesto, por esas clases de conducción inmejorables cargadas de risa.

A mi familia: mis tíos José María y Maribel, y a mis abuelas Maxi, Rosa y María, por llevarme desde siempre de la mano.

Y por encima de todo, a mis padres y mi hermana; con los que sería imposible tratar de buscar tan sólo unas palabras que logran explicar cuánto les quiero. Papá, mamá: habéis luchado siempre porque no nos faltara de nada ni a mi hermana ni a mí y porque nosotras pudiéramos tener la oportunidad que vosotros en su día no tuvisteis. Nos habéis enseñado siempre a valorar lo que nos rodea, a que con esfuerzo y trabajo al final hay recompensa. Mamá, eres la mujer más luchadora y fuerte que conozco. Papá, eres el hombre más bueno y generoso. Rosita, has sido mi mejor compañera de aventuras, cómplice de trastadas y siempre pendiente de tu hermana pequeña. Habéis estado conmigo siempre: en lo bueno y en lo malo. Y últimamente sé que habéis estado demasiado preocupados por mí. Sin duda alguna, nada de esto habría sido posible sin vosotros. Gracias por convertirme en quien soy. Sois lo mejor que tengo: GRACIAS.

A mis padres

*“Y el viaje ha terminado. Pero después
de haber andado tanto, no quiero aún darme por vencido.
No sería yo, si entiende lo que le quiero decir.”*

El Señor de los Anillos, J.R.R. Tolkien

RESUMEN

La incorporación de nanopartículas sintéticas a diferentes productos industriales y de consumo ha aumentado significativamente en los últimos años. La liberación de estas nanopartículas, así como de otras especies derivadas de las mismas, puede conducir a una posterior exposición para el consumidor y el medio ambiente, siendo un factor relevante para la evaluación de los riesgos asociados a su uso. Dentro de este contexto, la necesidad de métodos analíticos para la detección, caracterización y cuantificación de estas especies liberadas se hace evidente. La creciente demanda de información analítica relacionada con nanomateriales requiere la adaptación de las técnicas y métodos existentes, así como el desarrollo de nuevas estrategias. Desde el punto de vista de la Química Analítica, las nanopartículas no son sólo entidades químicas con una composición química determinada, sino también entidades físicas, con un tamaño y una forma definidos. Los entornos en los que estas nanopartículas son incorporadas pueden hacer que éstas sufran transformaciones, siendo también necesario determinar las distintas especies formadas para poder entender y predecir su comportamiento y sus efectos. Por tanto, el actual reto analítico consiste en desarrollar estrategias innovadoras para detectar, caracterizar y cuantificar nanopartículas sintéticas y sus derivados en muestras complejas y a concentraciones reales. En la mayoría de los casos, estas estrategias implican el uso de varios métodos analíticos complementarios. En esta Tesis Doctoral se ha propuesto y evaluado una plataforma de métodos analíticos basados en el uso de la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICPMS) para obtener información sobre la liberación de plata a partir de distintos tipos de muestras conteniendo nanopartículas de plata. La sensibilidad y la especificidad elemental que proporciona ICPMS en su forma de trabajo convencional se ha visto complementada por el uso de esta técnica en su modo de detección de partículas individuales (SP-ICPMS), así como mediante el uso de la ultrafiltración (UF) en combinación con ICPMS y el fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF4) acoplado a ICPMS. Los casos estudiados han incluido estudios de liberación a partir de superficies recubiertas, *nanocomposites* y micropartículas de arcillas en medios de complejidad creciente (agua ultrapura, cultivos de algas en ensayos de ecotoxicidad, vinos y procesos de digestión *in vitro*), así como el análisis

de células humanas procedentes de ensayos de nanotoxicidad. Esta plataforma de métodos analíticos ha permitido obtener información sobre la liberación de plata, tanto en su forma disuelta como nanoparticulada, así como sobre el tamaño de las nanopartículas, bajo diferentes escenarios, y con diámetros de nanopartícula de hasta 5 nm. Por otro lado, se ha desarrollado una metodología analítica basada en la detección de partículas individuales mediante ICPMS haciendo uso de instrumentación con velocidades ultrarrápidas de adquisición de datos, llevando a cabo la evaluación de sus prestaciones analíticas y su aplicación a distintos tipos de muestras con nanopartículas de plata o selenio. Esta metodología pone de manifiesto la importancia de seleccionar correctamente las concentraciones de partícula en función del instrumento y las condiciones experimentales para conseguir resultados de la máxima calidad. Asimismo, se ha observado que los efectos negativos derivados de la presencia de especies disueltas, así como la contribución de especies poliatómicas, se reducen significativamente al trabajar en el orden de los microsegundos, afectando en menor grado a los límites de detección en tamaño. El uso de tiempos de lectura en el rango de los microsegundos, junto con el uso de celda de reacción ha permitido detectar mediante SP-ICPMS nanopartículas biogénicas de selenio en muestras de levaduras.

SUMMARY

The incorporation of engineered nanoparticles into different industrial and consumer products has increased significantly in recent years. The release of these nanoparticles, as well as other derived species, can subsequently lead to consumer and environmental exposure, being a relevant factor for risk assessment. In this context, the need for analytical methods for detection, characterization and quantification of these released species becomes evident. The increasing demand of analytical information related to nanomaterials requires the adaptation of existing techniques and methods, as well as the development of new approaches. From a point of view of Analytical Chemistry, nanoparticles are not only chemical entities with a defined chemical composition, but also physical entities with defined size and shape. The scenarios in which these nanoparticles are incorporated can produce transformations of pristine engineered nanoparticles, being necessary to determine the corresponding derived species in order to understand and predict their behaviour and effects. Therefore, the current analytical challenge is to develop innovative approaches for detection, characterization and quantification of engineered nanoparticles and their derived species in complex samples and at realistic concentrations. These approaches usually involve the use of several complementary analytical methods. In this PhD Thesis, a platform of analytical methods based on the use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS) has been proposed and evaluated in order to obtain information about the release of silver from different kind of samples containing silver nanoparticles. The sensitivity and element specific response of conventional ICPMS has been complemented by the use of this technique in single particle mode (SP-ICPMS), as well as by the use of ultrafiltration (UF) in combination with ICPMS and asymmetrical flow field flow fractionation (AF4) coupled to ICPMS. The studied cases include release studies from nanocoating surfaces, nanocomposites and clay microparticles in increasing complexity media (ultrapure water, algae culture in ecotoxicity tests, wines and *in vitro* digestion processes), as well as human cells from nanotoxicity tests. This platform of analytical methods has allowed to obtain information about the release of both dissolved and particulate forms of silver, as well as the size of the nanoparticles, under a variety of scenarios and a nanoparticle diameter down to 5 nm. On the other hand, an analytical methodology based on

single particle detection ICPMS using fast-scanning quadrupole instruments has been developed, evaluating their analytical performances and their application to different kind of samples containing silver nanoparticles or selenium ones. This methodology shows the importance of properly selecting particle concentrations according to the instrument and experimental conditions in order to get results of the best quality. Moreover, it has been observed that the negative effects derived from dissolved species, as well as the occurrence of high plasma background levels, are significantly reduced by using dwell times in the microsecond range, dealing to a less affected size detection limit. The use of dwell times in the range of microseconds together with the use of a reaction cell has made it possible to detect biogenic selenium nanoparticles in yeast samples by SP-ICPMS.

ÍNDICE

I. Introducción	33
1. Nanomateriales	35
1.1. Interés y consecuencias del uso de nanomateriales	35
2. Nanomateriales y química analítica	37
2.1. Problemática analítica	37
2.2. Técnicas analíticas para el análisis de nanomateriales	38
2.3. Estrategias multimétodo basadas en el uso de ICPMS	41
2.4. Otras estrategias multimétodo para la caracterización de nanomateriales en muestras complejas	50
II. Objetivos	53
III. Experimental	59
1. PLATAFORMA ANALÍTICA PARA LA DETECCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES Y BIOLÓGICAS	61
1.1. Liberación de plata en recubrimientos bactericidas a base de nanopartículas: caracterización y cuantificación	63
1.1.1. Introducción	63
1.1.2. Experimental	64
1.1.3. Resultados y discusión	70
1.1.3.1. Evaluación inicial de la plataforma analítica UF-ICPMS/SP-ICPMS/AF4-ICPMS	70
1.1.3.1.1. Determinación de la cantidad de plata total y disuelta liberada	71
1.1.3.1.2. Detección de nanopartículas de plata liberadas mediante SP-ICPMS	72

1.1.3.1.3. Caracterización y cuantificación de nanopartículas de plata liberadas mediante AF4-ICPMS	74
1.1.3.1.4. Determinación de la cantidad total de plata y de plata disuelta liberada a partir de nanopartículas de plata depositadas sobre una capa de DLC	76
1.1.3.1.5. Detección de nanopartículas de plata liberadas a partir de nanopartículas de plata depositadas sobre una capa de DLC mediante SP-ICPMS	77
1.1.3.1.6. Detección y caracterización de nanopartículas de plata liberadas a partir de nanopartículas de plata depositadas sobre una capa de DLC mediante AF4-ICPMS	77
1.1.3.2. Estudio de liberación de plata desde recubrimientos bactericidas en función del tiempo	79
1.1.3.2.1. Determinación de la cantidad de plata total y disuelta liberada	79
1.1.3.2.2. Detección de nanopartículas de plata liberadas mediante SP-ICPMS	81
1.1.3.2.3. Detección y caracterización de nanopartículas de plata liberadas en la disolución mediante AF4-ICPMS	82
1.1.4. Conclusiones	84
1.2. Liberación de plata a partir de <i>nanocomposites</i> de sílice con nanopartículas de plata en ensayos de ecotoxicidad	87
1.2.1. Introducción	87
1.2.2. Experimental	88
1.2.3. Resultados y discusión	93
1.2.3.1. Determinación de plata total y de plata (I) liberadas	93
1.2.3.2. Detección de nanopartículas de plata mediante SP-ICPMS	96
1.2.3.3. Detección y caracterización de nanopartículas de plata liberadas en la disolución mediante AF4-UV-Vis-ICPMS	96
1.2.4. Conclusiones	103
1.3. Liberación de plata a partir de arcillas recubiertas con nanopartículas de plata	105

1.3.1. Introducción	105
1.3.2. Experimental	107
1.3.3. Resultados y discusión	114
1.3.3.1. Determinación de la cantidad total de plata y de plata disuelta en ensayos de liberación con caolín-Ag y sepiolita-Ag	114
1.3.3.2. Caracterización de la plata liberada desde el caolín-Ag y la sepiolita-Ag en función del tamaño mediante DLS	115
1.3.3.3. Caracterización de la plata liberada desde el caolín-Ag y la sepiolita-Ag en función del tamaño mediante TEM	116
1.3.3.4. Detección de nanopartículas de plata liberadas en ensayos de liberación con caolín-Ag y sepiolita-Ag mediante SP-ICPMS	118
1.3.3.5. Detección y caracterización de especies de plata liberadas desde el caolín-Ag y la sepiolita-Ag mediante AF4-UV-Vis-ICPMS	119
1.3.4. Conclusiones	124
1.4. Liberación de plata a partir de arcillas recubiertas con nanopartículas de plata utilizadas en procesos de vinificación	127
1.4.1. Introducción	127
1.4.2. Experimental	128
1.4.3. Resultados y discusión	130
1.4.3.1. Determinación de la cantidad total de plata y de plata disuelta en ensayos de liberación con caolín-Ag	130
1.4.3.2. Detección de nanopartículas de plata en ensayos de liberación con caolín-Ag mediante SP-ICPMS	131
1.4.3.3. Detección y caracterización de especies de plata liberadas desde el caolín-Ag mediante AF4-UV-Vis-ICPMS	133
1.4.3.4. Identificación de distintas especies de plata presentes en muestras de vino mediante AF4-ICPMS	134
1.4.4. Conclusiones	137
1.5. Liberación de plata a partir de arcillas recubiertas con nanopartículas de plata utilizadas como aditivos en alimentación animal: ensayos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	139
1.5.1. Introducción	139

1.5.2. Experimental	141
1.5.3. Resultados y discusión	144
1.5.3.1. Determinación de la cantidad total de plata liberada en ensayos de liberación con caolín-Ag y sepiolita-Ag	144
1.5.3.2. Determinación de la cantidad de plata liberada en procesos digestivos <i>in vitro</i>	146
1.5.3.3. Detección y caracterización de especies de plata liberadas desde el caolín-Ag en ensayos <i>in vitro</i> mediante AF4-UV-Vis-ICPMS	151
1.5.3.4. Determinación de plata total en tejidos de músculo e hígado de cerdos tratados con caolín-Ag y sepiolita-Ag	157
1.5.4. Conclusiones	159
1.6. Detección y caracterización de nanopartículas de plata en células procedentes de ensayos de nanotoxicidad	161
1.6.1. Introducción	161
1.6.2. Experimental	163
1.6.3. Resultados y discusión	168
1.6.3.1. Estudio de las condiciones experimentales para la digestión con TMAH del material biológico presente en los ensayos de nanocitotoxicidad	168
1.6.3.2. Estudio de la estabilidad de las nanopartículas de plata en las condiciones del ensayo de digestión con TMAH	169
1.6.3.3. Determinación de la concentración de plata total en las células mediante digestión con TMAH. Validación del procedimiento	174
1.6.3.4. Detección de nanopartículas de plata en células mediante AF4-ICPMS tras digestión con TMAH. Condiciones iniciales	174
1.6.3.5. Optimización de las condiciones de separación de nanopartículas de plata en AF4. Programa de flujo cruzado	176
1.6.3.6. Identificación y caracterización de nanopartículas de plata en los medios solubilizados mediante AF4-ICPMS. Análisis mediante TEM de las fracciones recogidas en el AF4	179
1.6.4. Conclusiones	183

2. DETECCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MEDIANTE DETECCIÓN DE PARTÍCULAS INDIVIDUALES ICPMS (SP-ICPMS)	185
2.1. Detección de partículas individuales mediante ICPMS: tiempos de lectura de microsegundos vs. milisegundos	187
2.1.1. Introducción	187
2.1.2. Experimental	188
2.1.3. Resultados y discusión	191
2.1.3.1. Tiempos de lectura de microsegundos vs. milisegundos: Registro de las señales	191
2.1.3.2. Efecto de la concentración sobre la incidencia de eventos múltiples	192
2.1.3.3. Efecto de los parámetros de adquisición y de la concentración en número de nanopartículas sobre la incertidumbre de los resultados	194
2.1.3.4. Efecto del tiempo de lectura sobre el rango lineal	198
2.1.3.5. Tiempo de lectura y efecto de las especies disueltas	199
2.1.3.6. Aproximación práctica para la cuantificación de la concentración en número de nanopartículas	201
2.1.4. Conclusiones	203
2.2. Detection and characterization of selenium nanoparticles in selenized yeasts by SP-ICPMS	205
2.2.1. Introduction	205
2.2.2. Experimental	206
2.2.3. Results and discussion	210
2.2.3.1. Selection of instrumental parameters for the improvement of size detection limits	210
2.2.3.2. Size detection limits	214
2.2.3.3. Selenium nanoparticles	215
2.2.3.4. Detection and characterization of biogenic SeNPs in Se-enriched yeasts	216
2.2.4. Conclusions	220

IV. Conclusiones	221
V. Anexos	231
A.1. Estudio de liberación de plata desde recubrimientos bactericidas en función del tiempo	233
A.1.1. Determinación de la cantidad total de plata y de plata disuelta	233
A.1.2. Detección de nanopartículas de plata mediante SP-ICPMS	234
A.1.3. Detección y caracterización de nanopartículas de plata liberadas en la disolución mediante AF4-ICPMS	236
A.2. Liberación de plata a partir de arcillas recubiertas con nanopartículas de plata utilizadas como aditivos en alimentación animal: ensayos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	243
A.2.1. Determinación de plata total en tejidos de músculo e hígado de cerdos tratados con caolín-Ag y sepiolita-Ag	243
A.3. Detección de partículas individuales mediante ICPMS: tiempos de lectura de microsegundos vs. milisegundos	245
A.3.1. Hoja de cálculo	245
A.4. Publicaciones	247
VI. Bibliografía	283

TABLE OF CONTENTS

I. Introduction	33
1. Nanomaterials	35
1.1. Interest and consequences of using nanomaterials	35
2. Nanomaterials and Analytical Chemistry	37
2.1. Analytical problems	37
2.2. Analytical techniques for the analysis of nanomaterials	38
2.3. Multi-method approaches based on the use of ICPMS	41
2.4. Other multi-method approaches for the characterization of nanomaterials in complex samples	50
II. Objectives	53
III. Experimental	59
1. ANALYTICAL PLATFORM FOR DETECTION, CHARACTERIZATION AND QUANTIFICATION OF SILVER NANOPARTICLES IN ENVIRONMENTAL AND BIOLOGICAL SAMPLES	61
1.1. Release of silver from bactericide silver based nanocoatings: characterization and quantification	63
1.1.1. Introduction	63
1.1.2. Experimental	64
1.1.3. Results and discussion	70
1.1.3.1. Initial evaluation of the analytical platform UF-ICPMS/SP-ICPMS/AF4-ICPMS	70
1.1.3.1.1. Determination of total silver content and silver released	71
1.1.3.1.2. Detection of silver nanoparticles released by SP-ICPMS	72

1.1.3.1.3. Characterization and quantification of silver nanoparticles released by AF4-ICPMS	74
1.1.3.1.4. Determination of total silver and dissolved silver released from silver based DLC nanocoatings	76
1.1.3.1.5. Detection of silver nanoparticles released from silver based DLC nanocoatings by SP-ICPMS	77
1.1.3.1.6. Detection and characterization of silver nanoparticles released from silver based DLC nanocoatings by AF4-ICPMS	77
1.1.3.2. Silver release study from bactericide nanocoatings as a function of time	79
1.1.3.2.1. Determination of total silver and dissolved silver released	79
1.1.3.2.2. Detection of silver nanoparticles released by SP-ICPMS	81
1.1.3.2.3. Detection and characterization of silver nanoparticles released by AF4-ICPMS	82
1.1.4. Conclusions	84
1.2. Release of silver from structured SiO₂-based nanocomposites containing silver nanoparticles in ecotoxicity tests	87
1.2.1. Introduction	87
1.2.2. Experimental	88
1.2.3. Results and discussion	93
1.2.3.1. Determination of total silver and silver (I) released	93
1.2.3.2. Detection of silver nanoparticles by SP-ICPMS	96
1.2.3.3. Detection and characterization of silver nanoparticles released by AF4-UV-Vis-ICPMS	96
1.2.4. Conclusions	103
1.3. Release of silver from silver nanoparticle-clays	105
1.3.1. Introduction	105
1.3.2. Experimental	107
1.3.3. Results y discussion	114

1.3.3.1. Determination of total silver and dissolved silver released in release experiments from kaolin-Ag and sepiolite-Ag	114
1.3.3.2. Characterization of silver released from kaolin-Ag and sepiolite-Ag based on size by DLS	115
1.3.3.3. Characterization of silver released from kaolin-Ag and sepiolite-Ag based on size by TEM	116
1.3.3.4. Detection of silver nanoparticles released in release experiments from kaolin-Ag and sepiolite-Ag by SP-ICPMS	118
1.3.3.5. Detection and characterization of silver species released from kaolin-Ag and sepiolite-Ag by AF4-UV-Vis-ICPMS	119
1.3.4. Conclusions	124
1.4. Release of silver from silver nanoparticle-clays used in winemaking	127
1.4.1. Introduction	127
1.4.2. Experimental	128
1.4.3. Results and discussion	130
1.4.3.1. Determination of total silver and dissolved silver in release experiments from kaolin-Ag	130
1.4.3.2. Detection of silver nanoparticles in release experiments from kaolin-Ag by SP-ICPMS	131
1.4.3.3. Detection and characterization of silver species released from kaolin-Ag by AF4-UV-Vis-ICPMS	133
1.4.3.4. Identification of different silver species present in wine samples by AF4-ICPMS	134
1.4.4. Conclusions	137
1.5. Release of silver from silver nanoparticle-clays used as additives in animal feed: <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> tests	139
1.5.1. Introduction	139
1.5.2. Experimental	141
1.5.3. Results and discussion	144
1.5.3.1. Determination of total silver released in release experiments from kaolin-Ag and sepiolite-Ag	144

1.5.3.2. Determination of silver content released in <i>in vitro</i> digestion processes	146
1.5.3.3. Detection and characterization of silver species released from kaolin-Ag in <i>in vitro</i> tests by AF4-UV-Vis-ICPMS	151
1.5.3.4. Determination of total silver content in muscle and kidney tissues from pigs fed with kaolin-Ag and sepiolite-Ag	157
1.5.4. Conclusions	159
1.6. Detection and characterization of silver nanoparticles in cell culture from nanotoxicity tests	161
1.6.1. Introduction	161
1.6.2. Experimental	163
1.6.3. Results and discussion	168
1.6.3.1. Study of experimental conditions for biological material digestion with TMAH	168
1.6.3.2. Study of silver nanoparticles stability under TMAH digestion conditions	169
1.6.3.3. Determination of total silver content in cells by TMAH digestion. Procedure validation	174
1.6.3.4. Detection of silver nanoparticles in cells by AF4-ICPMS after TMAH digestion. Initial conditions	174
1.6.3.5. Optimization of silver nanoparticles separation conditions in AF4. Crossflow program	176
1.6.3.6. Identification and characterization of silver nanoparticles in digested media by AF4-ICPMS. TEM analysis of the fractions collected in AF4	179
1.6.4. Conclusions	183
2. DETECTION, CHARACTERIZATION AND QUANTIFICATION OF NANOPARTICLES BY SINGLE PARTICLE DETECTION ICPMS (SP-ICPMS)	185
2.1. Detection of single particles by ICPMS: microsecond vs. millisecond dwell times	187
2.1.1. Introduction	187

2.1.2. Experimental	188
2.1.3. Results and discussion	191
2.1.3.1. Microsecond vs. millisecond dwell times: recording of signals	191
2.1.3.2. Effect of concentration on the occurrence of multiple-nanoparticle events	192
2.1.3.3. Effect of acquisition parameters and nanoparticle number concentration on the uncertainty of results	194
2.1.3.4. Effect of dwell time on the linear range	198
2.1.3.5. Dwell time and the effect of the dissolved species	199
2.1.3.6. Practical approach for nanoparticle number concentration quantification	201
2.1.4. Conclusions	203
2.2. Detection and characterization of selenium nanoparticles in selenized yeasts by SP-ICPMS	205
2.2.1. Introduction	205
2.2.2. Experimental	206
2.2.3. Results and discussion	210
2.2.3.1. Selection of instrumental parameters for the improvement of size detection limits	210
2.2.3.2. Size detection limits	214
2.2.3.3. Selenium nanoparticles	215
2.2.3.4. Detection and characterization of biogenic SeNPs in Se-enriched yeasts	216
2.2.4. Conclusions	220
<hr/> IV. Conclusions <hr/>	221
<hr/> V. Supplementary information <hr/>	231
A.1. Silver release study from bactericide nanocoatings as a function of time	233
A.1.1. Determination of total silver and dissolved silver released	233
A.1.2. Detection of silver nanoparticles released by SP-ICPMS	234

A.1.3. Detection and characterization of silver nanoparticles released by AF4-ICPMS	236
A.2. Release of silver from silver nanoparticle-clays used as additives in animal feed: <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> tests	243
A.2.1. Determination of total silver content in muscle and kidney tissues from pigs fed with kaolin-Ag and sepiolite-Ag	243
A.3. Detection of single particles by ICPMS: microsecond vs. millisecond dwell times	245
A.3.1. Calculation spreadsheet	245
A.4. Publications	247
<hr/> VI. References <hr/>	283

I. INTRODUCCIÓN

1. NANOMATERIALES

1.1. Interés y consecuencias del uso de nanomateriales

La nanociencia y la nanotecnología han experimentado una rápida expansión en las dos últimas décadas, dando lugar al desarrollo y producción de una gran variedad de nanomateriales. Estos nanomateriales sintéticos están incorporándose a un cada vez mayor número de productos industriales, de consumo y alimentos [1]. Las consecuencias inmediatas son una exposición creciente de la población humana a estos nanomateriales, junto a la inevitable liberación de nanopartículas sintéticas en el medio ambiente [2]. Aunque antes del año 2000 la nanociencia y la nanotecnología ya mostraban un rápido crecimiento, no fue hasta el año 2006 cuando empezó a aumentar la preocupación por los riesgos potenciales de los nanomateriales en la salud humana y el medio ambiente [3-5]. Desde entonces, el número de estudios y trabajos sobre el impacto de los nanomateriales sintéticos ha aumentado significativamente, aunque todavía no han permitido establecer conclusiones ni soluciones definitivas.

En el año 2011 la Comisión Europea adoptó una definición en la que por “nanomaterial” se entiende un material natural, secundario o fabricado que contenga partículas, sueltas o formando un agregado o aglomerado y en el que el 50% o más de las partículas en la granulometría numérica presente una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre 1 y 100 nm. En casos específicos y cuando se justifique por cuestiones relacionadas con el 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%. No obstante, los fullerenos, el grafeno y los nanotubos de carbono de pared simple, con una o más dimensiones externas inferiores a 1 nm deben considerarse nanomateriales [6]. Sin embargo, los métodos disponibles para llevar a cabo las medidas de tamaño de las partículas cubren los requisitos de esta definición en un grado variable, dependiendo de las propiedades del material, el rango de tamaños a medir, la presencia de agregados, etc. [7]. Por lo tanto, todavía se necesitan métodos validados, materiales de referencia y, en general, orientación práctica [8]. Dentro de este contexto, disponer de métodos analíticos para la detección, caracterización y cuantificación de nanopartículas sintéticas y de sus derivados en

muestras medioambientales y biológicas es un tema de máximo interés y actualidad, no sólo en la comunidad científica sino a nivel institucional. Una constante, tanto en los artículos científicos de revisión como en los informes realizados por agencias y comités institucionales, es la falta de estos tipos de métodos, no sólo para detectar, caracterizar y cuantificar nanopartículas, sino para evaluar sus riesgos toxicológicos y ecotoxicológicos de una manera fiable [9,10], con el fin de desarrollar normativas y regulaciones sobre el uso de nanomateriales.

La incorporación de cualquier nanomaterial sintético a un producto tiene como objetivo mejorar alguna de sus propiedades de forma que le dé un valor añadido y lo diferencie. Siguiendo este principio, es necesario asegurar que la incorporación de estos nuevos nanomateriales no suponga pérdida de otras propiedades demandadas por el consumidor o impliquen un riesgo tanto para la salud como para el medio ambiente a lo largo de todo el ciclo de vida del producto. En principio, se considera que los efectos tóxicos de los distintos nanomateriales dependen del tamaño y la forma de los mismos, junto con sus propiedades fisicoquímicas (contenido elemental, agregación/aglomeración, química superficial y funcionalización). Asimismo, se considera que los nanomateriales a base de metales presentan los mayores riesgos, ya que sus efectos pueden ser debidos a los nanomateriales mismos y a las correspondientes especies disueltas [11].

2. NANOMATERIALES Y QUÍMICA ANALÍTICA

2.1. Problemática analítica

Desde el punto de vista de la Química Analítica, las nanopartículas no son sólo entidades químicas con una composición química determinada, sino también entidades físicas, con un tamaño y una forma definidos. Además, sus características superficiales y su funcionalización les añaden una complejidad adicional. Los entornos en los que estas nanopartículas son incorporadas (alimentos, muestras medioambientales, biológicas...) pueden hacer que éstas sufran distintas transformaciones, siendo también necesario determinar las distintas especies formadas para poder entender y predecir su comportamiento y sus efectos.

Ante un problema que involucre nanomateriales, la información analítica no puede restringirse a detectar y cuantificar la concentración de un elemento o de alguna de sus especies químicas, sino que implica: 1) detectar la presencia de nanopartículas, 2) identificar el tipo de nanopartícula a partir de su composición química, 3) caracterizar las nanopartículas mediante sus tamaños y características superficiales, 4) determinar la distribución de tamaños de las mismas y 5) cuantificar su concentración en número. Adicionalmente, si la nanopartícula ha sufrido transformaciones será necesario identificar y cuantificar las nuevas especies que se hayan formado. La necesidad de toda esta información recae en que todas estas propiedades químicas y físicas están estrechamente relacionadas con el destino y la toxicidad de las nanopartículas.

Por tanto, el actual reto analítico consiste en desarrollar estrategias innovadoras para detectar, caracterizar y cuantificar nanopartículas sintéticas en muestras complejas, a concentraciones realistas (situadas desde los $\mu\text{g L}^{-1}$ a los ng L^{-1}) y en presencia de partículas naturales, de similar o diferente naturaleza. Asimismo, se deben considerar no sólo el nanomaterial puro sino también las correspondientes especies derivadas que puedan encontrarse en el sistema objeto de estudio. En la mayoría de los casos, estas estrategias implican el uso de varios métodos analíticos complementarios.

2.2. Técnicas analíticas para el análisis de nanomateriales

La caracterización y cuantificación de nanomateriales en matrices complejas supone un difícil reto analítico, ya que las medidas son altamente dependientes de: (1) el tamaño de la partícula y su naturaleza, (2) la concentración de la muestra y las propiedades fisicoquímicas de la disolución, y (3) los principios fundamentales de la técnica analítica [12]. Para obtener estas informaciones cualitativas (composición, tamaños, distribuciones de tamaños) y cuantitativas (concentración de elemento, concentración de nanopartículas) es necesario disponer de métodos analíticos con la suficiente selectividad y sensibilidad, capaces de hacer frente a estos problemas en matrices complejas.

En la Tabla I se muestran técnicas y métodos analíticos que han demostrado ser adecuados en el análisis de nanomateriales. Asimismo, se incluyen algunas de las técnicas emergentes, así como los límites de concentración y tamaño comúnmente aceptados. Las técnicas analíticas empleadas en el análisis de nanomateriales incluyen las diversas microscopías electrónicas, técnicas de dispersión de luz, la espectrometría atómica, técnicas de separación y técnicas electroanalíticas.

– Microscopía electrónica

La microscopía electrónica, basada en la aplicación de un haz de electrones, está considerada como una de las técnicas más poderosas para el análisis de nanomateriales debido a su capacidad para visualizar nanopartículas y, por tanto, para obtener información sobre su tamaño, forma o estado de agregación, así como para guiar en la interpretación de los resultados obtenidos a través de otras técnicas [13–16]. La combinación de estas microscopías con la espectroscopía de energía dispersiva de rayos-X (EDS) permite obtener información elemental y estructural, lo cual resulta muy útil para identificar la existencia de nanopartículas de un elemento determinado [17].

– Técnicas de dispersión de luz

Entre las diferentes técnicas de dispersión de luz, la dispersión de luz dinámica (DLS), también conocida como espectroscopía de correlación de fotones, es la técnica más comúnmente empleada para medir el tamaño de nanopartículas en suspensiones acuosas. La dispersión de luz dinámica utiliza la luz dispersada por

una suspensión de nanopartículas para determinar la velocidad de difusión de las mismas [18]. El movimiento Browniano de las partículas hace que la luz se disperse en diferentes intensidades. Estas fluctuaciones en la intensidad son dependientes del tiempo, por lo que con su análisis y mediante la relación de Stokes-Einstein, se obtiene el tamaño hidrodinámico de las partículas. Sin embargo, la interpretación de los datos obtenidos puede resultar compleja en presencia de partículas interferentes o en muestras que contienen partículas con distribuciones de tamaño heterogéneas, como ocurriría en el caso de la mayor parte de muestras medioambientales [19]. Otro de los inconvenientes de esta técnica, es la incapacidad de detectar la presencia de las partículas más pequeñas entre las más grandes, debido al hecho de que la intensidad de luz dispersada es proporcional a la sexta potencia del diámetro de la partícula. En consecuencia, los tamaños medios de partícula obtenidos por DLS pueden resultar sesgados. El acoplamiento de esta técnica a diversas técnicas de separación por tamaño, permite resolver estos problemas de polidispersidad y la presencia de partículas interferentes [20].

– **Espectrometría atómica**

En el caso de nanomateriales inorgánicos, la determinación de sus elementos constitutivos permite obtener información sobre el contenido total del elemento, y se puede realizar mediante diversas técnicas de espectrometría atómica [21]. Las técnicas más comunes para el análisis elemental incluyen la absorción atómica electrotermica (ET-AAS), la espectroscopía atómica de emisión con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES) y la espectroscopía de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS). Sin embargo, hay que tener en cuenta que estas técnicas por sí mismas (a excepción de la detección individual de partículas, SP-ICPMS), no son específicas para nanomateriales, sino que deben ser acopladas a otro tipo de técnicas para poder llevar a cabo su caracterización.

– **Técnicas de separación**

Las técnicas de separación por tamaños incluyen el fraccionamiento en flujo mediante campo (FFF) [22], métodos cromatográficos como la cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) o la cromatografía hidrodinámica (HDC) [23] y métodos electroforéticos como la electroforesis capilar (CE) o en gel (GE) [24]. Estas técnicas, acopladas a diferentes sistemas de detección, tienen un gran número

de aplicaciones y pueden proporcionar una base sólida en la resolución de sistemas complejos que contengan nanomateriales [2].

– Técnicas electroanalíticas

Dentro de las técnicas de electroanálisis, la voltametría de partículas inmovilizadas (VIP) y la coulombimetría de colisión de partículas (PCC) han sido aplicadas específicamente al análisis de nanomateriales [25–29]. Estas técnicas se pueden considerar complementarias y normalmente se usan combinadas [30].

Tabla I. Técnicas analíticas para el análisis de nanomateriales en sistemas complejos (se incluyen también técnicas emergentes) [31].

Técnica (acrónimo)	LOD tamaño	LOD concentr.	Información analítica
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA			
Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	< 1 nm		- Tamaño (promedio y distribución) - Forma - Composición elemental (+EDS) - Estructura química (+EELS)* - Estructura cristalina (+SAED/CBED)
Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)	1 nm		- Tamaño (promedio y distribución) - Forma - Composición elemental (+EDS)
Microscopía electrónica de barrido medioambiental (ESEM)	30 nm [32]	10^{12} L^{-1} [32]	- Tamaño (promedio y distribución) - Forma
DISPERSIÓN DE LUZ			
Análisis de rastreo de partículas (NTA)	20 nm [33]	10^9 L^{-1} [34]	- Tamaño (promedio y distribución) - Concentración en número
ESPECTROMETRÍA ATÓMICA			
Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICPMS)	-	ng L^{-1}	- Composición total del elemento - Concentración total en masa

Detección individual de partículas mediante ICPMS (SP-ICPMS)	10-20 nm [35]	10^6 L^{-1} ng L^{-1} [36]	- Detección de elemento disuelto/NP - Masa de elemento por NP - Tamaño (promedio y distribución) - Concentración en número - Concentración en masa
Espectroscopía de absorción de rayos-X (XAS)	-	mg Kg^{-1}	- Composición química - Identificación/distribución cuantitativa de especies químicas
TÉCNICAS DE SEPARACIÓN			
Fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF4)	1-5 nm	1-10 $\mu\text{g L}^{-1}$ AF4-ICPMS 0,1 mg L^{-1} AF4-UV-Vis 1 mg L^{-1} AF4-DLS [37]	- Detección de elementos complejados/NP - Tamaño (promedio y distribución) - Concentración en masa
Electroforesis capilar (CE)	5 nm	0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ CE-ICPMS [38]	- Detección de elemento disuelto/NP - Tamaño (promedio y distribución) - Concentración en masa
Cromatografía hidrodinámica (HDC)	5 nm	1 $\mu\text{g L}^{-1}$ HDC-ICPMS [39]	- Detección de elemento disuelto/NP - Tamaño (promedio y distribución) - Concentración en masa
TÉCNICAS ELECTROANALÍTICAS			
Voltametría de partículas inmovilizadas (VIP)	10 nm	$\mu\text{g L}^{-1}$	- Composición elemental - Estado de oxidación - Tamaño (promedio)
Coulombimetría de colisión de partículas (PCC)	5 nm	10^{10} L^{-1} [40]	- Detección de NPs - Tamaño (promedio y distribución) - Concentración en número - Concentración en masa

* *EELS: espectroscopía electrónica de pérdidas de energía; SAED: difracción de electrones de área seleccionada; CBED: difracción de electrones de haz convergente.*

2.3. Estrategias multimétodo basadas en el uso de ICPMS

En la actualidad no existe un único método analítico capaz de detectar, caracterizar y cuantificar nanopartículas en sistemas complejos; por lo que a

menudo se necesitan estrategias multimétodo para obtener la información analítica demandada [31]. Por otra parte, aunque el rango de técnicas analíticas disponibles para el estudio de nanomateriales es bastante amplio, las limitaciones se hacen evidentes cuando se aplican al análisis de nanomateriales a concentraciones reales en muestras complejas, como aquellas que provienen de sistemas medioambientales o biológicos. Centrándose en nanopartículas inorgánicas, se puede considerar el uso de técnicas específicas al elemento como la herramienta más valiosa para su detección.

Debido a los bajos límites de detección que se alcanzan (del orden de los ng L^{-1}), la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICPMS) es una de las técnicas más utilizadas para la detección, así como para la cuantificación, de los elementos presentes en las nanopartículas y en la muestra [21]. Sin embargo, en su forma de trabajo convencional no es capaz de proporcionar ninguna información sobre la forma fisicoquímica del elemento (p. ej. si está presente como especies disueltas o particuladas), ni ninguna otra información relacionada a las nanopartículas (tamaño, forma, agregación...). Es por ello que el uso complementario de ICPMS con otras técnicas analíticas resulta de gran importancia e interés para el análisis de nanomateriales.

Cuando se combina ICPMS con un procedimiento de separación previa, mediante la ultracentrifugación [41], ultrafiltración [42], extracción en punto de nube [43] o extracción en fase sólida [44], se puede obtener información adicional sobre la liberación de especies solubles o de las mismas nanopartículas. Por otra parte, el uso de ICPMS como detector específico al elemento, acoplado en línea a técnicas de separación en continuo, como el fraccionamiento en flujo mediante campo (FFF) [45] o la cromatografía hidrodinámica (HDC) [46] permite obtener información sobre el tamaño de las nanopartículas separadas, así como información cuantitativa relacionada con este tamaño. Finalmente, si se utiliza ICPMS en modo de detección de partículas individuales (SP-ICPMS) es posible detectar y cuantificar formas disueltas y particuladas del elemento en la misma muestra, proporcionar información sobre la masa del elemento y su tamaño (si se dispone de información adicional sobre forma, composición y densidad de las partículas), así como sobre su número y concentración en masa a niveles por debajo de los ng L^{-1} [47]. A su vez, esta técnica SP-ICPMS se puede utilizar como método de *screening* para la detección de nanopartículas y/o formas disueltas [48–

52]. Asimismo, se han llevado a cabo acoplamientos entre FFF y SP-ICPMS, tanto de manera off-line [53] como on-line [54], para diferenciar nanopartículas de plata de tamaños hidrodinámicos parecidos.

Con el fin de incrementar la información sobre las formas fisicoquímicas de un elemento en muestras de nanomateriales, a lo largo de esta Tesis Doctoral se propone el uso de una plataforma de métodos analíticos basados en el uso de ICPMS que incluye: i) ultrafiltración en combinación con ICPMS; ii) detección de partículas individuales (SP-ICPMS), iii) fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF4) acoplado a ICPMS.

- **Ultrafiltración** en combinación con ICPMS (UF-ICPMS):

La ultrafiltración es una técnica basada en el uso de membranas nanoporosas de distintos tamaños de corte. Mediante el uso de una fuerza centrífuga, las especies de tamaño/masa molecular inferior al tamaño de poro de la membrana utilizada son forzadas a atravesar la membrana [31]. De esta forma, la ultrafiltración se ha empleado para aislar directamente y de manera sencilla las especies disueltas de las nanopartículas, de ahí que se haya aplicado ampliamente en estudios de disolución de nanomateriales [55–59]. Con las membranas de menor tamaño de poro disponibles en el mercado (3kDa) el tamaño de corte se encuentra en torno a los 2 nm. Por otra parte, dependiendo de su composición y las características de su superficie, los nanomateriales y las correspondientes especies disueltas pueden mostrar interacciones con la superficie de las membranas, afectando a sus recuperaciones [60,61].

- **Detección de partículas individuales** ICPMS (SP-ICPMS):

La detección individual de partículas mediante ICPMS (single particle ICPMS, SP-ICPMS) permite tanto detectar, caracterizar en tamaño y cuantificar nanopartículas, como detectar y cuantificar formas solubles, sin necesidad de separaciones previas, a niveles de concentración de ng L^{-1} .

A pesar de que Degueldre y col. [62] demostraron a principios del 2000 la viabilidad de SP-ICPMS para el análisis de suspensiones coloidales y micropartículas, la consolidación de la misma no se produjo hasta el año 2010, con su aplicación al análisis de nanopartículas sintéticas [63–65].

El éxito de SP-ICPMS reside principalmente en dos hechos: el primero es que el análisis puede llevarse a cabo con cualquier instrumento ICPMS comercial; el segundo son los diferentes tipos de información que se pueden conseguir de una manera relativamente sencilla. Procesando los datos de una manera adecuada, se puede obtener la siguiente información relacionada a uno o más elementos [36]: (i) la presencia de uno o más elementos en forma particulada y/o disuelta; (ii) el contenido en masa del elemento por partícula; (iii) el tamaño de las partículas si se dispone de información adicional relacionada con su composición, forma y densidad; (iv) la distribución en masa por partícula y/o en tamaño ; (v) la concentración en número de partículas; y (vi) la concentración en masa tanto de la forma disuelta como particulada.

La detección individual de partículas está basada en el distinto comportamiento del analito en su forma disuelta respecto a su forma nanoparticulada en el plasma. Esta diferencia reside en la distribución del analito dentro de las gotas de aerosol. Las formas solubles de un analito están distribuidas homogéneamente en una disolución, incluso a concentraciones muy bajas, por lo que la masa del elemento que entra en el plasma por unidad de tiempo y que llega al detector en forma de iones, puede considerarse constante, produciendo una señal estable durante el tiempo de adquisición. En cambio, en una suspensión que contenga nanopartículas, el elemento no está distribuido homogéneamente, estando presente como un grupo discreto de átomos y sólo en una pequeña fracción de gotas. Por tanto, si se introduce una suspensión de nanopartículas suficientemente diluida en el plasma, cuando una nanopartícula sea vaporizada, atomizada e ionizada, generará un paquete de iones, de una duración en el detector de aproximadamente 300-500 μs [66,67], que será detectado por el espectrómetro como un pulso o evento.

La clave para trabajar en el modo SP-ICPMS reside en utilizar suspensiones de partículas a concentraciones en número suficientemente bajas y utilizar frecuencias de adquisición de datos suficientemente altas. En estas condiciones, las partículas individuales se registran como eventos discretos sobre una línea base continua, debida a la señal de fondo (especies poliatómicas procedentes del plasma y/o la matriz) o a la presencia de especies disueltas del elemento medido.

Las bases teóricas de la detección individual de partículas aplicada a ICPMS fueron descritas por Degueldre y Favarger [62,68-71] y sintetizadas por Laborda y

col. [37,47]. La suposición básica detrás de SP-ICPMS es que cada evento registrado representa una única partícula. Si esta suposición es cierta, el número de eventos contados (N_p) durante un tiempo de adquisición determinado (t_i) está directamente relacionado con la concentración en número de partículas (C_p):

$$N_p = \eta_{neb} Q_{sam} t_i C_p \quad (1)$$

donde η_{neb} es el rendimiento de nebulización y Q_{sam} es el caudal de introducción de muestra. Por otra parte, la intensidad de cada evento (r_p) es proporcional al número de átomos por partícula, lo que es proporcional a la masa del elemento por partícula (m_p):

$$r_p = K_{ICPMS} K_M m_p \quad (2)$$

donde K_{ICPMS} es la eficiencia de detección, que representa la relación entre el número de iones detectados frente al número de átomos introducidos en el ICP. K_M ($=A N_{Av}/M_M$) está relacionado con el elemento medido, donde A es la abundancia atómica del isótopo considerado, N_{Av} es el número de Avogadro y M_M la masa atómica del elemento. La ecuación 2 se puede relacionar con el tamaño de la partícula si se conoce la composición, forma y densidad de la partícula. Para una suspensión de partículas esféricas, macizas y de composición homogénea, la ecuación 2 se puede expresar como:

$$r_p = \frac{1}{6} \pi \rho X_p K_{ICPMS} K_M d^3 \quad (3)$$

donde d es el diámetro, ρ es la densidad y X_p la fracción de masa del elemento en la partícula.

Las ecuaciones 1 y 2 resumen los fundamentos de SP-ICPMS. La determinación cuantitativa de la concentración en número de partícula se basa en la relación lineal entre el número de eventos y la concentración en número (ecuación 1). Por su parte, la intensidad de los eventos de partícula es proporcional a la masa del analito por partícula (ecuación 2), o al cubo del diámetro para

partículas macizas, esféricas y puras (ecuación 3), permitiendo la determinación de las distribuciones en tamaño y masa, respectivamente.

- **Fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico acoplado a ICPMS (AF4-ICPMS):**

El fraccionamiento en flujo mediante campo (FFF) es una familia de técnicas de separación en las que la separación tiene lugar en un canal estrecho, alargado y sin fase estacionaria, por la acción de un campo externo perpendicular aplicado a un flujo laminar.

En función de la naturaleza del campo/gradiente externo aplicado se diferencian distintas subtécnicas de FFF: FFF térmico (ThFFF), FFF de sedimentación (SdFFFF), FFF de flujo (FlFFF), FFF eléctrico (ElFFF) y FFF magnético (MgFFF) [72]. Debido a su aplicabilidad en un amplio rango de tamaños (de 1 nm a 100 μm), el FFF se ha empleado en la separación de diversos tipos de nanomateriales. De entre todas estas subtécnicas, el FFF de flujo asimétrico (AF4 o AsFlFFF) está considerada como la técnica de FFF más universal, debido a que el flujo cruzado que se aplica afecta a todas las especies inyectadas, y se puede aplicar tanto a polímeros, como a macromoléculas y (nano)partículas. En AF4 el campo externo que se aplica consiste en un flujo secundario (denominado flujo cruzado) perpendicular al flujo portador que circula en régimen laminar a través del canal de separación. La retención se origina por un equilibrio entre la fuerza del campo generado y la fuerza opuesta que ejercen las partículas. El campo externo lleva a las partículas hacia la base del canal o pared de acumulación, que en este caso es una membrana semipermeable colocada sobre un soporte poroso que permite la circulación del flujo cruzado, desde donde se desplazan en sentido opuesto al campo aplicado. En AF4 el papel de la membrana es permitir el paso de este flujo cruzado, evitando al mismo tiempo que las partículas y las nanopartículas se filtren a su través.

En FFF la elución puede tener lugar de dos modos: normal o estérico. En modo normal (o Browniano) la separación está controlada por la difusión de las especies, que actúa en el sentido opuesto al campo externo aplicado. De esta forma, las partículas de menor tamaño son las primeras en eluir frente a las de mayor tamaño (Figura 1), al quedar en una posición superior en el perfil parabólico descrito por el régimen laminar y viajar a mayor velocidad. Sin embargo, cuando el

tamaño de las partículas aumenta, la difusión por el movimiento Browniano disminuye y pasa a ser prácticamente insignificante. En estas condiciones (modo estérico), normalmente para especies de diámetro mayor a una micra [22], la separación está controlada por fuerzas de repulsión con la membrana, y el orden de la elución se invierte respecto al modo normal, haciendo que las partículas de mayor tamaño eluyan antes que las más pequeñas (Figura 2). Esto se debe a que las partículas migran a través del canal a la velocidad de flujo correspondiente con la posición del centro de la partícula, al no poderse aproximar infinitamente a la pared de acumulación.

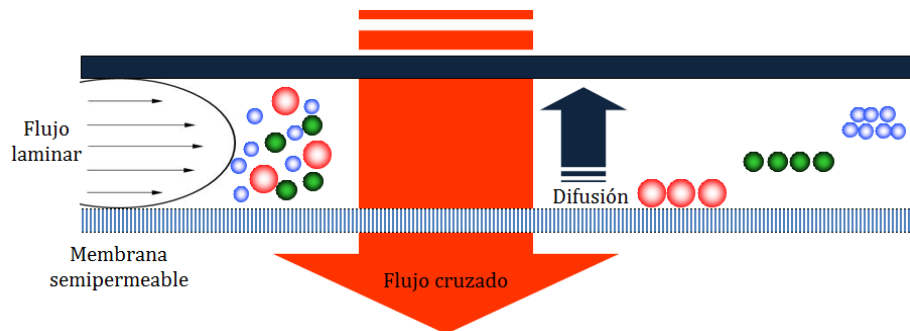


Figura 1. Principio de separación en modo normal en AF4.

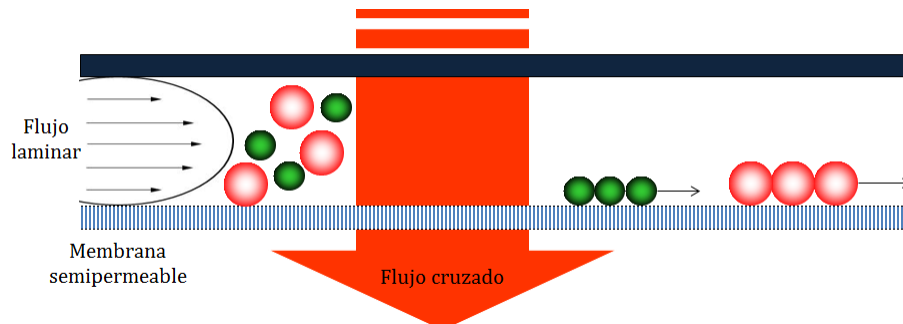


Figura 2. Principio de separación en modo estérico en AF4.

En AF4 la pared superior del canal es impermeable y el flujo cruzado se genera por el exceso correspondiente de caudal a la entrada del canal. El proceso de separación exige la realización de dos etapas: una primera donde se lleva a cabo el proceso de inyección/focalización y una segunda etapa de elución, donde se lleva a cabo la separación propiamente dicha. A la inyección de la muestra en el canal

(Figura 3a), donde se introduce caudal por la parte superior e intermedia del canal (aunque existen diferentes configuraciones instrumentales que difieren de este esquema), le sigue una etapa de focalización/relajación (Figura 3b), donde la muestra se focaliza en una zona estrecha mediante la aplicación de dos flujos opuestos y las especies alcanzan su posición de equilibrio. Finalmente, en la etapa de elución, se deja de aplicar el flujo de focalización, y tiene lugar la separación de la muestra (Figura 3c).

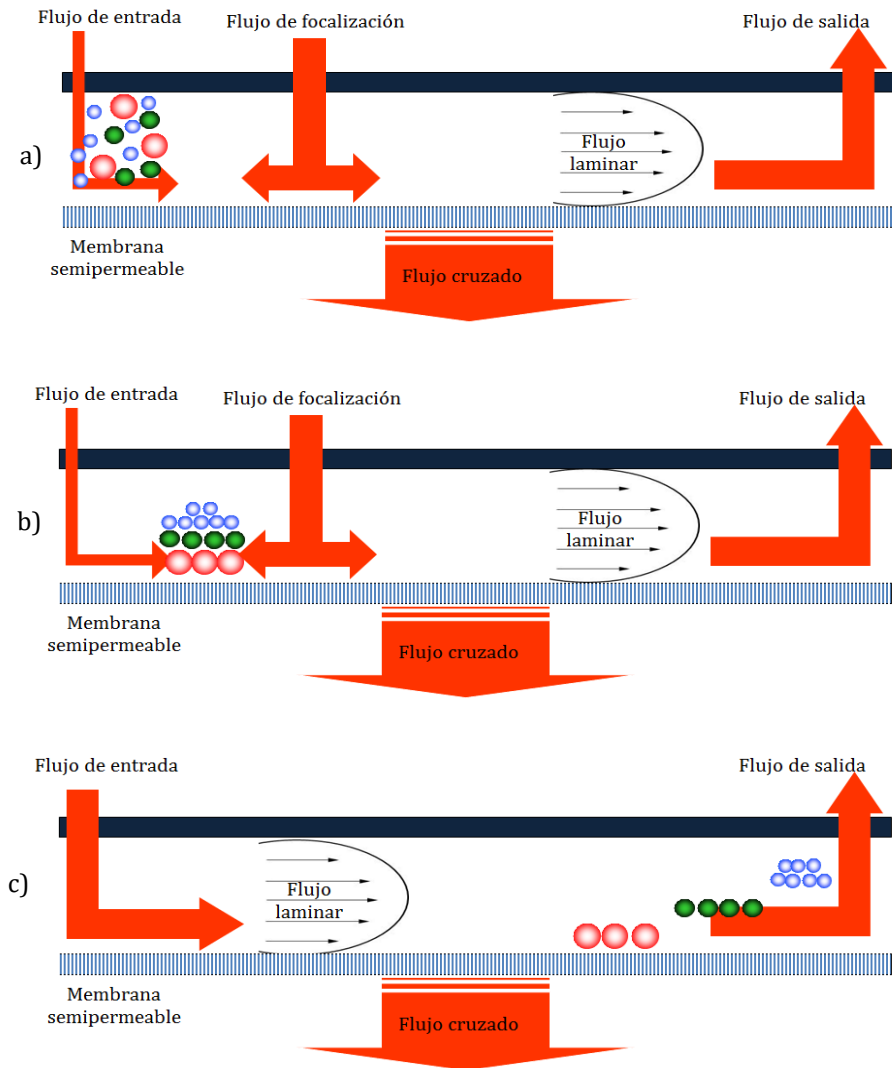


Figura 3. Etapas implicadas en la separación en AsFIFFF: (a) inyección, (b) focalización/relajación, (c) elución.

El tiempo de retención (t_r) de las especies se puede relacionar con variables experimentales a través de la teoría de FFF. Si se establece una relación lineal entre el parámetro de retención experimental R [tiempo de elución correspondiente al volumen muerto (t_0) dividido por el tiempo de retención para una partícula dada (t_r)] y λ (parámetro de retención teórico y que depende de las propiedades de la especie que se eluye), de manera que $R = 6\lambda$ (válido para valores $\lambda < 0,02$), entonces para especies eluidas en modo normal, el t_r se puede expresar como:

$$t_r = \frac{w^2}{6D_i} \ln \left(1 + \frac{V_c}{V_{out}} \right) \quad (4)$$

donde w es la anchura del espaciador, D_i el coeficiente de difusión de la sustancia i , V_c el caudal del flujo cruzado, y V_{out} el caudal de salida del canal. Cuanto menor es el tamaño de una especie, mayor es su coeficiente de difusión y, por tanto, menor es el tiempo de retención de la misma. Es necesario entonces adecuar el flujo cruzado al tamaño (coeficiente de difusión) de las especies que se quiere separar. Para una sustancia dada y con w fija, el tiempo de retención depende de la relación V_c/V_{out} . Valores más altos de flujo cruzado (V_c) llevan a mayores tiempos de retención, por lo que el caudal de flujo cruzado se debe fijar para tener buenas separaciones en tiempos razonables [73]. Las partículas más pequeñas exigen un mayor flujo cruzado para poder separarlas de forma adecuada. Sin embargo, caudales elevados de flujo cruzado conllevan tiempos de retención mayores y pérdidas selectivas de las partículas más grandes de la muestra. Una opción para muestras con un amplio rango de tamaños de partícula es aplicar gradientes, reduciendo el flujo cruzado a lo largo del tiempo.

Además del flujo cruzado, la capacidad de separación del AF4 requiere de una optimización cuidadosa de otras condiciones de operación. Así, existen varios parámetros que influyen en la calidad de la separación entre los que se encuentran: la composición del portador, la membrana y sus propiedades superficiales o las dimensiones del canal [22].

Las características de pH, fuerza iónica y composición química de la disolución portadora influyen en las propiedades electrostáticas de la membrana y de las partículas, influyendo en el comportamiento fisicoquímico de las partículas.

Generalmente, la disolución portadora proporciona una carga con la misma polaridad eléctrica (ambas negativas o ambas positivas) de la partícula y la membrana, dando lugar a una repulsión electrostática suficiente para prevenir la interacción y pérdida de partículas en la membrana. Asimismo, el portador también debe evitar la disolución y agregación de las partículas. La estabilidad de las suspensiones acuosas de partículas se puede conseguir a través de dos mecanismos diferentes: mediante repulsiones estéricas o a través de repulsiones electrostáticas [74]. En el primer caso, se usan polímeros y surfactantes no iónicos como portador, ya que éstos forman una capa adsorbida sobre la superficie de la partícula que tiene un efecto estabilizante, equilibrando las fuerzas atractivas y repulsivas. En el segundo mecanismo, la carga superficial de la fase dispersa puede aumentar por la adición de un surfactante iónico que proteja a las partículas de sufrir procesos de agregación/aglomeración.

Uno de los parámetros que permite establecer la pérdida de las especies inyectadas en el proceso de separación en AF4 es la recuperación del analito (relación entre la cantidad de analito eluido y la cantidad de analito inyectado) [73]. El control de este parámetro es especialmente importante a la hora de llevar a cabo análisis cuantitativos en AF4. Las pérdidas a través de la membrana de permeación y los procesos de sorción en la superficie de la membrana son las causas más habituales de recuperaciones bajas. Las recuperaciones en AF4 pueden estar influenciadas por diversos parámetros experimentales como: la naturaleza y el tamaño de poro de la membrana (que puede llevar a procesos irreversibles de adsorción de las partículas sobre la membrana u ocasionar pérdidas a través de la pared de acumulación, respectivamente), la composición del portador y la correcta inyección/focalización de la muestra.

2.4. Otras estrategias multimétodo para la caracterización de nanomateriales en muestras complejas

En función del grado de complejidad del medio objeto de estudio, el tipo de información requerida y la calidad de la misma, se han desarrollado diferentes estrategias multimétodo. De esta forma, la combinación de una técnica de espectrometría atómica con una técnica de microscopía electrónica (generalmente ICPMS y TEM) es considerada como la herramienta básica para una adecuada

detección, cuantificación total de masa y caracterización (tamaño y forma) de nanomateriales. Tolve y col. [75] desarrollaron una estrategia escalonada para el análisis de nanopartículas de plata en productos de consumo (en matrices textiles, de plástico y líquidas). El contenido total de plata se determinó mediante ICPMS o ICPOES, directamente o tras digestión ácida. La visualización y el tamaño de las NPs se realizó mediante SEM o TEM en combinación con EDS para confirmar la composición de las NPs. Por su parte, Gondinkas y col. [76] aplicaron SP-ICPMS para detectar partículas que contenían Ti en aguas superficiales, estimando además la concentración en número de las mismas a pesar de que únicamente las nanopartículas por encima de 130 nm eran detectables. Li y col. [77] determinaron la concentración de plata asociada a nanopartículas en plantas de tratamiento de aguas residuales por ET-AAS tras extracción en punto de nube o intercambio iónico en extracción de fase sólida.

En el caso de estudios en un contexto medioambiental o ecotoxicológico, el grado de complejidad del método propuesto aumenta. Por ejemplo, Furtado y col. [42] investigaron la persistencia y transformación de nanopartículas de plata en un mesocosmos de la zona litoral de un lago a través de SP-ICPMS, ultrafiltración, extracción en punto de nube y AF4-ICPMS. Unrine y col. [78] estudiaron el comportamiento de disolución y agregación de AgNPs en cuatro microcosmos (agua superficial; agua y sedimento; agua y plantas acuáticas; agua, sedimento y plantas acuáticas) mediante ultrafiltración con ICPMS y AF4 acoplado a UV-Vis, DLS, MALS e ICPMS.

Como se ha discutido anteriormente, la mayor parte de los trabajos publicados hasta ahora relacionados con la monitorización de nanomateriales sintéticos en el medio ambiente, alimentos y organismos, implican el análisis de muestras dopadas o de organismos expuestos *in vivo*, lo que significa que las estrategias basadas en estos métodos pueden no resultar útiles si las concentraciones en las muestras reales están por debajo de los límites de detección. En este sentido, las estrategias basadas en el uso de SP-ICPMS, así como las basadas en separaciones de AF4 acoplado a ICPMS, se consideran muy prometedoras. Para muestras sólidas, se debe combinar estas técnicas con procedimientos selectivos de digestión de matriz, con el fin de extraer las nanopartículas conservando su estado original.

II. OBJETIVOS

OBJETIVOS

El desarrollo de la Nanociencia y la Nanotecnología en estos últimos años está suponiendo la aparición de nuevos retos dentro del ámbito de la Química Analítica. Probablemente el reto más importante en este sentido, consiste en responder a la necesidad creciente de proporcionar información sobre nanopartículas como entidades en estado sólido que no están únicamente definidas por su composición química, como sucede con los analitos convencionales, sino también por sus distintas propiedades físicas. Por otro lado, los problemas analíticos que involucran nanopartículas no se restringen necesariamente a detectar, caracterizar o cuantificar este nuevo formato de analito, sino también a proporcionar información acerca de nuevas especies generadas a partir de ellas. Por último, se han de considerar otros escenarios en los que estas nanopartículas estén embebidas en materiales de distinta naturaleza o puedan estar presentes en muestras de distintos tipos (medioambientales, biológicas, alimentos...).

El principal objetivo de esta Tesis Doctoral es la evaluación de una plataforma de métodos analíticos basada en el uso del ICPMS que permita obtener información complementaria entre sí, sobre la presencia, características y contenido de nanopartículas inorgánicas y especies derivadas de las mismas, en muestras con distintos grados de complejidad. La plataforma propuesta se articula en torno a las siguientes técnicas:

- Espectrometría de masas con ICP como fuente de ionización utilizada en modo convencional, tanto para la determinación de contenidos totales del elemento objeto de estudio como en combinación con técnicas de separación.
- Espectrometría de masas con ICP como fuente de ionización utilizada en modo de detección de partículas individuales, para la detección y cuantificación de nanopartículas y especies disueltas procedentes de las primeras, así como para la caracterización de nanopartículas en función de la masa de elemento por partícula y/o del tamaño.

- Ultrafiltración en combinación con ICPMS, para el fraccionamiento y determinación de especies disueltas procedentes de las nanopartículas.
- Fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico acoplado a ICPMS, para la separación en función del tamaño, caracterización y cuantificación de nanopartículas, así como de especies derivadas de las mismas con alto peso molecular.

Este objetivo principal se complementa con el desarrollo de metodología analítica basada en la detección de partículas individuales mediante ICPMS haciendo uso de instrumentación con velocidades ultrarrápidas de adquisición de datos, la evaluación de sus prestaciones analíticas y su aplicación a distintos tipos de muestras.

OBJECTIVES

The rapid growth of Nanoscience and Nanotechnology in the last years means the appearance of new challenges in the Analytical Chemistry field. Probably the most important challenge in this sense is to respond to the increasing needs of supplying information about nanoparticles as solid phase species that are not just defined by their chemical composition, as in the case of conventional analytes, but also by their physical properties. On the other hand, analytical problems involving nanoparticles are not restricted to detect, characterize or quantify this new form of analyte, but also to provide information about new species derived from it. Finally, scenarios where these nanoparticles can be embedded in different materials or present in different kind of samples (environmental, biological, food...) must be considered.

The main objective of this PhD Thesis is the evaluation of a platform of analytical methods based on the use of ICPMS to obtain complementary information about the presence, characteristics and content of inorganic nanoparticles and derived species in samples of different grade of complexity. The proposed platform is assembled around the techniques:

- Inductively coupled plasma mass spectrometry used in standard mode both for determination of total content of the studied element as well as combined with separation techniques.
- Single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry for detection and quantification of nanoparticles and dissolved species, and for characterization of nanoparticles in function of size/mass per particle.
- Ultrafiltration in combination with ICPMS for the fractionation and determination of species derived from nanoparticles.
- Asymmetrical flow field flow fractionation coupled to ICPMS for separation in function of size, characterization and quantification of both nanoparticles and high molecular weight species.

This main objective is complemented with the development of analytical methodology based on single particle detection by ICPMS using fast-scanning quadrupole instruments, the evaluation of its analytical performance and its application to different kind of samples.

III. EXPERIMENTAL

***1. PLATAFORMA ANALÍTICA PARA LA
DETECCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y
CUANTIFICACIÓN DE
NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN
MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES Y
BIOLÓGICAS***

1.1. LIBERACIÓN DE PLATA EN RECUBRIMIENTOS BACTERICIDAS A BASE DE NANOPARTÍCULAS: CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN

1.1.1. INTRODUCCIÓN

Los efectos bactericidas de la plata se conocen y se aplican desde la antigüedad. Debido a la toxicidad relativamente baja sobre los seres humanos, la plata se ha utilizado en un gran número de aplicaciones médicas [79]. El desarrollo de superficies antibacterianas se ha convertido en una estrategia emergente en diferentes aplicaciones biomédicas [80]. Entre las diferentes estrategias adoptadas para el desarrollo de estas superficies, la incorporación o la utilización de materiales con actividad bactericida intrínseca se ha convertido en algo común [81], y los materiales a base de plata han adquirido gran notoriedad. Los mecanismos propuestos para explicar la actividad biocida de las nanopartículas de plata son: (1) liberación de iones plata [82]; (2) contacto físico directo entre bacterias y NP [83]; (3) generación de radicales libres [84]. Por lo tanto, la toxicidad puede estar relacionada tanto con las propiedades específicas de las nanopartículas, como a los efectos de los iones plata liberados desde las mismas [85].

El uso de recubrimientos a base de plata ha sido utilizado en un gran número de aplicaciones [86–90]. Además de a las propiedades específicas de la plata y del material de la matriz que la contiene, el comportamiento de estos recubrimientos depende de manera crítica de la distribución de tamaño de las nanopartículas de plata y su morfología, así como de las interfases que se establecen entre las nanopartículas y la matriz. Por tanto, para poder comprender y mejorar las propiedades de estos recubrimientos, se debe llevar a cabo una caracterización cuidadosa de los mismos [91]. Asimismo, es importante realizar estudios de liberación de estos materiales para conocer en qué forma se libera la plata que los compone.

El objetivo principal de este apartado se centra en la evaluación inicial de la plataforma metodológica UF-ICPMS/SP-ICPMS/AF4-ICPMS para la detección,

caracterización y cuantificación de especies de plata liberadas desde sustratos de vidrio sobre los que se han depositado nanopartículas de plata, desarrollados con el objetivo de ser utilizados como modelos de superficies con propiedades bactericidas. Los objetivos específicos de este apartado son:

- Fraccionar la cantidad total de plata liberada como plata (I) y/o nanopartículas mediante ultrafiltración y determinación por ICPMS.
- Identificar la presencia de formas disueltas y/o nanopartículas de plata liberada mediante SP-ICPMS, para la posterior caracterización por tamaño y cuantificación.
- Caracterizar por tamaños y cuantificar las nanopartículas de plata liberadas mediante AF4-ICPMS.

1.1.2. EXPERIMENTAL

Instrumentación

Para la detección y determinación del contenido de plata se empleó un espectrómetro ICPMS ELAN DRC-e (Perkin Elmer, Toronto, Canadá) equipado con un nebulizador concéntrico de vidrio y una cámara de nebulización ciclónica. Este mismo equipo se empleó en modo de detección de partículas individuales para las medidas de SP-ICPMS.

Se utilizó un equipo de Fraccionamiento en Flujo mediante Campo de Flujo Asimétrico (AF4) AF2000 (Postnova Analytics, Landsberg, Alemania).

Reactivos y estándares

El portador empleado en las separaciones mediante AF4 fue una disolución de dodecilsulfato sódico (SDS) (BioRad, California, EE.UU.) 0,01 % (m/V) preparada en agua ultrapura (Milli-Q Advantage, Molsheim, Francia) y ajustada a pH = 8. Para su filtración se utilizaron filtros de membrana de nylon con tamaño de poro de 0,2 μm (Millipore, Billerica, EE.UU.). Este portador fue desgasificado mediante un desgasificador a vacío colocado en línea antes de las bombas.

Las disoluciones de plata (I) se prepararon a partir de una disolución estándar de 1000 mg L⁻¹ (Panreac, Barcelona, España). Por su parte, las suspensiones de nanopartículas de plata se prepararon a partir de estándares

comerciales con diámetros nominales de 10 nm (PlasmaChem, Berlín, Alemania), 20 ± 5 , 40 ± 5 , 60 ± 5 y 100 ± 8 nm (Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.).

Tanto en la determinación total mediante ICPMS, como en el acoplamiento AF4-ICPMS se utilizó una disolución de estándar interno de Rh y Cs de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ en HNO_3 1% (v/v) (Baker Instra Analyzed for Trace Metals Analysis, J.T. Baker, Holanda).

Todas las disoluciones y suspensiones se prepararon por pesada en una balanza analítica GH-200 (A&D, California, EE.UU.) con una precisión de $\pm 0,1$ mg. Las suspensiones fueron sonicadas en baño (Ultrasons-P, Selecta, Barcelona, España) durante 1 min justo antes de cada medida.

Muestras

Las muestras estudiadas son láminas de vidrio sobre las que se habían depositado nanopartículas de plata con el fin de desarrollar una superficie con propiedades bactericidas.

Las muestras fueron proporcionadas por el Centro de Engenharia Mecânica de la Universidad de Coimbra (SEG-CEMUC), Portugal. Las nanopartículas metálicas se depositaron por condensación de clústeres gaseosos generados en plasma (*Plasma Gas Condensation*, PGC). El sistema de deposición de clústeres estaba conectado a una cámara que permitía la deposición de nanopartículas metálicas y de los recubrimientos de carbono tipo diamante (*diamond-like carbon*, DLC) de forma secuencial y simultánea. En la Figura 1.1.1. se muestra una representación de este sistema.

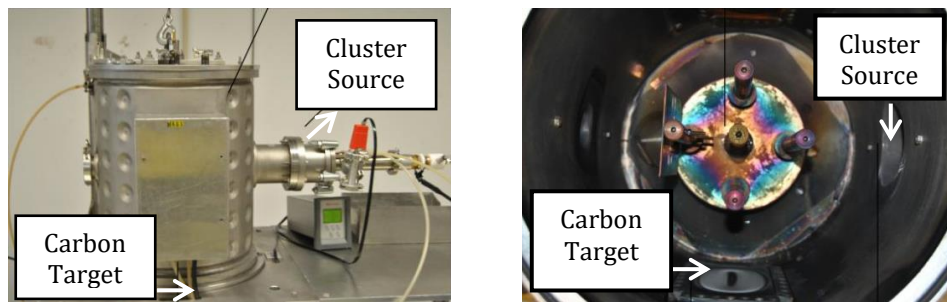


Figura 1.1.1. Sistema de deposición empleado. La imagen de la izquierda es una vista exterior de la cámara de deposición; la de la derecha se corresponde con el interior de la misma.

Se analizaron tres tipos de muestras:

- Láminas de vidrio con nanopartículas de plata o de plata y oro depositadas directamente.
- Láminas de vidrio recubiertas con una capa de DLC y nanopartículas de plata depositadas sobre esta última.
- Láminas de vidrio recubiertas con una capa de DLC y nanopartículas de plata o de plata y oro depositadas simultáneamente.

En la Figura 1.1.2. se muestran imágenes TEM y SEM de los tres tipos de muestras. En el caso de las láminas de vidrio recubiertas con una capa de DLC únicamente se llevó a cabo el análisis mediante SEM, debido a que el espesor del recubrimiento DLC era de alrededor de 200 nm.

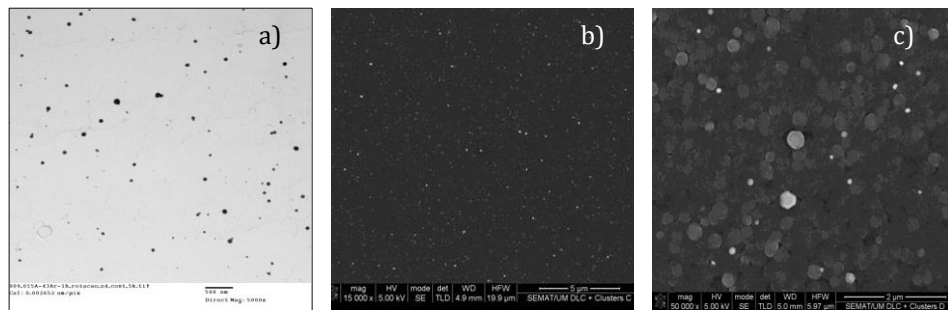


Figura 1.1.2. Imágenes (a) TEM de láminas de vidrio con nanopartículas de plata ($\times 400000$); (b) SEM de láminas de vidrio recubiertas con una capa de DLC y nanopartículas de plata depositadas sobre ésta ($\times 15000$); (c) SEM de láminas de vidrio recubiertas con una capa de DLC y nanopartículas de plata depositadas simultáneamente ($\times 50000$).

Todas las muestras fueron recibidas dentro de tubos de polietileno de 50 mL que habían sido previamente lavados con HNO_3 10 % durante 24 horas y posterior lavado con agua desionizada. Las muestras estudiadas quedan recogidas en la Tabla 1.1.1.

Las muestras denominadas como AgNP (1, 5, 6) se refieren a láminas de vidrio sobre las que las nanopartículas de plata habían sido directamente depositadas. Por su parte, las descritas como AgAuNP (3, 4) contaban con nanopartículas de oro y plata depositadas sobre la superficie. La muestra

referenciada como AgNP/DLC (2) consiste en nanopartículas de plata depositadas sobre una capa de DLC. Las denominadas como AgNP+DLC R (7, 8) y AgAuNP+DLC (11, 12) incorporaban las nanopartículas dentro del recubrimiento carbonoso. La muestra AgNP+DLC MS (9, 10) estaba también compuesta por nanopartículas de plata dentro del recubrimiento de DLC, pero el recubrimiento se había llevado a cabo con un método alternativo que permitía conseguir nanopartículas de menor tamaño, en comparación a las del recubrimiento AgNP+DLC R.

Además, se contaba con láminas de vidrio sobre las que no se había depositado ningún tipo de nanopartícula y que fueron analizadas como blancos.

Tabla 1.1.1. *Muestras de láminas de vidrio con diferentes tratamientos.*

Nº	Denominación	Descripción de la muestra
1	AgNP	nanopartículas de Ag depositadas sobre vidrio
2	AgNP/DLC	nanopartículas de Ag depositadas sobre capa DLC
3 - 4	AgAuNP	nanopartículas de Ag y Au depositadas sobre vidrio
5 - 6	AgNP-R	nanopartículas de Ag depositadas sobre vidrio
7 - 8	AgNP+DLC-R	nanopartículas de Ag depositadas simultáneamente con DLC sobre vidrio
9 - 10	AgNP+DLC-MS	nanopartículas de Ag depositadas simultáneamente con DLC sobre vidrio
11 - 12	AgAuNP+DLC	nanopartículas de Ag y Au depositadas simultáneamente con DLC sobre vidrio

Procedimientos

- Experimentos de liberación

Para realizar los experimentos de liberación, las láminas de vidrio AgNP y AgNP/DLC (1 y 2, respectivamente) se pusieron en contacto con 50 mL de agua ultrapura, manteniéndose en agitación 24 horas a temperatura ambiente en ausencia de luz (agitador orbital analógico Reax 2; Heidolph, Schwabach, Alemania). Transcurrido este tiempo la disolución resultante se transfirió a un tubo de polietileno para su posterior análisis.

Para obtener información sobre la liberación en función del tiempo, el resto de las láminas se mantuvieron en las condiciones indicadas anteriormente

durante 2 horas, 24 horas y una semana; estos tiempos son los utilizados en ensayos biológicos para evaluar la adhesión bacteriana y la formación de biopelículas. Al igual que en el caso anterior, también se utilizaron 50 mL de agua ultrapura. Transcurridas 2 horas desde la puesta en contacto con el agua ultrapura, se extrajeron 4 mL de la misma para realizar los diferentes ensayos. Este mismo procedimiento se repitió a las 24 horas y transcurrida una semana.

- Determinación de la plata total restante en las láminas de vidrio tras los experimentos de liberación en agua

Para determinar la cantidad total de plata depositada en las láminas de vidrio, éstas se trataron con ácido nítrico al 10% (v/v), manteniéndose en agitación durante 4 días. Posteriormente, las disoluciones se diluyeron con agua ultrapura antes de su análisis mediante ICPMS.

- Ultrafiltración

La separación de la plata (I) de las nanopartículas de plata se realizó mediante ultrafiltración, utilizando ultrafiltros Nanosep (Pall, Ann Arbor, EE.UU.) con membrana de poliétersulfona de 3 kDa, que se puede asociar a un diámetro hidrodinámico de 2 nm. Las membranas de los ultrafiltros se lavaron dos veces mediante la centrifugación de 500 μ L de agua ultrapura antes de la ultrafiltración de las muestras. Para la ultrafiltración los 500 μ L se sometieron a 9000 rpm durante 20 min a 20 °C en todos los casos. El ultrafiltrado del segundo lavado fue guardado y analizado por ICPMS como blanco del ultrafiltro para detectar la presencia de posibles contaminantes. En todos los casos se utilizó una centrífuga refrigerada Heraeus Multifuge X1R (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.) equipada con un rotor de ángulo fijo para tubos Eppendorf. Las suspensiones de las muestras se sonicaron durante 1 minuto antes de la ultrafiltración. Los ultrafiltrados (aproximadamente 500 μ L) se diluyeron hasta 5 mL con agua ultrapura antes del posterior análisis por ICPMS.

- Detección de partículas individuales (SP-ICPMS)

Trabajando en este modo, la velocidad de adquisición de datos con instrumentos estándar de ICPMS está limitada por la sobrecarga del buffer de datos. Para evitarlo, se midió a un tiempo de lectura de 5 ms y se usó un tiempo de

asentamiento de 3 ms que permitiera vaciar ese buffer de datos [64]. Las muestras fueron diluidas con agua ultrapura y sonicadas antes de su análisis.

- AF4-ICPMS

En la Tabla 1.1.2. se resume el programa empleado para llevar a cabo la separación. En algunos casos se modificó la duración de la primera etapa de separación (no así el flujo cruzado aplicado). La primera etapa constante pasó de 7 a 17 o 22 min según el caso, mientras que el resto de etapas se mantuvieron igual. De esta forma, el tiempo total del programa de separación se situó en 15, 25 o 30 min.

Se usó un volumen de inyección de 100 μL . Las muestras fueron inyectadas directamente en el sistema de AF4 sin dilución previa.

Tabla 1.1.2. Programa de inyección y de flujo cruzado utilizado para las medidas de AF4 con un flujo a la salida del detector de 1,0 mL min^{-1} .

Etapa del programa	Tiempo / min	Flujo cruzado	
		Modo	mL min^{-1}
Inyección/focalización	5	(Flujo de inyección, 0,2 mL min^{-1})	1
Separación	7	Constante	0,5
	1	Caída lineal	0,5 a 0
	2	Constante	0

El espaciador utilizado, que define la anchura del canal, fue de 350 μm de espesor. Como pared de acumulación se utilizaron membranas de ultrafiltración de poliétersulfona (PES) con un tamaño de poro de 5 kDa (Postnova Analytics).

El t_r de las especies que se eluyen a través del canal de FFF se puede relacionar con su tamaño. Para unas mismas condiciones experimentales, y asumiendo que la separación se ajusta a las predicciones teóricas, es posible establecer una relación lineal entre el tamaño de las especies y el tiempo de retención. La caracterización de tamaños de las nanopartículas de plata se hizo calibrando el sistema AF4 frente a estándares de nanopartículas de plata de tamaño conocido (de 10 a 60 nm). Para ello, se inyectaron los estándares diluidos en la fase

móvil empleada (SDS 0,01 %, pH = 8) a través del canal utilizando el mismo programa de separación que el empleado para la muestra (Tabla 1.1.2). Se estableció una relación lineal entre el logaritmo del factor de retención R ($R = t_0/t_r$) y el logaritmo del diámetro (d) en nanómetros de las nanopartículas [92].

El portador se dirigió desde el canal de separación hasta un detector UV-Vis de diodos (Shimadzu, Duisburg, Alemania) que recogió la señal entre 200 y 650 nm; y hasta el espectrómetro ICPMS colocado en línea.

La concentración de plata separada a través de AF4 se cuantificó de manera on-line a través del ICPMS. Para ello se cuantificaron los fractogramas obtenidos a través de AF4-ICPMS transformando la señal de ^{107}Ag (cps) en concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$), mediante la señal obtenida en continuo para una disolución de plata (I) de concentración conocida, y convirtiendo el eje tiempo (min) en volumen, a través del flujo a la salida del detector (1 mL min^{-1}). De esta forma, y teniendo en cuenta el volumen de inyección de muestra ($100 \mu\text{L}$), se pudo determinar la cantidad de plata eluida.

Un parámetro importante que hay que controlar cuando se lleva a cabo una separación a través de FFF es la recuperación del analito. Para caracterizar y cuantificar de manera adecuada las AgNPs, es necesario minimizar las posibles interacciones entre las AgNPs y los componentes del canal. Si estas interacciones se corresponden con procesos irreversibles, conllevan a la pérdida de nanopartículas introducidas en el canal [73]. Los cálculos de recuperación se hicieron con tres inyecciones de la muestra, sin aplicar ningún flujo cruzado en el canal AF4 (tampoco se aplica ninguna etapa de inyección). Después, se integraron las áreas de los picos y se realizó una estimación de la recuperación de plata en el canal según:

$$\% \text{ Rec Ag} = \frac{\text{Área de la señal del factograma (AF4)}}{\text{Área de la señal sin canal (FIA)}} \cdot 100 \quad (1.1.1.)$$

1.1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.1.3.1. Evaluación inicial de la plataforma analítica UF-ICPMS/SP-ICPMS/AF4-ICPMS

La evaluación inicial de la plataforma analítica basada en el uso de ICPMS se llevó a cabo con láminas de vidrio recubiertas directamente con nanopartículas

de plata (muestra 1-AgNP) sometidas a ensayos de liberación en agua ultrapura durante 24 horas.

1.1.3.1.1. Determinación de la cantidad de plata total y disuelta liberada

La determinación de la plata total y de plata disuelta liberada se determinó mediante ICPMS, por análisis directo de la disolución procedente del ensayo o después de someterla a ultrafiltración. Tanto la plata disuelta como las nanopartículas de plata se comportan en el ICPMS de manera similar [64], por lo que no fue necesario someter las muestras a una digestión ácida.

En la Tabla 1.1.3. se muestran los resultados obtenidos en la cuantificación de la muestra 1-AgNP, correspondiente a nanopartículas de plata depositadas directamente sobre la lámina de vidrio. La fracción total se refiere a la cantidad de plata total liberada en el ensayo. La fracción ultrafiltrada hace referencia a la plata determinada en el ultrafiltrado, la cual estaría como Ag^+ en la disolución, ya que el ensayo se realizó con agua ultrapura. La retención de plata (I) por parte de la membrana de los ultrafiltros se considera despreciable, ya que se obtienen valores de recuperación en el ultrafiltrado cercanos al 100 % para distintos niveles de concentración [93]. Asimismo, se muestra el porcentaje de plata ultrafiltrada respecto a la cantidad total de plata liberada. La última columna hace referencia a la cantidad de plata liberada en el medio respecto a la cantidad de plata presente en la lámina de vidrio.

Tabla 1.1.3. Cantidad de plata total y ultrafiltrada liberada a partir de la lámina 1-AgNP. Media \pm desviación estándar ($n=3$).

Muestra	Fracción	Cantidad de plata / μg	% Ag UF. vs. total liberada	% Ag total liberada vs. total en el material
1-AgNP	Total	$0,82 \pm 0,02$	$42,7 \pm 1,1$	$5,8 \pm 0,1$
	Ultrafiltrada	$0,35 \pm 0,01$		

La cantidad de plata presente en la lámina de vidrio se determinó siguiendo el tratamiento descrito en el Apartado 1.1.2, que fue de $11,27 \pm 0,05 \mu g$. Si

se toman los valores de la cantidad de plata total liberada en el ensayo de agua ultrapura, junto con los correspondientes al ataque con ácido nítrico, se encuentra una cantidad total de plata en la lámina de $14,02 \pm 0,05 \mu\text{g}$.

El límite de cuantificación alcanzado (calculado como 10 veces la desviación estándar del blanco) fue de 10 ng L^{-1} (0,5 ng). Teniendo en cuenta la dilución de los ultrafiltrados, el límite de cuantificación obtenido referido a las suspensiones fue de 100 ng L^{-1} (5 ng).

De los resultados anteriores se observa que únicamente el 5,8 % de la plata total presente en el material es liberada en los ensayos con agua ultrapura. De esta plata, en torno al 42,7 % estaría como Ag^+ en la disolución; quedando un 57,3 % de la plata liberada en forma de nanopartículas.

A su vez se llevó a cabo un ensayo para comprobar si parte de la plata iónica liberada durante el experimento podía quedar adsorbida en la superficie de la lámina de vidrio. Para ello, se hizo una adición de $9,5 \mu\text{g}$ de plata (I) en dos láminas de vidrio que no habían sido sometidas a ningún pretratamiento y sobre las que no se había depositado plata. Al igual que en los ensayos descritos anteriormente, se llevaron a 50 mL con agua ultrapura y se dejaron en agitación. Se tomaron fracciones a las 3 horas, 24 horas y después de una semana. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.1.4. De ellos se pudo concluir que la plata (I) no estaba siendo adsorbida sobre la superficie de vidrio a lo largo del experimento.

Tabla 1.1.4. Concentración de plata (I) encontrada en μg . Media \pm desviación estándar ($n=3$).

	3 horas	24 horas	1 semana
Lámina A + 9,48 μg plata (I)	$9,45 \pm 0,31$	$9,30 \pm 0,10$	$9,15 \pm 0,11$
Lámina B + 9,56 μg plata (I)	$10,9 \pm 0,3$	$10,8 \pm 0,2$	$10,6 \pm 0,1$

1.1.3.1.2. Detección de nanopartículas de plata liberadas mediante SP-ICPMS

Para detectar la presencia de nanopartículas mediante SP-ICPMS, se introdujo la disolución procedente del ensayo de liberación de la muestra 1-AgNP en el sistema ICPMS, previa dilución 1:50 con agua ultrapura antes del análisis.

En SP-ICPMS es habitual procesar los datos de barridos de tiempo representando la frecuencia o el número de pulsos frente a la intensidad de cada

pulso. De esta forma, se obtienen histogramas de frecuencia donde la primera distribución se corresponde con la señal de fondo y/o a la presencia de formas disueltas del elemento medido, y la segunda distribución corresponde a las propias nanopartículas [64]. En la Figura 1.1.3. se muestran los barridos de tiempo, así como los histogramas de intensidad correspondientes para este caso. En los barridos de tiempo se muestra una línea horizontal utilizando el criterio 3σ para la diferenciación de la señal de fondo de los eventos debidos a nanopartículas [94]. En los histogramas de intensidad se muestra una ampliación de la zona baja del mismo para poder distinguir los eventos de nanopartículas de la distribución debida a la señal de plata (I).

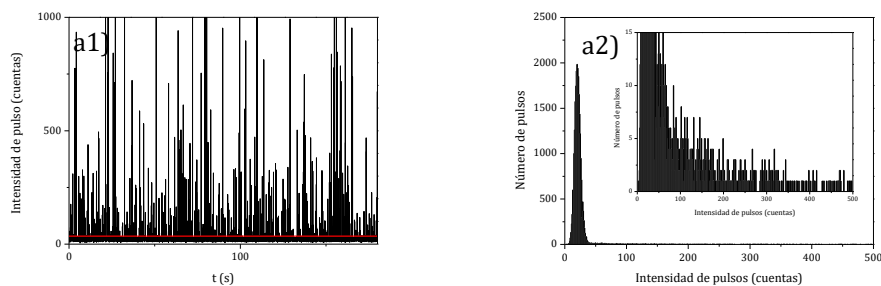


Figura 1.1.3. Barrido de tiempo (a1) e histograma de intensidad (a2) correspondientes a la plata liberada de la lámina de vidrio 1-AgNP tras 24 horas. Monitorización del isótopo ^{107}Ag .

En la Figura 1.1.3. se observa que la disolución procedente de la muestra 1-AgNP contiene tanto plata (I) (la línea base presenta valores superiores que los correspondientes blancos) como nanopartículas de distintos tamaños (presencia de pulsos sobre la línea base). Aunque el número total de pulsos detectados permitió confirmar la presencia de nanopartículas, no se obtuvo una distribución de pulsos procedentes de nanopartículas completamente resuelta con respecto a la distribución correspondiente a la línea base (plata disuelta). La presencia de colas a la derecha de la distribución de la línea base pone de manifiesto la existencia de nanopartículas por debajo del límite de detección, situado en los 40 nm. Por tanto, la presencia de plata disuelta y de nanopartículas de plata de pequeño tamaño impidió aprovechar al máximo la información que puede proporcionar SP-ICPMS,

quedando limitado a un método de *screening* para confirmar la presencia de plata tanto disuelta como particulada.

1.1.3.1.3. Caracterización y cuantificación de nanopartículas de plata liberadas mediante AF4-ICPMS

Ante la imposibilidad de caracterizar y cuantificar directamente las nanopartículas de plata liberadas mediante SP-ICPMS, la muestra 1-AgNP fue inyectada directamente en el sistema AF4-UV-Vis-ICPMS para la caracterización por tamaños y cuantificación de las nanopartículas de plata liberadas. El uso de la detección UV-Vis, junto con ICPMS, viene justificado por las propiedades ópticas de las nanopartículas. Las nanopartículas de plata presentan una banda de absorción por resonancia de plasmón superficial localizado en la región visible del espectro. Esta banda se sitúa cerca de los 400 nm en el caso de las AgNPs libres. El desplazamiento de la banda depende del tamaño de la partícula y del entorno químico [95]. Sin embargo, en este caso la detección UV-Vis no fue de ayuda debido a la baja concentración de nanopartículas encontrada en las disoluciones.

El programa de separación aplicado se corresponde con el recogido en la Tabla 1.1.2. Se calibró el sistema mediante el uso de nanopartículas de plata de 10 y 40 nm, estableciendo una relación lineal entre el logaritmo del factor de retención R ($R = t_0/t_r$) y el logaritmo del diámetro en nanómetros de las nanopartículas de: $\log R = -0,4507 \log d + 0,3041$ ($r^2 = 0,988$).

En la Figura 1.1.4. se muestra el fractograma obtenido para la muestra 1-AgNP. La distribución obtenida muestra desde nanopartículas menores de 5 nm hasta mayores de 35 nm, con un máximo a $7,04 \pm 0,11$ nm.

Los límites de detección de concentración alcanzados a través de AF4-ICPMS se calcularon como tres veces la desviación estándar de la línea base dividido por la sensibilidad [73]. Para este fin, se inyectaron 100 μL de una suspensión diluida de un estándar de AgNPs de 10 nm con una concentración de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (masa inyectada 5 ng). Se empleó la altura del pico en el máximo del fractograma de ICPMS correspondiente, obteniendo un valor de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (0,1 ng), lo cual corresponde a una concentración en número de $1,8 \times 10^{11} \text{ L}^{-1}$ para nanopartículas de plata de 10 nm.

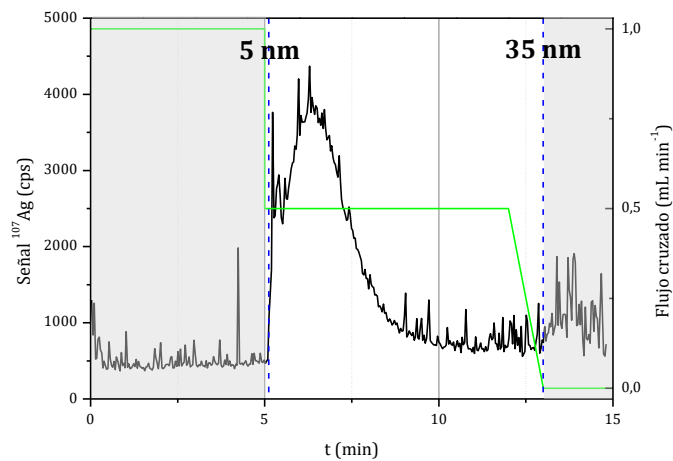


Figura 1.1.4. Fractograma de la plata liberada a partir de la muestra 1-AgNP. Las zonas sombreadas en gris son zonas en las que no se puede asignar correctamente los tamaños al no aplicarse flujo cruzado.

El fractograma obtenido fue cuantificado para determinar la cantidad de plata en forma de nanopartículas en la disolución. Este valor se corresponde con $0,47 \pm 0,03 \mu\text{g}$, lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos indirectamente a partir de la determinación de plata total y ultrafiltrada (Apartado 1.1.3.1.1 – Tabla 1.1.3). En estos resultados la diferencia encontrada entre la plata total y la plata (I) determinada por ultrafiltración era de $0,47 \pm 0,02 \mu\text{g}$. El uso de AF4-ICPMS permite confirmar que esa diferencia es debida a nanopartículas de plata, así como a asignar sus tamaños. En este punto conviene recordar que la plata (I) presente no se eluye a través del canal, sino que se pierde a través de la membrana que constituye la pared de acumulación (la recuperación de la muestra en el canal AF4 fue de $54 \pm 7 \%$, lo cual estaría de acuerdo con el contenido de plata particulada determinada por ultrafiltración, que se correspondía con un 57 % del total de plata).

1.1.3.1.4. Determinación de la cantidad total de plata y de plata disuelta liberada a partir de nanopartículas de plata depositadas sobre una capa de DLC

Una vez comprobada la capacidad de la plataforma analítica UF-ICPMS/SP-ICPMS/AF4-ICPMS para obtener información detallada sobre la cantidad de plata liberada, así como sobre sus formas fisicoquímicas, desde láminas de vidrio sobre las que se había depositado nanopartículas de plata, se procedió a estudiar los procesos de liberación que tenían lugar sobre una superficie diferente. En este caso, láminas de vidrio en las que las nanopartículas de plata habían sido depositadas sobre una capa de DLC (2-AgNP/DLC).

En la Tabla 1.1.5. se muestran los resultados obtenidos en la cuantificación de la muestra 2-AgNP/DLC. Al igual que en el caso anterior, la fracción total se refiere a la cantidad de plata total liberada en el ensayo. La fracción ultrafiltrada hace referencia a la plata determinada en el ultrafiltrado, la cual estaría como Ag^+ en la disolución, ya que el ensayo se realizó con agua ultrapura. Asimismo, se muestra el porcentaje de plata ultrafiltrada respecto a la cantidad total de plata liberada. En este caso no se realizó un tratamiento ácido posterior a los ensayos de liberación.

Tabla 1.1.5. Cantidad de plata total y ultrafiltrada liberada a partir de la lámina 2-AgNP/DLC. Media \pm desviación estándar ($n = 3$).

Muestra	Fracción	Cantidad de plata	% Ag UF. vs. total
		/ μg	liberada
2-AgNP/DLC	Total	12,58 \pm 0,09	86,5 \pm 0,8
	Ultrafiltrada	10,86 \pm 0,06	

De los resultados anteriores, se observa que el porcentaje de plata liberada como plata (I) en la lámina 2-AgNP/DLC es casi el doble del encontrado anteriormente en la lámina 1-AgNP (Apartado 1.1.3.1.1), en las que se había depositado las nanopartículas directamente sobre la superficie de vidrio (86,5 % vs. 42,7 % de plata (I) liberada). En este caso, una mayor proporción de la plata que se libera lo hace como Ag^+ , quedando un 13,5 % asociado a nanopartículas.

1.1.3.1.5. Detección de nanopartículas de plata liberadas a partir de nanopartículas de plata depositadas sobre una capa de DLC mediante SP-ICPMS

Para detectar la presencia de nanopartículas mediante SP-ICPMS, se introdujo la suspensión procedente del ensayo de liberación de la muestra 2-AgNP/DLC en el sistema ICPMS, previa dilución 1:10000 con agua ultrapura antes del análisis. La alta dilución llevada a cabo en este caso se debe a la alta concentración de plata (I) encontrada previamente en los ensayos de ultrafiltración.

En la Figura 1.1.5. se muestran los barridos de tiempo, así como los histogramas de intensidad correspondientes para este caso. En los histogramas de intensidad se muestra una ampliación de la zona baja del mismo para poder distinguir los eventos de nanopartículas de la distribución debida a la señal de plata (I). En esta muestra 2-AgNP/DLC se observa que la disolución contiene principalmente plata (I), tal y como se había visto anteriormente en los ensayos de ultrafiltración. Nanopartículas de muy pequeño tamaño, inferior a 25 nm, podrían estar presentes, aunque a una concentración muy inferior a la de la plata (I).

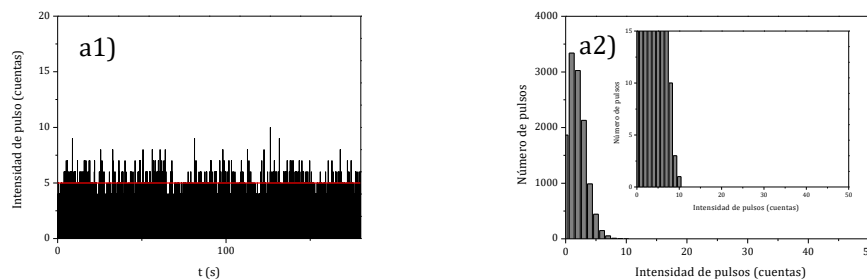


Figura 1.1.5. Barrido de tiempo (a1) e histograma de intensidad (a2) correspondientes a la plata liberada de la lámina de vidrio 2-AgNP/DLC tras 24 horas. Monitorización del isótopo ^{107}Ag .

1.1.3.1.6. Detección y caracterización de nanopartículas de plata liberadas a partir de nanopartículas de plata depositadas sobre una capa de DLC mediante AF4-ICPMS

La muestra 2-AgNP/DLC fue inyectada directamente en el sistema AF4-ICPMS para la detección y caracterización de las posibles nanopartículas de plata

liberadas. Al igual que en el caso anterior, la detección UV-Vis no fue de ayuda debido a la baja concentración de nanopartículas encontrada en las disoluciones.

El programa de separación aplicado se corresponde con el recogido en la Tabla 1.1.2. Se calibró el sistema mediante el uso de nanopartículas de plata de 10 y 40 nm.

En la Figura 1.1.6. se muestra el fractograma obtenido para la disolución liberada por la muestra 2-AgNP/DLC. La distribución obtenida muestra un amplio rango de tamaños de nanopartículas incluso menores de 5 nm. Se encuentra un máximo a $4,77 \pm 0,01$ nm.

El fractograma obtenido fue cuantificado para determinar la cantidad de plata en forma de nanopartículas en la disolución. Este valor se corresponde con $2,40 \pm 0,13$ μg . Este valor es algo mayor al obtenido anteriormente a través del análisis de plata total y de la ultrafiltración (Apartado 1.1.3.1.4. – Tabla 1.1.5). En estos resultados la diferencia encontrada entre la plata total y la plata (I) determinada por ultrafiltración era de $1,72 \pm 0,11$ μg . Esta sobreestimación en la cantidad de plata determinada por AF4-ICPMS puede ser debida al pequeño tamaño de las nanopartículas, las cuales no están del todo resueltas del pico correspondiente al tiempo muerto o bien a problemas de contaminación en el canal, al eluirse material adsorbido en la membrana en anteriores inyecciones.

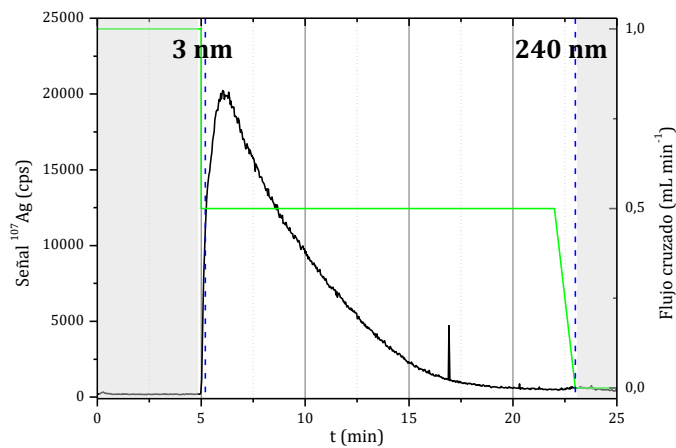


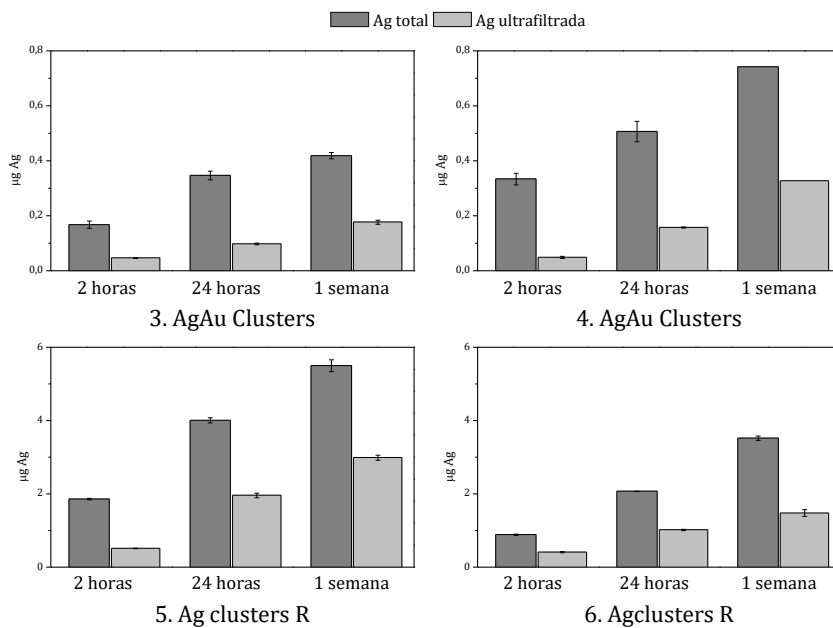
Figura 1.1.6. Fractograma de la plata liberada a partir de la muestra 2-AgNP/DLC obtenido a través de AF4-ICPMS. Las zonas sombreadas en gris son zonas en las que no se puede asignar correctamente los tamaños.

1.1.3.2. Estudio de liberación de plata desde recubrimientos bactericidas en función del tiempo

1.1.3.2.1. Determinación de la cantidad de plata total y disuelta liberada

A la vista de los resultados anteriores y comprobada la utilidad de la plataforma analítica para obtener información sobre los procesos de liberación de plata que tienen lugar en distintos recubrimientos bactericidas a base de nanopartículas de plata, se llevó a cabo un estudio de los mismos en función del tiempo. La determinación de la plata total y de plata disuelta liberada tras 2 horas, 24 horas y una semana se determinó mediante ICPMS, por análisis directo de la disolución procedente del ensayo o después de someterla a ultrafiltración.

En la Figura 1.1.7. se muestran en forma de gráficos de barras los resultados obtenidos en la cuantificación de las muestras mediante ICPMS en función del tiempo. En el Anexo 1.1. se recogen estos mismos resultados cuantitativos en forma de Tabla. En estos resultados se observan diferencias en la cantidad de plata entre muestras de la misma naturaleza, lo cual puede estar relacionado con el proceso de fabricación y el tiempo de deposición de las nanopartículas sobre las láminas de vidrio.



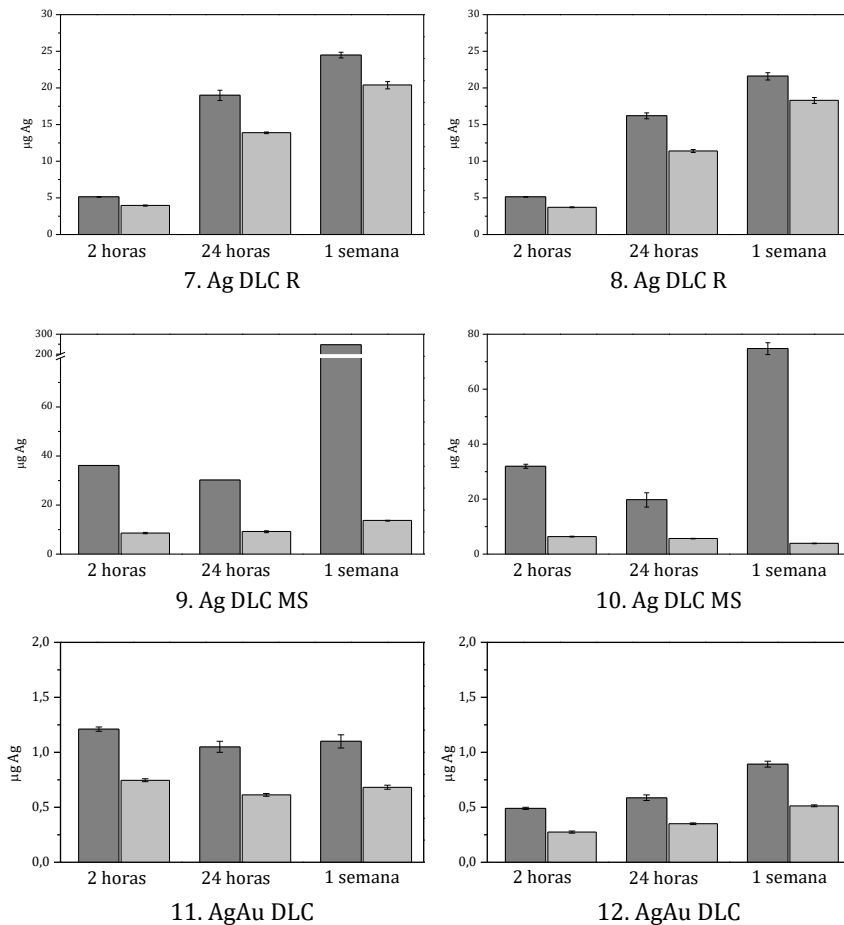


Figura 1.1.7. Gráficos de barras para la cantidad de plata total (gris oscuro) y plata (I) (gris claro) liberada desde las diferentes láminas de vidrio analizadas, en µg Ag.

En todos los casos se observa una diferencia entre la cantidad de plata presente en la fracción total y en la ultrafiltrada, lo que permite deducir la presencia de distintas formas de plata (Ag^+ y nanopartículas) presentes en la disolución de los ensayos de liberación. En términos generales se observa un incremento de la plata total liberada con el tiempo. En el caso de las láminas con nanopartículas de Ag depositadas simultáneamente con DLC (7/8-AgNP+DLC-R), es en las que se encuentra la mayor proporción de plata en el ultrafiltrado respecto a la plata total. Asimismo, se observa un porcentaje de plata (I) casi constante a lo largo del tiempo; lo que significa que la plata total que se está liberando lo hace en un alto porcentaje como plata (I). Para el caso de las láminas con nanopartículas de

Ag y Au depositadas simultáneamente con DLC sobre vidrio (11/12-AgAuNP+DLC) se observa una concentración de plata en la disolución constante a lo largo del experimento, lo que indica que la plata es liberada rápidamente y transcurrido un corto periodo de tiempo deja de hacerlo. El porcentaje de plata encontrada en el ultrafiltrado para estas muestras también se mantiene prácticamente constante a lo largo del tiempo, lo que implica que no hay transformaciones de las formas de la plata en el medio en las condiciones del ensayo.

En lo que resta de capítulo la discusión se centrará en la aplicación del resto de técnicas de la plataforma analítica UF-/SP-/AF4-ICPMS para el estudio de la liberación de plata con el tiempo en la muestra 3-AgAuNP, en la cual las nanopartículas de plata y oro habían sido depositadas sobre la superficie de la lámina de vidrio. Los resultados obtenidos para el resto de muestras quedan recogidos en el Anexo 1.1.

1.1.3.2.2. Detección de nanopartículas de plata liberadas mediante SP-ICPMS

Para detectar la presencia de nanopartículas mediante SP-ICPMS, se introdujeron las disoluciones en el sistema ICPMS, previa dilución 1:100 con agua ultrapura.

En la Figura 1.1.8. se muestran los barridos de tiempo, así como los histogramas de intensidad correspondientes para la muestra 3-AgAuNP tras 24 horas. En los histogramas de intensidad se muestra una ampliación de la zona baja del mismo para poder distinguir los eventos de nanopartículas de la distribución debida a la señal de fondo. En este caso se llevó a cabo la monitorización del isótopo ^{107}Ag y también del isótopo ^{197}Au .

Se observa que la suspensión procedente del ensayo contiene tanto plata (I) como nanopartículas de distintos tamaños. Aunque el número total de eventos encontrados permitió confirmar la presencia de nanopartículas, la distribución de las mismas no está bien resuelta de la distribución correspondiente a la plata (I), lo que significa que puede haber nanopartículas por debajo del límite de detección. Debido a la frecuencia de adquisición de datos alcanzable con el ICPMS utilizado (tiempos de lectura de 5 ms) no fue posible confirmar si se trataba de

nanopartículas compuestas de plata y oro o, por el contrario, eran partículas puras de plata o de oro.

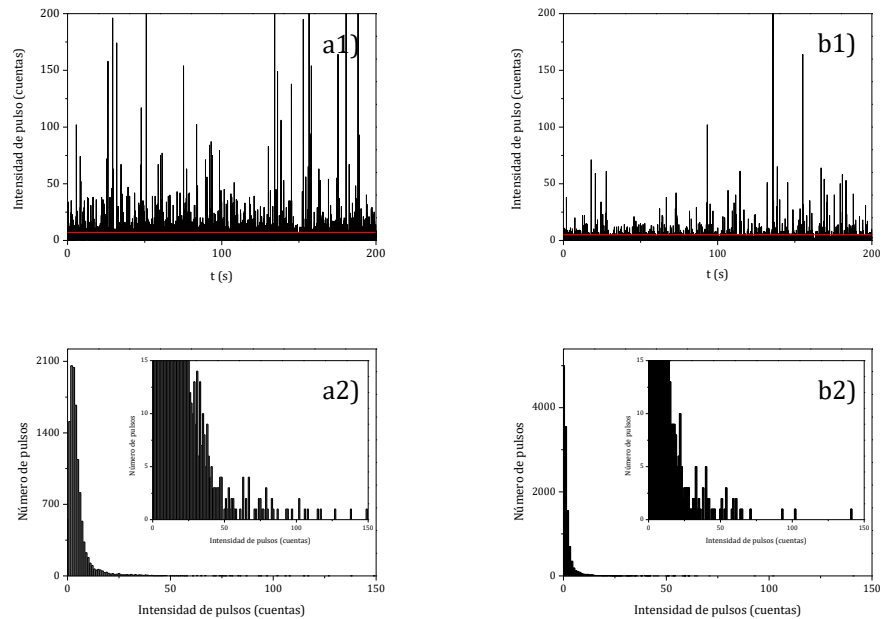


Figura 1.1.8. Barridos de tiempo (a1, b1) e histogramas de intensidad (a2, b2) correspondientes a la disolución liberada por la muestra AgAuNP tras 24 horas. Monitorización del isótopo ^{107}Ag (a) y del isótopo ^{197}Au (b).

1.1.3.2.3. Detección y caracterización de nanopartículas de plata liberadas en la disolución mediante AF4-ICPMS

Las muestras fueron inyectadas directamente en el sistema AF4-ICPMS para la detección y caracterización de las posibles nanopartículas de plata liberadas. La detección UV-Vis no fue de ayuda en este caso debido a la baja concentración de nanopartículas encontrada en las disoluciones liberadas. El programa de separación aplicado se corresponde con el recogido en la Tabla 1.1.2. Se calibró el sistema mediante el uso de nanopartículas de plata de 10, 20, 40 y 60 nm.

En la Figura 1.1.9. se muestran los fractogramas correspondientes a las disoluciones liberadas por la muestra 3-AgAuNP con el tiempo. En el caso de la muestra correspondiente a una semana se monitorizó tanto la señal ICPMS de plata como la de oro.

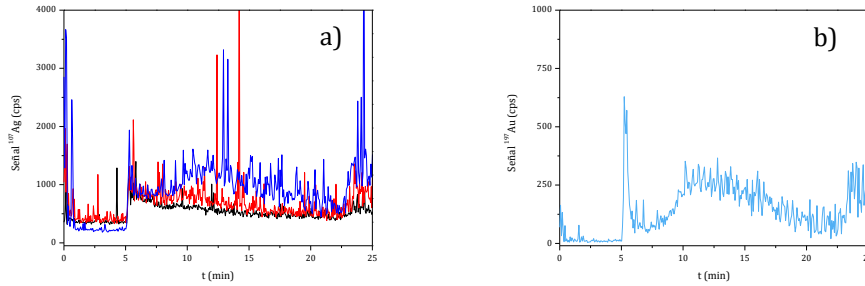


Figura 1.1.9. Fractogramas de las disoluciones liberadas por las muestras AgAuNP. (a) Señales de plata de cada muestra con el tiempo: negro para 2 horas, rojo para 24 horas y azul para una semana; (b) señal de oro: azul claro para una semana.

El tamaño estimado para las nanopartículas de plata transcurrida una semana se sitúa en torno a 40 nm. Para el resto de tiempos no se pudo realizar una estimación de distribución de tamaño debido a la baja intensidad y al ruido de las propias señales, con concentraciones inferiores a $6 \mu\text{g L}^{-1}$.

En los fractogramas de la suspensión obtenida al cabo de una semana, se observan perfiles similares para plata y oro, lo cual sugiere que las nanopartículas liberadas contienen los dos elementos, extremo que no pudo ser confirmado mediante SP-ICPMS.

La concentración de plata separada a través de AF4, asociada a nanopartículas se cuantificó de manera on-line a través del ICPMS. Esta concentración de plata debería ser similar a la diferencia entre la concentración de plata total y plata iónica determinada anteriormente por ultrafiltración e ICPMS.

En la Tabla 1.1.6. se muestran las cuantificaciones obtenidas en AF4 (asociada a nanopartículas) junto con las de los ultrafiltrados (asociada a plata (I)) y la cantidad de plata total liberada. Asimismo, se muestra el porcentaje de plata recuperada al sumar las cuantificaciones de AF4 y ultrafiltrados respecto a la cantidad total de plata.

Tabla 1.1.6. Cantidad de plata cuantificada, en μg , y porcentaje de plata recuperada.

		2 horas	24 horas	1 semana
AgAuNP	AF4	0,196 \pm 0,013	0,284 \pm 0,021	0,305 \pm 0,039
	UF	0,048 \pm 0,002	0,128 \pm 0,042	0,252 \pm 0,106
	Suma	0,244 \pm 0,014	0,412 \pm 0,063	0,557 \pm 0,067
	Total	0,251 \pm 0,117	0,427 \pm 0,113	0,581 \pm 0,228
	Rec. (%)	107 \pm 45	97,9 \pm 11,2	101 \pm 28,3

1.1.4. CONCLUSIONES

Se han evaluado las prestaciones de la plataforma metodológica UF-ICPMS/SP-ICPMS/AF4-ICPMS para el análisis de muestras que contengan nanopartículas y derivados de las mismas. En esta primera fase, la plataforma se ha aplicado al estudio de la liberación de plata a partir de recubrimientos a base de nanopartículas de plata en medios acuosos (agua ultrapura). El uso de la plataforma ha permitido:

- Cuantificar la cantidad de plata total liberada (ICPMS).
- Detectar la liberación de la plata tanto en forma de nanopartículas como de plata (I) (SP-ICPMS).
- Fraccionar la plata total liberada como plata iónica y nanopartículas de plata (UF-ICPMS)
- Determinar el tamaño de las nanopartículas liberadas (AF4-ICPMS).
- Cuantificar directamente la cantidad de plata en forma de nanopartículas (AF4-ICPMS).

En relación con SP-ICPMS, los casos presentados ponen de manifiesto que la presencia de plata disuelta limita la capacidad de la técnica para detectar nanopartículas de pequeño tamaño. Concretamente, frente a un límite de detección en tamaño de 24 nm en agua, éste aumenta a 40 nm en presencia de concentraciones de plata disuelta de 135 ng L⁻¹, restringiendo la técnica SP-ICPMS a detectar la presencia de nanopartículas.

Por lo que se refiere al uso de la ultrafiltración en combinación con el análisis del ultrafiltrado mediante ICPMS, la utilización de membranas de ultrafiltración de PES (3 kDa) permite la recuperación cuantitativa de la plata

iónica. El límite de cuantificación alcanzado (calculado como 10 veces la desviación estándar del blanco) fue de 10 ng L^{-1} (0,5 ng). Teniendo en cuenta la dilución de los ultrafiltrados, el límite de cuantificación obtenido referido a las suspensiones fue de 100 ng L^{-1} (5 ng).

La técnica combinada AF4-ICPMS, mediante el uso de un programa específico para nanopartículas, ha permitido separar nanopartículas de plata de hasta 3-5 nm de diámetro, compensando las limitaciones de SP-ICPMS para la detección y caracterización de nanopartículas de estos tamaños. La técnica combinada permite la cuantificación correcta de las nanopartículas separadas por encima de unos 5 nm, ya que para tamaños menores la dispersión en tamaño de las mismas, junto con su solapamiento con el pico correspondiente al tiempo muerto, dificultan la cuantificación. Así mismo, la elución incontrolada de especies adsorbidas en medidas anteriores puede conducir a la sobreestimación de la fracción de nanopartículas.

El uso de la plataforma analítica UF-ICPMS/SP-ICPMS/AF4-ICPMS ha permitido detectar, caracterizar y cuantificar las especies de plata liberadas a partir de un recubrimiento de nanopartículas de plata, permitiendo obtener información detallada sobre el proceso de liberación, así como sobre la oxidación sufrida por las nanopartículas de plata.

Respecto a los recubrimientos estudiados, se puede concluir que los procedimientos utilizados para la deposición de nanopartículas influyen en el comportamiento de liberación, tanto en las formas como en la cantidad de plata liberada frente al tiempo. El uso de la plataforma analítica ha permitido observar:

- Diferencias entre los distintos tipos de recubrimientos empleados.
- Diferencias en la liberación de plata frente al tiempo.
- Diferencias entre las proporciones de plata (I)/AgNPs y entre los tamaños de las nanopartículas.

1.2. LIBERACIÓN DE PLATA A PARTIR DE *NANOCOMPOSITES* DE SÍLICE CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN ENSAYOS DE ECOTOXICIDAD

1.2.1. INTRODUCCIÓN

Debido a la presencia de las nanopartículas de plata en un gran número de productos industriales y de consumo, la liberación de las mismas a sistemas acuáticos resulta probable, pudiendo producir efectos tóxicos en los organismos acuáticos [17]. En los últimos años, diversos estudios han demostrado la toxicidad de las nanopartículas de plata en diferentes microorganismos, como bacterias o algas [96–98]. Esta toxicidad parece provenir tanto de la liberación de iones plata (Ag^+) como de las interacciones entre las nanopartículas de plata y la membrana celular. La microalga *Chlamydomonas reinhardtii* representa una de las clases de microorganismos acuáticos más sensible a nanomateriales metálicos. Este alga unicelular, cuyo genoma es bien conocido [99], es un modelo simple de eucariotas y ha sido utilizado ampliamente en ensayos de ecotoxicidad [96,100–103]. En el caso de la plata, este alga ha sido utilizada también como biosensor para medir la liberación de plata disuelta desde nanopartículas de plata [96,100,104].

Uno de los métodos utilizados para controlar la liberación de plata desde nanopartículas de plata es la inclusión de estas últimas en *nanocomposites*. Las matrices que las contienen pueden estabilizar las nanopartículas de plata y al mismo tiempo permiten una liberación controlada de plata para aplicaciones médicas [105–108].

El objetivo principal de este apartado se centra en la detección y caracterización de especies de plata en medios de cultivo de algas *Chlamydomonas reinhardtii* expuestas a *nanocomposites* silíceos conteniendo nanopartículas de plata haciendo uso de la plataforma metodológica UF-ICPMS/SP-ICPMS/AF4-ICPMS. A diferencia de la situación planteada en el Capítulo 1.1, la presencia de las algas utilizadas en el ensayo de ecotoxicidad puede afectar al proceso de liberación de la plata y a la naturaleza de las especies liberadas, incrementando la complejidad de las muestras a analizar.

1.2.2. EXPERIMENTAL

Instrumentación

Para la cuantificación de plata se empleó un espectrómetro ICPMS ELAN DRC-e (Perkin Elmer, Toronto, Canadá) equipado con un nebulizador concéntrico de vidrio y una cámara de nebulización ciclónica. Este mismo equipo se empleó en modo de detección de partículas individuales para las medidas de SP-ICPMS.

Se utilizó un equipo de Fraccionamiento en Flujo mediante Campo de Flujo Asimétrico (AF4) AF2000 (Postnova Analytics, Landsberg, Alemania).

Reactivos y estándares

El portador empleado en las separaciones mediante AF4 fue una disolución de dodecilsulfato sódico (SDS) (BioRad, California, EE.UU.) 0,01 % (m/v) preparada en agua ultrapura (Milli-Q Advantage, Molsheim, Francia) y ajustada a pH = 8. Para su filtración se utilizaron filtros de membrana de nylon con tamaño de poro de 0,2 μm (Millipore, Billerica, EE.UU.). Esta fase móvil fue desgasificada mediante un desgasificador a vacío colocado en línea antes de las bombas.

Las disoluciones de plata (I) se prepararon a partir de una disolución estándar de 1000 mg L^{-1} (Panreac, Barcelona, España). Por su parte, las suspensiones de nanopartículas de plata se prepararon a partir de estándares comerciales con diámetros nominales de 10 nm (PlasmaChem, Berlín, Alemania), 20 ± 5 y 40 ± 5 (Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.).

Tanto en la determinación total mediante ICPMS, como en el acoplamiento AF4-ICPMS se utilizó una disolución de estándar interno de Rh y Cs de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ en HNO_3 1% (v/v) (Baker Instra Analyzed for Trace Metals Analysis, J.T. Baker, Holanda).

Todas las disoluciones y suspensiones se prepararon por pesada en una balanza analítica GH-200 (A&D, California, EE.UU.) con una precisión de $\pm 0,1$ mg. Las suspensiones fueron sonicadas (Ultrasons-P, Selecta, Barcelona, España) durante 1 min justo antes de cada medida.

Nanocomposites a base de plata

Los *nanocomposites* consistieron en láminas de 2x2 cm, compuestas de una capa de sílice de 90 nm de espesor depositada térmicamente sobre un sustrato de silicio, de manera que las nanopartículas de plata aparecían embebidas en la

proximidad de la superficie de la capa de sílice (Figura 1.2.1). Las nanopartículas se depositaron mediante un procedimiento de deposición por plasma en dos etapas, combinando técnicas de *sputtering* (Deposición Física de Vapor - PVD) para las nanopartículas de plata y de polimerización por plasma (Deposición Química de Vapor Mejorada por Plasma - PECVD) para el recubrimiento con sílice [109]. En la Figura 1.2.2. se muestra esquemáticamente este proceso empleado para la elaboración de los *nanocomposites*.

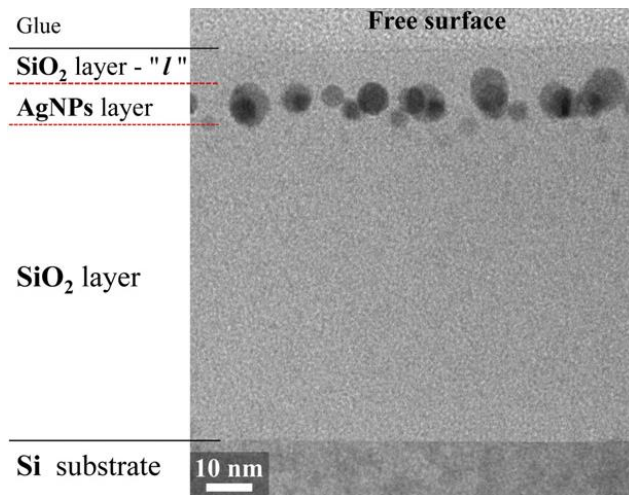


Figura 1.2.1. Imagen TEM de los nanocomposites empleados.

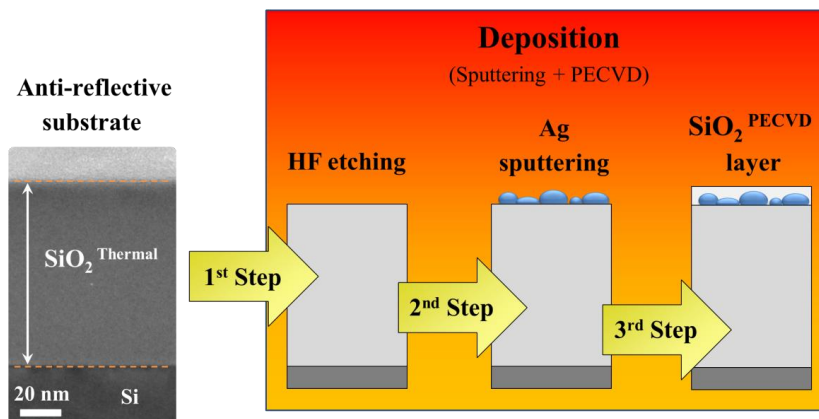


Figura 1.2.2. Esquema de la técnica de deposición empleada en la fabricación de los nanocomposites de SiO₂ con nanopartículas de plata.

Muestras

El listado de las muestras analizadas se recoge en la Tabla 1.2.1. Se trata de 1,5 – 2,0 mL de medios de cultivo empleados en ensayos de ecotoxicidad con algas *Chlamydomonas reinhardtii*. Estas muestras fueron proporcionadas por el Instituto Pirenaico de Ecología (IPE) – CSIC, Zaragoza.

Se dispuso de seis muestras control que no contenían plata y cuatro muestras procedentes de ensayos con sustratos silíceos que sí la contenían. Entre las muestras control, se contaba con cuatro muestras de los medios de cultivo sin ningún tipo de sustrato silíceo y sin plata (C1-000, C2-000, C3-001, C4-001); y de dos muestras control en las que los sustratos empleados eran sustratos de SiO₂ sin plata (C5-100, C6-101). Por su parte, las muestras S1-110, S1-111, S2-110 y S2-111 eran sustratos de SiO₂ con plata.

Tabla 1.2.1. Muestras.

Muestra	sustrato	Ag	algas
CONTROLES			
C1-000	no	no	no
C2-000	no	no	no
C3-001	no	no	sí
C4-001	no	no	sí
C5-100	sí	no	no
C6-101	sí	no	sí
SUSTRATOS CON PLATA			
S1-110	sí	sí	no
S1-111	sí	sí	sí
S2-110	sí	sí	no
S2-111	sí	sí	sí

En la Figura 1.2.3. se muestran imágenes obtenidas a través de TEM para los sustratos con plata empleados en las muestras S1-110, S1-111, S2-110 y S2-111. Estas muestras contenían un sustrato elaborado a través de la técnica de deposición por plasma. Se observan nanopartículas de plata con un diámetro medio de $7,9 \pm 4,3$ nm.

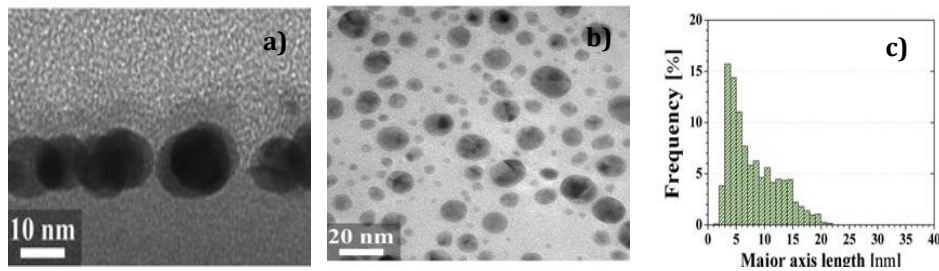


Figura 1.2.3. Imágenes TEM; (a) ampliación de la parte superior de las capas de los *nanocomposites*; (b) muestra empleada para el estudio de la liberación de plata y (c) su distribución de tamaño asociada.

Procedimientos

- Ensayos de ecotoxicidad

Los ensayos se llevaron a cabo sobre láminas de *nanocomposite* de 2x2 cm. A cada lámina colocada en un erlenmeyer se añadieron 6 mL de una disolución MOPS (ácido 4-morfolinpropanosulfónico) 0,01 M ajustada a pH = 7,5 [100]. Los erlenmeyers se mantuvieron en agitación a 90 rpm, temperatura ambiente y en oscuridad, durante 20 horas. Transcurrido este tiempo, se extrajo la muestra sólida de los erlenmeyer que la contenían y se tomaron 2 mL de cada uno. En un tercer paso, se añadió una suspensión de algas a los 4 mL de disolución restantes. La exposición a las mismas tuvo una duración de una hora, bajo condiciones de iluminación continua que aseguraran la actividad normal de las algas. Para evitar la agregación y sedimentación de las algas, la disolución se agitó de manera constante a 90 rpm durante el experimento. Las muestras analizadas fueron obtenidas por centrifugación de las disoluciones de ensayo.

- Determinación de plata total

Todas las muestras fueron diluidas (1:10) con agua ultrapura antes del análisis mediante ICPMS.

- Ultrafiltración

Para llevar a cabo la separación de plata (I) de las nanopartículas de plata se utilizó la ultrafiltración. Para ello se empleó una centrífuga refrigerada Heraeus Multifuge X1R (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.) equipada con un rotor

de ángulo fijo para tubos Eppendorf. Los ultrafiltros Eppendorf empleados eran Nanosep (Pall, Ann Arbor, EE.UU.) con membrana de poliétersulfona de 3 kDa, que se puede asociar a un diámetro hidrodinámico de 2 nm. Las membranas de los ultrafiltros se lavaron dos veces mediante la centrifugación de 500 μ L de agua ultrapura antes de la ultrafiltración de las muestras. Para la ultrafiltración los 500 μ L se sometieron a 9000 rpm durante 20 min a 20 °C en todos los casos. El ultrafiltrado del segundo lavado fue guardado y analizado por ICPMS como blanco del ultrafiltro para detectar la presencia de posibles contaminantes. Las suspensiones de las muestras se sonicaron durante 1 minuto antes de la ultrafiltración. Los ultrafiltrados (aproximadamente 500 μ L) se diluyeron hasta 5 mL con agua ultrapura antes del posterior análisis por ICPMS (dilución 1:10). La ultrafiltración únicamente se llevó a cabo en las muestras expuestas a sustrato con plata (S1-110, S1-111, S2-110, S2-111).

- Detección de partículas individuales (SP-ICPMS)

Trabajando en este modo, la velocidad de adquisición de datos con instrumentos estándar de ICPMS está limitada por la sobrecarga del buffer de datos. Para evitarlo, se midió a un tiempo de lectura de 5 ms y se usó un tiempo de asentamiento de 3 ms que permitiera vaciar ese buffer de datos [64]. Las muestras fueron diluidas 1:1000 con agua ultrapura y sonicadas antes de su análisis.

- AF4-ICPMS

En la Tabla 1.2.2 se resumen los programas empleados para llevar a cabo la separación. El programa A fue empleado para la separación de nanopartículas de plata; mientras que el programa B se utilizó para la separación de posibles macromoléculas presentes en las muestras. Se usó un volumen de inyección de 100 μ L. Las muestras fueron inyectadas directamente en el sistema de AF4 sin dilución previa.

El espaciador utilizado tenía 350 μ m de espesor. Como pared de acumulación se utilizaron membranas de ultrafiltración de poliétersulfona (PES) con un tamaño de poro de 5 kDa (Postnova Analytics).

La caracterización de tamaños de las nanopartículas de plata se hizo calibrando el sistema AF4 frente a estándares de AgNP con tamaños de 10 a 40 nm. La relación lineal entre el logaritmo del factor de retención R ($R = t_0/t_r$) y el

logaritmo del diámetro (d) en nanómetros encontrada experimentalmente para el programa A fue: $\log R = -0,2773 \log d + 0,1730$ ($r^2 = 0,9963$).

El portador se dirigió desde el canal de separación hasta un detector UV-Vis de diodos (Shimadzu, Duisburg, Alemania) que recogió la señal entre 200 y 650 nm; y hasta el espectrómetro ICPMS colocado en línea.

Tabla 1.2.2. Programas de inyección y de flujo cruzado utilizados para las medidas de AF4 con un flujo a la salida del canal de 1,0 mL min⁻¹.

Etapa del programa	Tiempo /min	Flujo cruzado	
		Modo	mL min ⁻¹
Programa A: separación de nanopartículas de plata			
Inyección/focalización	5	(Flujo de inyección, 0,2 mL min ⁻¹)	1
Separación	8	Constante	0,325
	1	Caída lineal	0,325 a 0
	2	Constante	0
Programa B: separación de macromoléculas			
Inyección/focalización	5	(Flujo de inyección, 0,2 mL min ⁻¹)	2
Separación	25	Constante	2
	2	Caída lineal	2 a 0
	6	Constante	0

1.2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.2.3.1. Determinación de plata total y de plata (I) liberadas

Teniendo en cuenta que el medio de cultivo de los ensayos ecotoxicológicos es MOPS, y que este compuesto no interacciona de modo apreciable con la plata, el planteamiento de partida consistió en llevar a cabo el fraccionamiento de la plata liberada a partir de los sustratos objeto de estudio mediante ultrafiltración. Mediante este procedimiento, la plata presente en los medios de cultivo se fracciona en especies mayores y menores de 3 kDa (ca. 2 nm), de manera que la plata determinada en los ultrafiltrados se correspondería a plata disuelta en forma

de plata (I) (plata iónica o formado complejos menores de 3 kDa), mientras que la diferencia entre la plata total y esta plata ultrafiltrada se asociaría a formas nanoparticuladas de plata.

La determinación de la plata total y de plata disuelta liberadas se llevó a cabo por medida directa en ICPMS. Tanto la plata disuelta como las nanopartículas de plata se comportan en el ICPMS de manera similar [64].

En la Tabla 1.2.3. se muestran los resultados obtenidos en la cuantificación de las muestras. En la Figura 1.2.4. se muestra el porcentaje de plata ultrafiltrada respecto a la cantidad total de plata liberada en el medio de cultivo.

Tabla 1.2.3. *Concentración de plata total y ultrafiltrada (asimilada a plata iónica) liberada en el medio de cultivo. Media \pm desviación estándar*

Muestra	sustrato	Ag	algas	Fracción de plata	Concentración de plata / $\mu\text{g L}^{-1}$
CONTROLES					
C1-000	no	no	no	Total	0,02 \pm 0,02
C2-000	no	no	no	Total	0,17 \pm 0,02
C3-001	no	no	sí	Total	0,35 \pm 0,03
C4-001	no	no	sí	Total	0,25 \pm 0,04
C5-100	sí	no	no	Total	0,35 \pm 0,03
C6-101	sí	no	sí	Total	0,06 \pm 0,03
SUSTRATOS CON PLATA					
S1-110	sí	sí	no	Total	28,35 \pm 1,93
				Ultrafiltrada	22,44 \pm 1,83
S1-111	sí	sí	sí	Total	17,30 \pm 0,17
				Ultrafiltrada	5,72 \pm 0,08
S2-110	sí	sí	no	Total	37,30 \pm 1,57
				Ultrafiltrada	25,02 \pm 1,93
S2-111	sí	sí	sí	Total	17,55 \pm 0,18
				Ultrafiltrada	8,53 \pm 0,43

Las muestras control correspondientes a los medios sin sustrato silíceo y a los medios con sustrato silíceo sin plata (sólo SiO_2) mostraron concentraciones de plata por debajo de 0,35 $\mu\text{g L}^{-1}$. Los medios de cultivo relacionados a sustratos con

plata no expuestos a algas (S1-110 y S2-110) mostraron una mayor concentración de plata total que aquéllos expuestos a algas (S1-111 y S2-111). Estos resultados sugieren que parte de la plata liberada puede estar asociada a las algas.

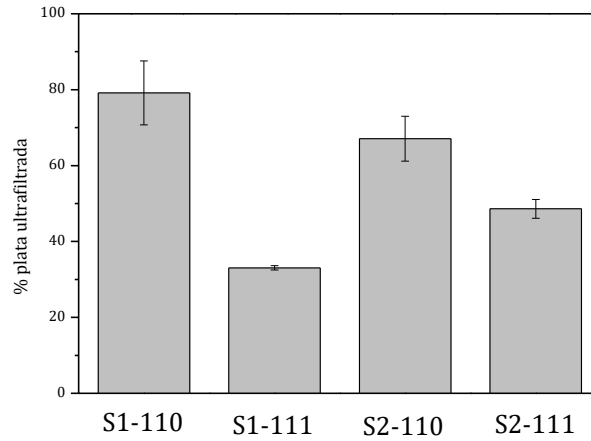


Figura 1.2.4. Porcentaje de plata ultrafiltrada (asimilada a plata iónica) respecto a la cantidad de plata total liberada en el medio de cultivo.

En cuanto a la plata encontrada en la fracción ultrafiltrada, la cantidad de plata (I) liberada en los medios de cultivo correspondientes a sustratos con plata no expuestos a algas (S1-110 y S2-110), se sitúa respectivamente en un $79 \pm 8 \%$ y un $67 \pm 6 \%$, sobre la cantidad de plata total en la muestra (Figura 1.2.4.); mientras que en los medios de cultivo correspondientes a esos mismos sustratos con plata expuestos a algas (S1-111 y S2-111) este porcentaje quedó reducido hasta el $33 \pm 1 \%$ y $49 \pm 3 \%$, respectivamente. En los medios de cultivo correspondientes a sustratos no expuestos a algas, la plata ultrafiltrada estaría presente como plata iónica, mientras que en los medios de cultivo correspondientes a sustratos expuestos a algas, la plata iónica puede estar formando complejos con sustancias poliméricas extracelulares (EPS) exudadas desde las algas [98,110], con un rango de masas moleculares tanto mayores como menores a 3 kDa.

1.2.3.2. Detección de nanopartículas de plata mediante SP-ICPMS

Para detectar la presencia de nanopartículas a través de SP-ICPMS, se introdujeron las muestras S1 y S2 tanto en presencia (muestras 111) como en ausencia (muestras 110) de algas en el sistema ICPMS.

En este caso, debido al pequeño tamaño de las nanopartículas liberadas desde los sustratos (< 20 nm) y la presencia de plata disuelta, el análisis de las muestras a través de esta técnica no proporcionó resultados de utilidad.

En la Figura 1.2.5. se muestran los barridos de tiempo obtenidos para estos casos. En ellos se observa la presencia de pulsos aislados, correspondientes a nanopartículas de plata relativamente grandes, que sólo permiten constatar la presencia de nanopartículas de plata en las muestras.

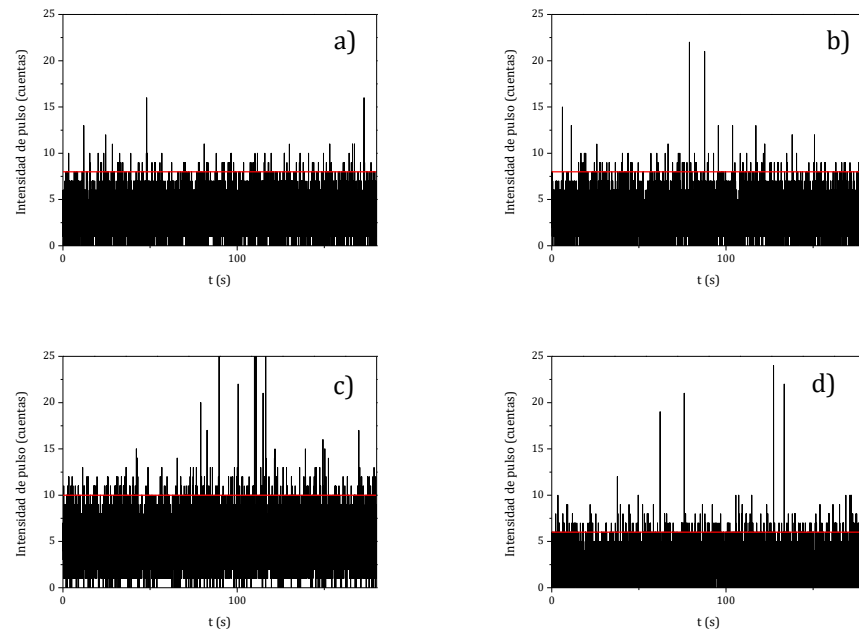


Figura 1.2.5. Barridos de tiempo monitorizando isótopo ^{107}Ag en SP-ICPMS para las muestras (a) S1-110, (b) S1-111, (c) S2-110, (d) S2-111.

1.2.3.3. Detección y caracterización de nanopartículas de plata liberadas en la disolución mediante AF4-UV-Vis-ICPMS

Las muestras fueron inyectadas directamente en el sistema AF4-ICPMS para la detección y caracterización de las posibles nanopartículas de plata liberadas

y presentes en el medio. Se empleó también la detección UV-Vis para monitorizar la presencia de nanopartículas de plata, basada en la absorción a una longitud de onda en torno a 400 nm característica del efecto plasmón de las nanopartículas, y de materia orgánica, con una absorción a longitudes de onda menores a 300 nm.

- *Medios de cultivo expuestos a sustratos síliceos con plata en ausencia de algas (S1-110 y S2-110)*

El programa de separación aplicado se corresponde con el recogido en la Tabla 1.2.2. para la separación de nanopartículas de plata (programa A).

Los resultados obtenidos de la determinación de la cantidad de plata total y ultrafiltrada (Apartado 1.2.3.1.) indicaban que la plata estaba presente en sus formas disuelta y particulada.

En la Figura 1.2.6. se muestra el fractograma correspondiente a la muestra S1-110.

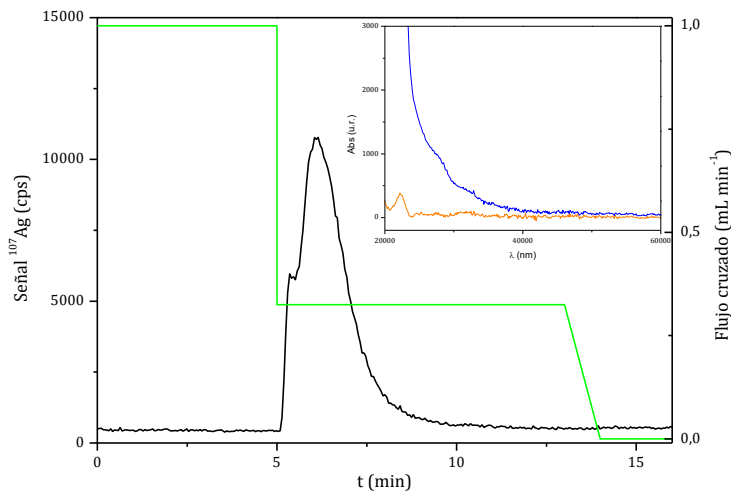


Figura 1.2.6. Fractograma de la muestra S1-110. En la parte superior de la figura, se muestra el espectro UV-Vis de la muestra S1-110 recogido a 5,3 y 6,04 min, azul y naranja respectivamente. Verde flujo cruzado aplicado.

Se observan dos picos diferentes, no resueltos, a 5,30 y 6,04 min. El primero (a 5,30 min) es el correspondiente al tiempo muerto, que corresponde a especies no retenidas o no focalizadas correctamente en el canal. El pico a 6,04 min se relaciona con nanopartículas de plata liberadas desde el sustrato. Debido a la

baja concentración de nanopartículas (en torno a $6 \mu\text{g Ag L}^{-1}$) la señal de absorción a una longitud de onda de 400 nm no fue significativa, lo cual no permitió confirmar la identidad de las nanopartículas. La calibración frente a estándares de tamaño de nanopartículas de plata dieron para estas nanopartículas un tamaño estimado en el máximo de $6,6 \pm 0,5 \text{ nm}$, lo cual estaría de acuerdo con los tamaños anteriormente observados en las imágenes TEM (Figura 1.2.3.)

La Figura 1.2.7. muestra el fractograma de plata obtenido para la muestra S2-110. De manera similar al fractograma de la muestra S1-110, se obtuvo un pico eluido a los 6,70 min, no resuelto del pico a tiempo muerto de 5,30 min. La calibración frente a estándares de tamaño de nanopartículas de plata dieron para estas nanopartículas un tamaño estimado en el máximo de $9,2 \pm 0,3 \text{ nm}$.

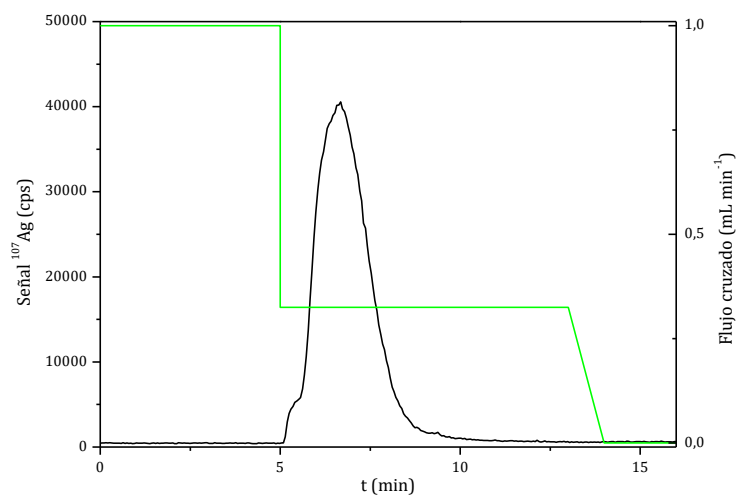


Figura 1.2.7. Fractograma de la muestra S2-110. Verde flujo cruzado aplicado.

- *Medios de cultivo expuestos a sustratos silíceos con plata en presencia de algas (S1-111 y S2-111)*

El programa de separación aplicado se corresponde con el recogido en la Tabla 1.2.2. para la separación de nanopartículas de plata (programa A). Los resultados obtenidos de la determinación de la cantidad de plata total y ultrafiltrada (Apartado 1.2.3.1.) sugerían que la plata podría estar presente como plata (I) complejada en el medio por macromoléculas mayores de 3 kDa procedentes de las algas.

La Figura 1.2.8. muestra el fractograma correspondiente a la muestra S1-111 y comparado con la muestra S1-110. En la muestra S1-111 se observa un pico a tiempos ligeramente más cortos que en la muestra S1-110 (5,90 y 6,04 min, respectivamente). Este pico se puede corresponder con nanopartículas de plata, como en la muestra S1-110, pero también a complejos de plata mayores de 5 kDa (tamaño de corte de la membrana de ultrafiltración usada en el canal de AF4). En la Figura 1.2.8. se muestran también los espectros UV-Vis a 5,30 min (tiempo muerto) y 5,90 min para la muestra S1-111. Éstos revelan un pequeño hombro a 256 nm (que no se observó en la muestra S1-110), más pronunciado a 5,30 min, lo cual sugiere la presencia de compuestos orgánicos (exudados de sustancias poliméricas extracelulares provenientes de las algas). De nuevo no se observó ninguna banda a $\lambda = 400$ nm, por lo que la presencia de nanopartículas de plata no pudo ser confirmada.

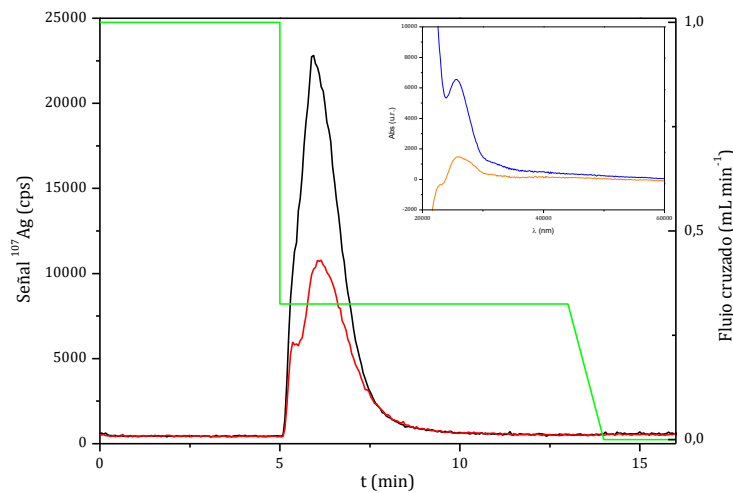


Figura 1.2.8. Fractogramas de la muestra S1-111 (negro) y S1-110 (rojo). En la parte superior de la figura, se muestra el espectro UV-Vis de la muestra S1-111 recogido a 5,30 y 5,90 min, azul y naranja, respectivamente. Verde flujo cruzado aplicado.

Para tratar de esclarecer la naturaleza de la señal de plata obtenida en la muestra S1-111, se hizo una adición de plata (I) y de AgNPs a la muestra C4-001 (control medio de cultivo sin sustrato silíceo y expuesto a algas). En la Figura 1.2.9. se muestran los fractogramas obtenidos.

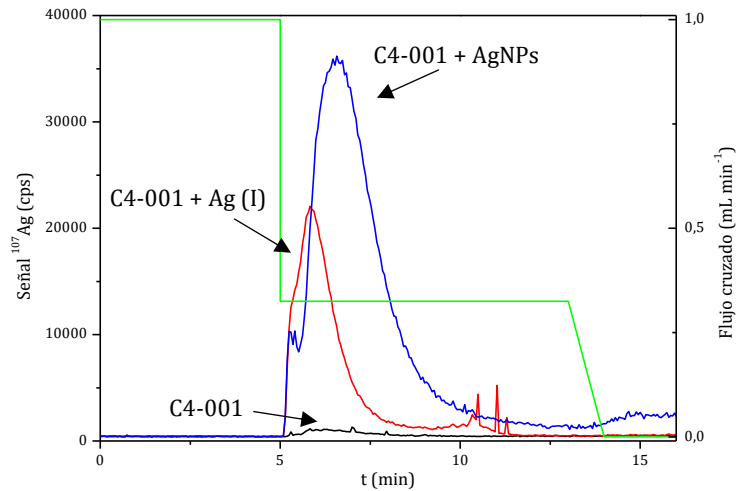


Figura 1.2.9. Fractogramas de la muestra control C4-001 (negro) y de esa misma muestra tras la adición de $51 \mu\text{g L}^{-1}$ de plata (I) (rojo) y de $47 \mu\text{g L}^{-1}$ de AgNPs de 10 nm (azul). Verde flujo cruzado aplicado.

La adición de plata (I) da un pico a 5,80 min que se parece al pico observado a 5,90 min en la muestra S1-111. En el fractograma correspondiente a la adición de AgNPs de 10 nm se obtuvo un pico a 6,57 min. De acuerdo a estos resultados, únicamente se puede afirmar que en la muestra S1-111 la plata se puede encontrar como pequeñas nanopartículas (de 5-6 nm, pero no mayores de 10 nm) y/o como complejos de Ag (I) con macromoléculas.

En la Figura 1.2.10. se muestran los fractogramas correspondientes a las muestras S2-111 y S2-110, así como los correspondientes espectros a 5,30 min (tiempo muerto) y a 5,70 min de la muestra S2-111. Al igual que en el caso anterior, únicamente se observó un pico a los 5,70 min. Asimismo, el espectro UV-Vis muestra un pequeño hombro a 256 nm relacionado con la presencia de materia orgánica. La comparación entre los fractogramas de las muestras S2-111 y S2-110 refleja una mayor diferencia en los máximos de los picos que la que se encontraba entre las muestras S1-111 y S1-110. En este caso, y dado el mayor tamaño estimado anteriormente para las nanopartículas de plata liberadas desde la muestra S2-110, parece más probable que la plata de la muestra S2-111 estuviera presente como complejos de plata (I) con macromoléculas. En cualquier caso, la presencia de nanopartículas de plata en la muestra S2-111 no puede ser descartada, ya que la

resolución conseguida bajo las condiciones de separación utilizadas no fue suficiente.

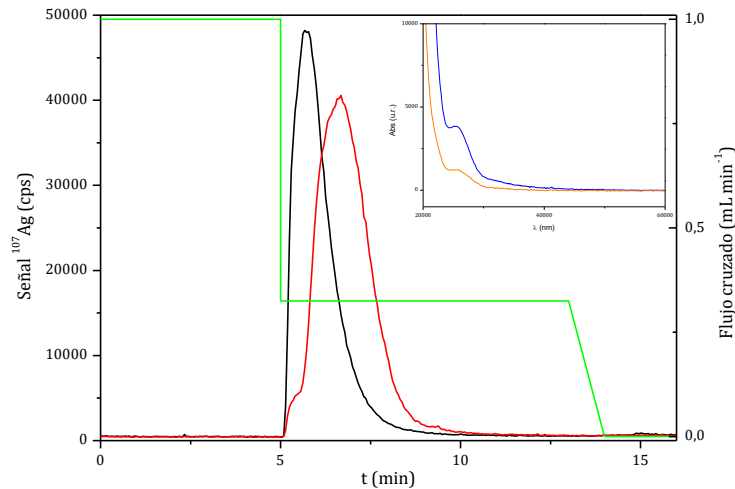


Figura 1.2.10. Fractogramas de la muestra S2-111 (negro) y S2-110 (rojo). En la parte superior de la figura, se muestra el espectro UV-Vis de la muestra S2-111 recogido a 5,30 y 5,70 min, azul y naranja respectivamente. Verde flujo cruzado aplicado.

- Medio de cultivo expuesto a sustrato síliceo sin plata y expuesto a algas (C6-101)

El programa de separación aplicado se corresponde con el recogido en la Tabla 1.2.2. para la separación de macromoléculas (programa B). En este caso se trata de eluir la muestra aplicando un flujo cruzado mayor (2 mL min^{-1}) al utilizado hasta ahora ($0,325 \text{ mL min}^{-1}$). El objetivo es intentar separar la posible plata asociada a EPS o a macromoléculas presentes en la muestra.

En la Figura 1.2.11. se muestran los fractogramas obtenidos para la muestra control de medio de cultivo expuesto a sustrato síliceo sin plata y expuesto a algas (C6-101) y para esta misma muestra con adiciones de plata (I) y AgNPs de 10 nm. Como es de esperar, los tiempos de retención obtenidos en este caso aumentan respecto a los que se obtenían al aplicar un flujo cruzado menor (Figura 1.2.9.) ya que caudales elevados conllevan tiempos de retención mayores. En el caso de la muestra C6-101 la señal obtenida es del orden de la señal de blanco del portador empleado. Para la muestra C6-101 con adición de plata (I) el máximo de la señal aparece a un tiempo de 7,30 min; mientras que con adición de AgNPs este

tiempo aumenta hasta los 10,38 min, lo que implica una diferencia de casi 3 min en los tiempos de elución de la adición de plata (I) respecto a la de AgNPs. Además, para el caso de la muestra con adición de plata (I) se observa un segundo pico no resuelto a los 10,65 min, es decir, prácticamente al mismo tiempo que las AgNPs de 10 nm. Lo lógico sería pensar que este pico es debido a una acumulación de AgNPs en la membrana durante las medidas. Sin embargo, esta muestra fue inyectada antes de la muestra con nanopartículas y después de una inyección de fase móvil y de muestra sin adición, fractogramas en los cuales no se observó esta señal; por lo que podría tratarse de complejos de plata (I) con especies liberadas desde las algas.

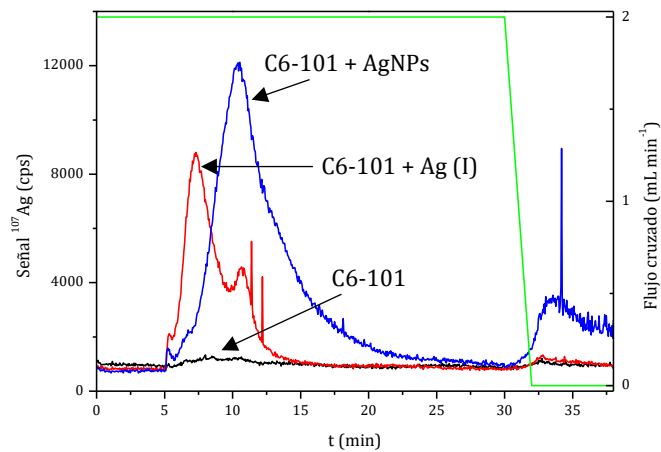


Figura 1.2.11. Fractogramas de la muestra control C6-101 (negro) y de esa misma muestra tras la adición de $57 \mu\text{g L}^{-1}$ de plata (I) (rojo) y de $57 \mu\text{g L}^{-1}$ de AgNPs de 10 nm (azul). Verde flujo cruzado aplicado.

Por lo tanto de este ensayo se puede concluir que, mediante la aplicación de diferentes programas de separación en AF4, es posible llevar a cabo una diferenciación entre complejos de plata (I) asociados a macromoléculas y nanopartículas de plata a partir de los 10 nm, confirmando así la presencia de complejos de plata (I) con EPS exudados de las algas.

1.2.4. CONCLUSIONES

La aplicación de la plataforma metodológica UF-ICPMS/SP-ICPMS/AF4-ICPMS al estudio de la liberación de plata a partir de *nanocomposites* de sílice y nanopartículas de plata en el medio de cultivo utilizado en ensayos ecotoxicológicos con algas *Chlamydomonas reinhardtii* ha permitido:

- Detectar la liberación de la plata a partir del *nanocomposite* tanto en forma de nanopartículas como de plata (I) (SP-ICPMS).
- Cuantificar el porcentaje de plata liberada en forma de nanopartículas, que se situó entre el 20 y el 30 % (UF-ICPMS).
- Determinar el tamaño de las nanopartículas entre 6-9 nm (AF4-ICPMS).

Por otro lado, en presencia de las algas *Chlamydomonas reinhardtii* se ha comprobado que:

- La plata (I) se encuentra asociada a especies macromoleculares, muy probablemente sustancias poliméricas extracelulares provenientes de las algas (AF4-ICPMS).
- La presencia de sustancias poliméricas extracelulares contribuye a la oxidación de las nanopartículas liberadas, no pudiendo confirmarse la existencia de nanopartículas en el medio de cultivo en presencia de algas (AF4-ICPMS).
- Parte de la plata liberada del *nanocomposite* es retenida por las algas (ICPMS).

Desde el punto de vista metodológico se ha comprobado que:

- El fraccionamiento entre plata (I) y plata en forma de nanopartículas mediante ultrafiltración no es operativo cuando la plata (I) forma complejos con especies macromoleculares, lo que impide obtener información correcta sobre las formas de plata liberada e invalidando el uso de la ultrafiltración cuando estas especies son mayores al corte de la membrana de ultrafiltración utilizada.
- La presencia de cantidades significativas de plata disuelta, bien sea en forma iónica o formando complejos, junto con la presencia de

nanopartículas con tamaños promedio por debajo de los 20 nm, limita la técnica SP-ICPMS a su uso como técnica de *screening* para detectar la presencia de nanopartículas.

- El uso de distintos programas de separación en AF4, seleccionando los flujos cruzados adecuados, permite llevar a cabo la diferenciación entre complejos de plata (I) asociados a macromoléculas y nanopartículas de plata a partir de los 10 nm (para tamaños de nanopartículas inferiores hay cierto solapamiento de los tiempos de elución).

1.3. LIBERACIÓN DE PLATA A PARTIR DE ARCILLAS RECUBIERTAS CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA

1.3.1. INTRODUCCIÓN

Las arcillas son elementos estructurales del suelo que se utilizan desde hace muchos años como minerales industriales, con multitud de aplicaciones según sus propiedades [111]. Dentro de la literatura existe cierta confusión entre los términos “mineral de arcilla” y “arcilla”. El primero es un término mineralógico que se refiere a parte de una familia: los filosilicatos. Se trata de aluminosilicatos hidratados que contienen cantidades considerables de Mg, K, Ca, Na y Fe, y ocasionalmente, Ti, Mn o Li. Se clasifican según su estructura y composición, de las cuales dependen sus propiedades físicas y químicas. Los más utilizados industrialmente son: caolinitas, esmectitas y sepiolitas [112]. Por su parte, el término “arcilla”, frecuentemente utilizado en el mismo sentido que el anterior, hace referencia a materiales naturales compuestos de minerales de grano fino, con cierta plasticidad al mezclarse con agua y que se endurecen al secarse. Es aplicable a partículas de pequeño tamaño, normalmente $< 2 \mu\text{m}$, encontradas en suelos, sedimentos o como productos de alteraciones de rocas. En su composición incluyen, además de los filosilicatos mencionados anteriormente, menores cantidades de otros minerales y/o productos orgánicos como cuarzo, feldespatos, carbonatos, sulfatos, óxidos de Fe y/o de Al, hummus, etc. [113] Las arcillas tienen una alta capacidad de sorción de metales debido entre otras características a su estabilidad física y química, su elevada área superficial y su capacidad de intercambio catiónico [114–116]. Tanto las arcillas como los minerales de arcilla son materiales abundantes, económicos y respetuosos con el medio ambiente, lo que les convierte en un mineral muy importante para la industria. Es por todo ello que las arcillas se utilizan en procesos industriales, aplicaciones agrícolas, de ingeniería y construcción, en descontaminación ambiental, en geología y en muchas otras aplicaciones [117]. La exposición de la población a bajas concentraciones de arcillas es constante, aunque generalmente estos productos se consideran no tóxicos. Como muchos otros materiales en polvo, las arcillas pueden ocasionar irritación en los ojos tras su contacto e irritación en la membrana mucosa y respiratoria tras su inhalación. Además, cuando entran en contacto con la piel

pueden causar sequedad, y la ingesta de grandes cantidades puede producir irritación gastrointestinal. Por otra parte, la exposición a largo plazo, como es el caso de los trabajadores de la minería y del procesado de arcillas, puede ocasionar neumoconiosis. Estos riesgos únicamente existen cuando los niveles de exposición son significativamente elevados [113,118]. Actualmente, el uso de diversas arcillas en la industria alimentaria es una realidad para la mejora de envases de alimentos [119,120], por lo que la evaluación toxicológica de estos nanocompuestos resulta de gran importancia e interés [118]. En la actualidad, donde muchas bacterias han desarrollado resistencia a los antibióticos, la investigación de alternativas antibacterianas naturales es de suma importancia. Las arcillas naturales se han empleado a lo largo de la historia como remedios curativos, pero sus propiedades medicinales no han sido ampliamente reconocidas científicamente [121]. Diversos procesos físicos y/o químicos pueden proporcionar a las arcillas propiedades antibacterianas. Por una parte, esta acción bactericida puede tener lugar por una atracción superficial entre las arcillas y las bacterias, lo cual puede obstaculizar la absorción de nutrientes y perturbar las membranas celulares [122]. El uso de las arcillas en tratamientos biomédicos se basa en la capacidad de éstas para adsorber y retener sustancias tóxicas y dañinas. La incorporación de plata en arcillas ha sido ampliamente desarrollada debido en gran medida a las propiedades bactericidas de la plata [123–132]. Los composites formados por minerales arcillosos y nanopartículas de plata poseen una alta actividad antibacteriana, la cual se basa principalmente en la buena actividad antibacteriana de ambos componentes.

El objetivo principal de este apartado se centra en la detección, caracterización y cuantificación de especies de plata liberadas desde arcillas recubiertas con nanopartículas de plata, materiales fabricados para su uso experimental en procesos de vinificación y como aditivos en alimentación animal. Frente a los materiales estudiados en los capítulos 1.1 y 1.2, donde las nanopartículas de plata están depositadas en la superficie o embebidas en el seno de soportes macroscópicos, en este caso las nanopartículas se encuentran depositadas sobre partículas micrométricas. El objetivo principal se complementa con la caracterización de los materiales mediante técnicas de microscopía electrónica.

1.3.2. EXPERIMENTAL

Instrumentación

Para la detección y determinación del contenido de plata se empleó un espectrómetro ICPMS ELAN DRC-e (Perkin Elmer, Toronto, Canadá) equipado con un nebulizador concéntrico de vidrio y una cámara de nebulización ciclónica. Este mismo equipo se empleó en modo de detección de partículas individuales para las medidas de SP-ICPMS. Asimismo, se usó un espectrómetro de Absorción Atómica con Llama (F-AAS) AAnalyst 200 (Perkin Elmer, Waltham, EE.UU.) para la determinación de la cantidad de plata presente en las arcillas.

Se utilizó un equipo de Fraccionamiento en Flujo mediante Campo de Flujo Asimétrico (AF4) AF2000 (Postnova Analytics, Landsberg, Alemania).

Para las imágenes obtenidas a través de Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (FESEM) se empleó un Carl Zeiss MERLIN™ (Nano Technology Systems, Jena, Alemania). El microscopio estaba además equipado con un sistema de dispersión de energía de rayos X (EDX) INCA 350 (Oxford Instruments, Abingdon, Reino Unido) para el análisis elemental y la localización de elementos en las muestras. Antes del análisis FESEM-EDX, las muestras fueron recubiertas con una capa de carbono para mejorar su conductividad.

Para la obtención de imágenes mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) se empleó un microscopio JEOL JEM1010 (Jeol, Tokio, Japón). Las imágenes se adquirieron utilizando una cámara GATAN BIOSCAN CCD.

Para el análisis de tamaños de partículas mediante dispersión de luz dinámica (DLS) se utilizó un equipo Brookhaven 90Plus PCS (Brookhaven Instrument, Holtsville, EE.UU.). La función de correlación se ajustó para permitir distribuciones multimodales [opción Multimodal Size Distribution analysis (MSD) del software].

Reactivos y estándares

El portador empleado en las separaciones mediante AF4 fue una disolución de dodecilsulfato sódico (SDS) (BioRad, California, EE.UU.) 0,01 % (m/V) preparada en agua ultrapura (Milli-Q Advantage, Molsheim, Francia) y ajustada a pH = 8. Para su filtración se utilizaron filtros de membrana de nylon con tamaño de poro de 0,2

μm (Millipore, Billerica, EE.UU.). Este portador fue desgasificado mediante un desgasificador a vacío colocado en línea antes de las bombas.

Las disoluciones de plata (I) se prepararon a partir de una disolución estándar de 1000 mg L^{-1} (Panreac, Barcelona, España). Por su parte, las suspensiones de nanopartículas de plata se prepararon a partir de estándares comerciales con diámetros nominales de 10 nm (PlasmaChem, Berlín, Alemania) y $20 \pm 3 \text{ nm}$ (nanoComposix, St. Diego, EE.UU.).

Tanto en la determinación total mediante ICPMS, como en el acoplamiento AF4-ICPMS se utilizó una disolución de estándar interno de Rh y Cs de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ en HNO_3 1% (v/v) (Baker Instra Analyzed for Trace Metals Analysis, J.T. Baker, Holanda).

Para los ataques ácidos llevados a cabo se empleó HNO_3 concentrado (Baker Instra Analyzed for Trace Metals Analysis, J.T. Baker, Holanda).

Todas las disoluciones y suspensiones se prepararon por pesada en una balanza analítica GH-200 (A&D, California, EE.UU.) con una precisión de $\pm 0,1 \text{ mg}$. Las suspensiones fueron sonicadas (Ultrasons-P, Selecta, Barcelona, España) durante 1 min justo antes de cada medida.

Muestras

Las muestras objeto de estudio fueron proporcionadas por Laboratorios Enosán, S.L.

- Caolín Plateado Coloidal (caolín-Ag)

El producto utilizado (caolín-Ag) es un fino polvo de color gris consistente en partículas de caolín sobre las que se han depositado nanopartículas de plata siguiendo un procedimiento patentado. El caolín es una roca rica en caolinita que es un mineral del grupo de los filosilicatos cuya composición química se corresponde con $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$. En la Figura 1.3.1. se muestra la estructura laminar de la caolinita, que cuenta con una capa octaédrica de aluminio y otra tetraédrica de silicio. En la Figura 1.3.2. se muestran imágenes obtenidas a través de FESEM para este material. En ellas, además de observarse de manera clara la estructura laminar de la caolinita, se detectaron nanopartículas esferoidales con diámetros medios de 30 nm sobre la superficie de las láminas. A través de la dispersión de rayos X se confirmó que esas nanopartículas eran de plata. El análisis mediante rayos X mostró que la composición química de las láminas consistía en Al, Si y O, tal y como

se esperaba, mientras que las áreas que contenían nanopartículas incluían Ag. La presencia de C en los análisis fue debida al recubrimiento empleado en las muestras para mejorar su conductividad.

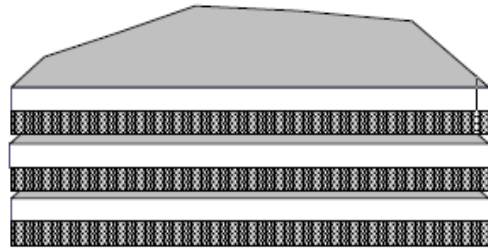


Figura 1.3.1. Estructura laminar de la caolinita [111].

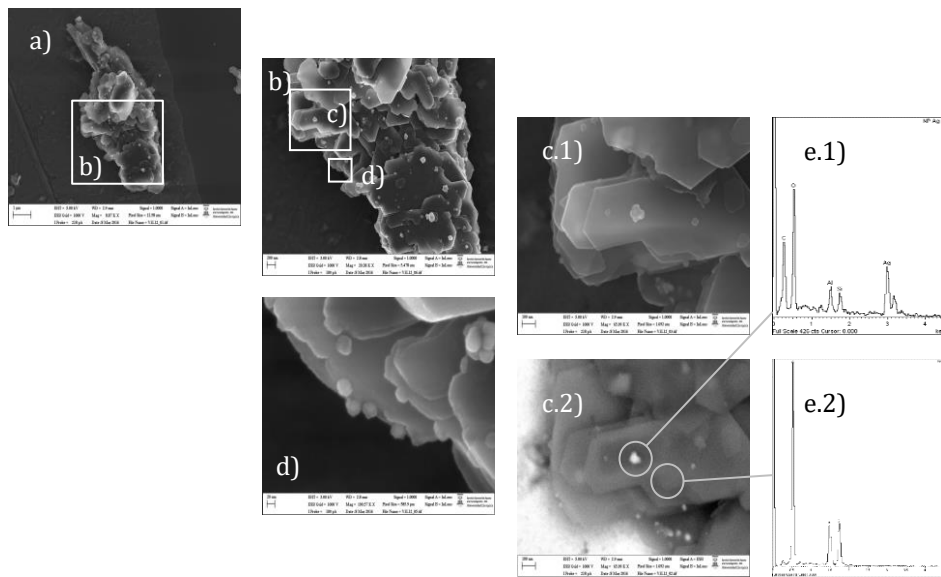


Figura 1.3.2. (a) Micropartícula de caolín-Ag con AgNPs en la superficie (x8870). (b) Aumento de la zona inferior remarcada en (a) (x20380). (c) Aumento de la zona remarcada en (b) donde se observan AgNPs en la superficie de las láminas del caolín (x66000). (d) Aumento de la zona remarcada en (b) donde se observan AgNPs en los bordes de las láminas del caolín (x190570). (e) Espectros EDX de las zonas que contienen (e.1) y que no contienen (e.2) AgNPs. La plata se encontró como nanopartículas esféricas (d, c.1), o como puntos blancos cuando se utilizaba la difracción de electrones retrodispersados (c.2).

De acuerdo con las especificaciones del producto dadas por el fabricante, el caolín-Ag utilizado contiene un 1 % (m/m) de plata. La determinación del contenido de plata total después del ataque ácido del caolín-Ag y medida mediante F-AAS dio un contenido de $1,07 \pm 0,06$ % (m/m).

- Sepiolita Plateada (sepiolita-Ag)

El producto utilizado (sepiolita-Ag) es un fino polvo de color amarillento compuesto de partículas de sepiolita sobre las que se han depositado nanopartículas de plata siguiendo un procedimiento patentado. La sepiolita es un mineral del grupo de los filosilicatos cuya composición química se corresponde con $Mg_4Si_6O_{15}(OH)_2 \cdot 6H_2O$. En la Figura 1.3.3. se muestra la estructura pseudolaminar de la sepiolita, con una disposición en tres capas que cuenta con una capa octaédrica de magnesio y dos capas tetraédricas de silicio. Esta estructura pseudolaminar es la responsable de que se formen los canales que confieren a la sepiolita su característica estructura porosa y su elevada superficie específica. En la Figura 1.3.4. se muestran imágenes obtenidas a través de FESEM para este material. En ellas, además de observarse la estructura fibrosa de la sepiolita, se detectaron nanopartículas esféricas con diámetros medios de 25 nm. A través de la dispersión de rayos X se confirmó que esas nanopartículas eran de plata. El análisis mediante rayos X mostró que la composición química del material consistía, tal y como se esperaba, en Mg, Si y O, pero además se detectó la presencia de Al; por su parte, las áreas que contenían nanopartículas incluían Ag. De nuevo, la presencia de C en los análisis fue debida al recubrimiento empleado en las muestras para mejorar su conductividad. Debido a su elevada porosidad, la sepiolita presenta una densidad mucho menor que la caolinita, junto con una mayor área superficial y capacidad de intercambio catiónico.

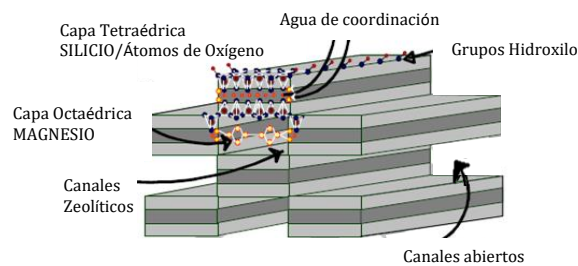


Figura 1.3.3. Estructura pseudolaminar de la sepiolita [111].

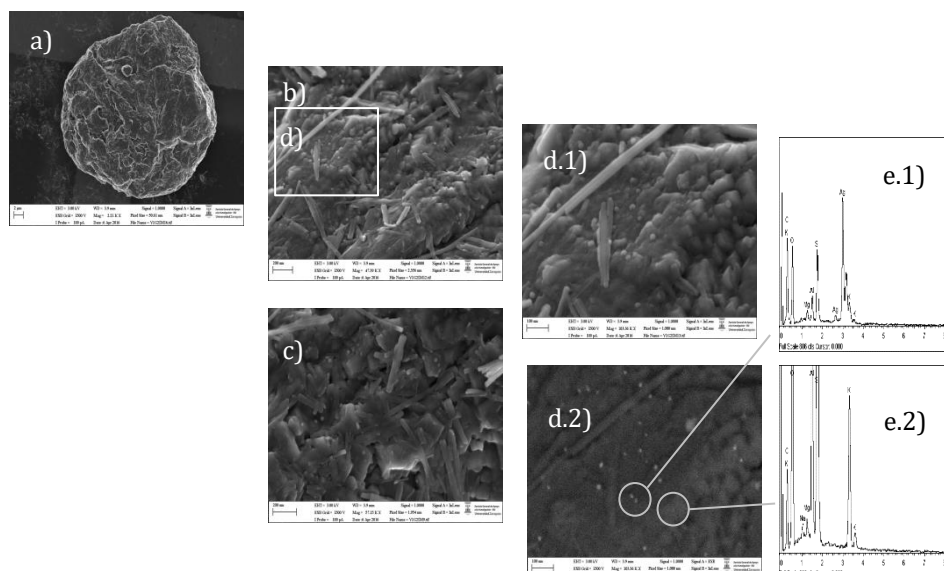


Figura 1.3.4. (a) Micropartícula de sepiolita-Ag con AgNPs en la superficie (x2210). (b) Superficie de micropartícula de sepiolita (x47390). (c) Superficie de micropartícula de sepiolita (x57150). (d) Aumento de la zona remarcada en (b) (x103360). (e) Espectros EDX de las zonas que contienen (e.1) y que no contienen (e.2) AgNPs. La plata se encontró como nanopartículas esféricas (b, c, d.1), o como puntos blancos cuando se utilizaba la difracción de electrones retrodispersados (d.2).

La determinación del contenido de plata total después del ataque ácido de la sepiolita-Ag y medida mediante F-AAS dio un contenido de $0,56 \pm 0,02$ % (m/m).

Procedimientos

- Ataque ácido del caolín-Ag y de la sepiolita-Ag

Para la determinación del contenido de plata total presente en las arcillas las muestras se sometieron a un ataque con ácido nítrico. Se tomaron en torno a 100 mg de cada una de las muestras, añadiendo HNO_3 (1:1) y calentando hasta sequedad. El residuo se resuspendió en HNO_3 10 %, centrifugándose durante 10 min a 3000 rpm, para separar las partículas de arcilla, que se sometieron a un lavado con HNO_3 10 %. Los sobrenadantes de la separación y el lavado se llevaron a un volumen final de 50 mL, de manera que se consiga un medio HNO_3 10 %. Antes de la medida de las muestras mediante F-AAS se hizo una dilución 1:10.

- Experimentos de liberación en agua ultrapura con caolín-Ag y sepiolita-Ag

Para realizar los experimentos de liberación se tomaron 125 mg de caolín-Ag o de sepiolita-Ag en cada caso y se pusieron en contacto con 50 mL de agua ultrapura ($2,5 \text{ g L}^{-1}$), manteniéndose en agitación 24 horas a temperatura ambiente en ausencia de luz (agitador orbital analógico Reax 2; Heidolph, Schwabach, Alemania). Transcurrido este tiempo se tomaron 10 mL de las suspensiones y se centrifugaron a 1430 rpm para el caso del caolín-Ag y a 1808 rpm para la sepiolita-Ag, durante 10 min a 20°C . Las condiciones de centrifugación se fijaron, teniendo en cuenta la diferencia en la densidad de cada uno de los materiales (caolín-Ag: $2,6 \text{ g cm}^3$; sepiolita-Ag: $2,0 \text{ g cm}^3$), para eliminar partículas mayores a $0,5 \mu\text{m}$ y permitir mantener las posibles nanopartículas de plata liberadas en la fracción centrifugada (hasta 150 nm).

- Ultrafiltración

La separación de plata (I) de las nanopartículas de plata se realizó mediante ultrafiltración, utilizando ultrafiltros Nanosep (Pall, Ann Arbor, EE.UU.) con membrana de poliétersulfona de 3 kDa, que se puede asociar a un diámetro hidrodinámico de 2 nm. Las membranas de los ultrafiltros se lavaron dos veces mediante la centrifugación de 500 μL de agua ultrapura antes de la ultrafiltración de las muestras. Para la ultrafiltración los 500 μL se sometieron a 9000 rpm durante 20 min a 20°C en todos los casos. El ultrafiltrado del segundo lavado fue guardado y analizado por ICPMS como blanco del ultrafiltro para detectar la presencia de posibles contaminantes. En todos los casos se utilizó una centrífuga refrigerada Heraeus Multifuge X1R (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.) equipada con un rotor de ángulo fijo para tubos Eppendorf. Las fracciones centrifugadas anteriormente con un tamaño de partícula menor a $0,5 \mu\text{m}$ se sonicaron durante 1 min y se tomaron 500 μL para la ultrafiltración. Los ultrafiltrados (aproximadamente 500 μL) se diluyeron hasta 5 mL con agua ultrapura antes del posterior análisis por ICPMS.

- Detección de partículas individuales (SP-ICPMS)

Trabajando en este modo, la velocidad de adquisición de datos con instrumentos estándar de ICPMS está limitada por la sobrecarga del buffer de datos. Para evitarlo, se midió a un tiempo de lectura de 5 ms y se usó un tiempo de

asentamiento de 3 ms que permitiera vaciar ese buffer de datos[65]. Las muestras fueron diluidas con agua ultrapura y sonicadas antes de su análisis.

Se estudiaron las suspensiones liberadas por caolín-Ag y sepiolita-Ag tras 24 horas de agitación en agua ultrapura y posterior corte a tamaño de partícula inferior a 0,5 μm . Se realizó una dilución 1:10000 en ambos casos.

- AF4-ICPMS

En la Tabla 1.3.1. se resumen los programas empleados para llevar a cabo la separación. Se usó un volumen de inyección de 50 μL . Las muestras fueron inyectadas directamente en el sistema de AF4 sin dilución previa.

Tabla 1.3.1. Programa de inyección y de flujo cruzado utilizado para las medidas de AF4 con un flujo a la salida del detector de 1,0 mL min^{-1} .

Etapa del programa	Tiempo /min	Flujo cruzado	
		Modo	mL min^{-1}
Programa A: flujo cruzado bajo			
Inyección/focalización	5	(Flujo de inyección, 0,2 mL min^{-1})	1
Separación	25	Constante	0,325
	1	Caída lineal	0,325 a 0
	4	Constante	0
Programa B: flujo cruzado alto			
Inyección/focalización	5	(Flujo de inyección, 0,2 mL min^{-1})	4
Separación	5	Constante	2,5
	20	Caída lineal	2,5 a 0
	5	Constante	0

El espaciador utilizado tenía 350 μm de espesor. Como pared de acumulación se utilizaron membranas de ultrafiltración de poliétersulfona (PES) con un tamaño de poro de 5 kDa (Postnova Analytics).

El portador se dirigió desde el canal de separación hasta un detector UV-Vis de diodos (Shimadzu, Duisburg, Alemania) que recogió la señal entre 200 y 650 nm; y hasta el espectrómetro ICPMS colocado en línea.

1.3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.3.1. Determinación de la cantidad total de plata y de plata disuelta en ensayos de liberación con caolín-Ag y sepiolita-Ag

Con el objetivo de caracterizar los materiales utilizados posteriormente para el tratamiento de vinos y/o como aditivos en alimentación animal, se realizaron inicialmente una serie de ensayos de liberación en agua ultrapura, para estudiar la potencial liberación de plata desde el caolín-Ag y la sepiolita-Ag al medio durante su uso.

La determinación de la plata total y de plata disuelta liberada se determinó por medida directa a través de ICPMS. Tanto la plata disuelta como las nanopartículas de plata se comportan en el ICPMS de manera similar [64].

En la Tabla 1.3.2. se muestran los resultados obtenidos en la cuantificación de los ensayos de liberación con los dos tipos de arcillas plateadas empleadas en agua ultrapura. La fracción total se refiere a la cantidad de plata total liberada en los ensayos de caolín-Ag y de sepiolita-Ag tras 24 horas de agitación (especies disueltas y asociadas a partículas menores de 0,5 μm). La fracción ultrafiltrada hace referencia a la plata determinada en el ultrafiltrado, la cual estaría como Ag^+ en la disolución. Asimismo, se muestra el porcentaje de plata ultrafiltrada respecto a la cantidad total de plata liberada. La última columna hace referencia a la cantidad de plata liberada en el medio respecto a la cantidad de plata presente en el caolín-Ag o en la sepiolita-Ag, según el caso.

De los resultados obtenidos, se puede afirmar que la plata presente en el caolín-Ag y en la sepiolita-Ag tiende a ser liberada en disolución cuando se pone en contacto con agua, siendo esta liberación ligeramente superior para el caso de la sepiolita-Ag ($40 \pm 2 \%$ y $48 \pm 1 \%$ de la plata total en el caolín-Ag y la sepiolita-Ag, respectivamente). Además, en el caso del caolín-Ag esta plata se libera principalmente en forma de plata (I) en un elevado porcentaje ($91 \pm 5 \%$). Si la plata está presente en el caolín-Ag como nanopartículas, esto implica un proceso de oxidación de las mismas a plata (I). En el caso de la sepiolita-Ag, donde el

porcentaje de Ag⁺ se sitúa en un 53 ± 2 %, esta oxidación no es tan acusada, probablemente debido a la estructura del propio material. Por tanto, un porcentaje en torno al 9 % para el caolín-Ag y al 47 % para la sepiolita-Ag de la plata liberada está asociado a especies mayores de 3 kDa. Estas especies podrían corresponderse a plata en forma de nanopartículas de plata o asociadas a micropartículas de caolín/sepiolita-Ag menores de 0,5 µm. La mayor capacidad de intercambio catiónico de la sepiolita también podría justificar que parte de la plata iónica liberada quedase retenida en estas micropartículas menores de 0,5 µm.

Tabla 1.3.2. Cantidad de plata total y ultrafiltrada liberada desde el caolín-Ag y la sepiolita-Ag en agua ultrapura (24 horas).

	Fracción	Concentración de plata / mg L ⁻¹	% Ag UF. vs. total liberada	% Ag total liberada vs. total en el material
Caolín-Ag	Total	10,60 ± 0,51	91 ± 5	40 ± 2
	Ultrafiltrada	9,61 ± 0,19		
Sepiolita-Ag	Total	6,72 ± 0,19	53 ± 2	48 ± 1
	Ultrafiltrada	3,56 ± 0,10		

1.3.3.2. Caracterización de la plata liberada desde el caolín-Ag y la sepiolita-Ag en función del tamaño mediante DLS

El análisis mediante DLS se empleó para la caracterización de las especies presentes en suspensión en los ensayos de lixiviación con los dos materiales arcillosos tras 24 horas con agua ultrapura. Esta técnica permite estimar el diámetro hidrodinámico promedio, así como la distribución de tamaños de las partículas presentes en una suspensión a partir de la luz dispersada por las mismas. En la Tabla 1.3.3. se recogen los valores de polidispersidad obtenidos, así como el diámetro hidrodinámico, en nanómetros, para cada caso. Adicionalmente, se muestran los resultados obtenidos para un estándar de SiO₂ para su comparación. Se considera que una muestra es monodispersa cuando el valor de polidispersidad es menor a 0,1, mientras que en muestras polidispersas este valor se sitúa

alrededor de 0,1 - 0,3. Los valores de diámetro hidrodinámico para caolín-Ag y sepiolita-Ag corresponden a los máximos de la distribución bimodal obtenida.

Tabla 1.3.3. Valores de polidispersidad obtenidos mediante DLS y diámetro hidrodinámico determinado, en nm, para las suspensiones liberadas de caolín-Ag y sepiolita-Ag tras 24 h en agitación con agua ultrapura.

Muestra	Polidispersidad	d_h / nm
Caolín-Ag	0,225	72 - 418
Sepiolita-Ag	0,214	64 - 437
Estándar SiO ₂ 0,150 μ m	0,073	130

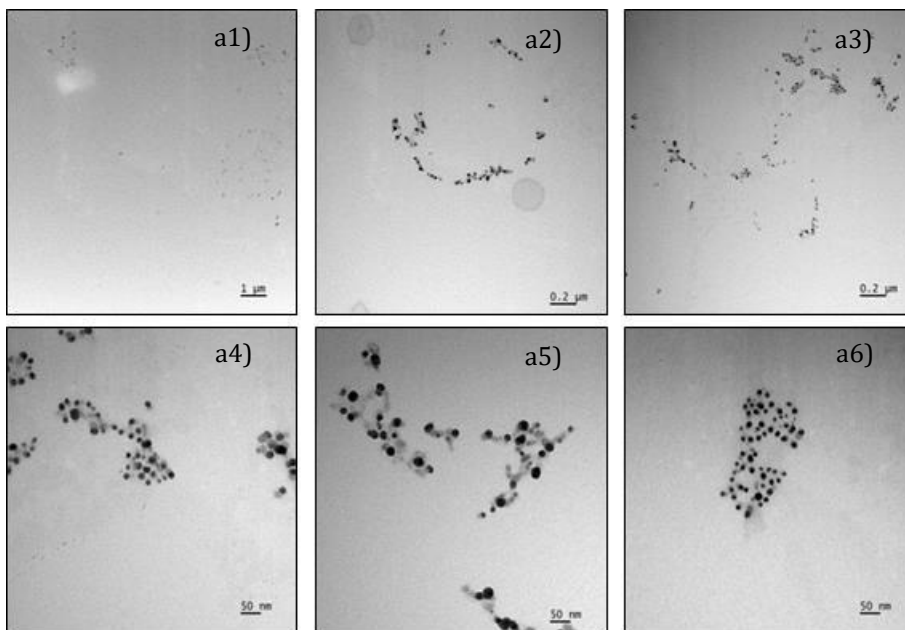
Tanto las muestras de caolín-Ag como de sepiolita-Ag presentaron una elevada polidispersidad, por lo que se trata de suspensiones polidispersas. De estos resultados se deduce que hay una fracción de partículas originales de caolín-Ag y de sepiolita-Ag que permanece en suspensión y que no es eliminada mediante la centrifugación, por tratarse de tamaños inferiores al corte realizado ($< 0,5 \mu$ m)

1.3.3.3. Caracterización de la plata liberada desde el caolín-Ag y la sepiolita-Ag mediante TEM

Una vez llevados a cabo los ensayos de liberación de plata desde los materiales en agua ultrapura, se hizo uso de la microscopía electrónica de transmisión (TEM) con el objetivo de confirmar o no la presencia de nanopartículas de plata en las disoluciones. La caracterización se realizó en suspensiones de caolín-Ag y sepiolita-Ag tras 24 horas de agitación en agua ultrapura y posterior corte a tamaño de partícula inferior a $0,5 \mu$ m.

En la Figura 1.3.5. se muestran imágenes obtenidas a través de TEM para estas dos muestras. Para ambos casos se observa y confirma la presencia de nanopartículas de plata. Los tamaños observados tanto en caolín-Ag como en la sepiolita-Ag están en torno a los 5-50 nm, con un diámetro medio de unos 20 nm. Se observó una mayor población de nanopartículas para el caso de la sepiolita-Ag, lo cual estaría de acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente mediante ultrafiltración; en el caso del caolín-Ag, las nanopartículas se encontraban más dispersas en la muestra. Además, en las imágenes correspondientes a la sepiolita-

Ag se observó la presencia de microfilamentos mayores a $0,5 \mu\text{m}$ relacionados con el propio material. Esto pondría de manifiesto que la centrifugación llevada a cabo para realizar un corte de tamaño de partícula no es efectiva para los microfilamentos característicos de la estructura de la sepiolita. El hecho de que no sean especies esféricas (el cálculo se basa en el diámetro de una esfera de volumen equivalente, al ser la velocidad de sedimentación proporcional a la masa efectiva) hace que su eliminación mediante centrifugación no sea efectiva y que, por tanto, especies mayores a $0,5 \mu\text{m}$ en alguna de las dimensiones, pueden estar pasando a las suspensiones de medida. En el caso del caolín-Ag no se observaron claramente micropartículas del material.



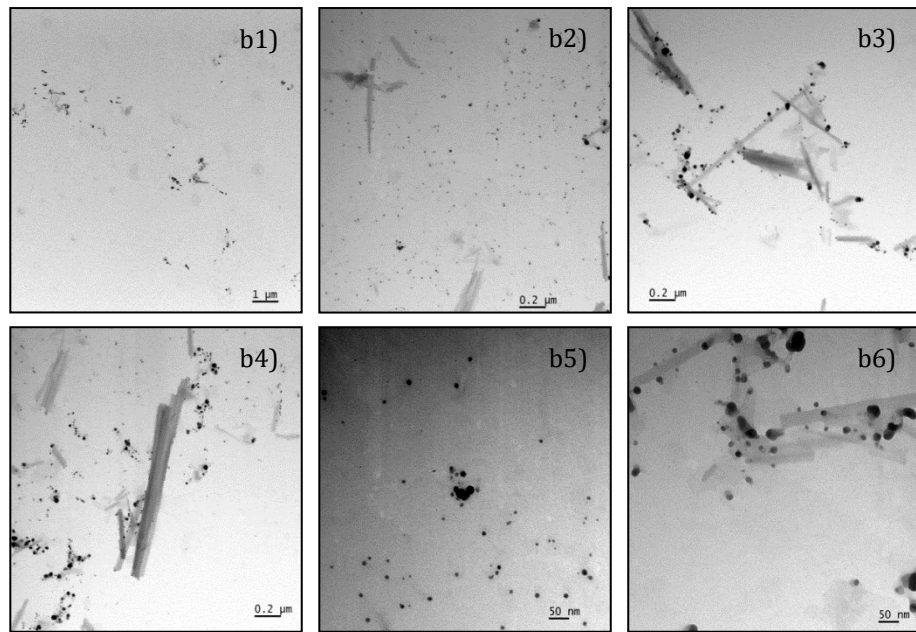


Figura 1.3.5. *Imágenes TEM de las disoluciones liberadas por caolín-Ag (a1 – a6) y sepiolita-Ag (b1 – b6) en agua ultrapura. (a1 y b1) x12000; (a2, a3, b2 – b4) x60000; (a4 – a6, b5, b6) x 200000. En la sepiolita-Ag además de las AgNPs se observan microfilamentos relacionados con el material.*

1.3.3.4. Detección de nanopartículas de plata liberadas en ensayos de liberación con caolín-Ag y sepiolita-Ag mediante SP-ICPMS

Para la detección de micro/nano-partículas presentes que contengan plata se hace uso de SP-ICPMS. Las disoluciones liberadas desde el caolín-Ag y la sepiolita-Ag tras 24 horas de contacto con agua ultrapura y posterior corte a tamaño de partícula inferior a 0,5 μm, se introdujeron en el sistema ICPMS previa dilución con agua ultrapura.

En la Figura 1.3.6. se muestran los barridos de tiempo obtenidos para estos casos. En ellos se pueden diferenciar un número de pulsos por encima de la línea base, especialmente en el caso del caolín-Ag. La alta proporción de plata (I) encontrada previamente en los ensayos de ultrafiltración, indican que estos pulsos pueden ser debidos a micropartículas de caolín-Ag o de sepiolita-Ag de tamaños menores a 0,5 μm que contengan plata o a la presencia de nanopartículas de plata

en las muestras. La presencia de plata disuelta sitúa los límites de detección de tamaño en torno a 50 nm.

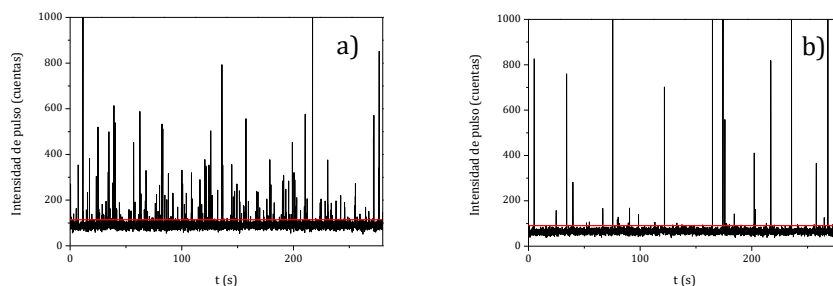


Figura 1.3.6. Barridos de tiempo correspondientes a las suspensiones liberadas de (a) caolín-Ag; (b) sepiolita-Ag tras 24 h en agua ultrapura.

1.3.3.5. Detección y caracterización de especies de plata liberadas desde el caolín-Ag y la sepiolita-Ag mediante AF4-UV-Vis-ICPMS

Con el objetivo de obtener más información sobre las formas de plata liberadas en las suspensiones (> 2 nm), éstas fueron analizadas mediante AF4-ICPMS. Las muestras fueron inyectadas directamente en el sistema.

Aunque los ensayos de ultrafiltración mostraban que la mayor parte (91 ± 5 %) de la plata liberada por el caolín-Ag se correspondía con Ag^+ , se estudió la posible presencia de nanopartículas de plata en el medio. En la Figura 1.3.7. se muestra el fractograma obtenido para el ensayo de caolín-Ag en agua ultrapura, siguiendo el programa A descrito en la Tabla 1.3.1, junto con las señales recogidas a 290 nm y 405 nm mediante UV-Vis. En él, se observa un máximo a los 8,8 min que podría estar relacionada con nanopartículas de plata de algo más de 20 nm, lo que estaría de acuerdo con lo observado anteriormente en las imágenes TEM. Sin embargo, a pesar de la elevada señal de plata obtenida a través de ICPMS, no se observó señal del efecto plasmón característico de las nanopartículas de plata en UV-Vis. Para tratar de comprender el origen de esta señal de plata en ICPMS del caolín-Ag, se realizó una comparación con las señales obtenidas tras la adición tanto de estándares de plata (I) como de nanopartículas de plata de 20 nm (cuyo máximo se situó en 8,59 min). En la Figura 1.3.8. y en la Figura 1.3.9. se muestran

los fractogramas obtenidos tras estas adiciones a la disolución liberada por el caolín-Ag, junto con las señales UV-Vis correspondientes.

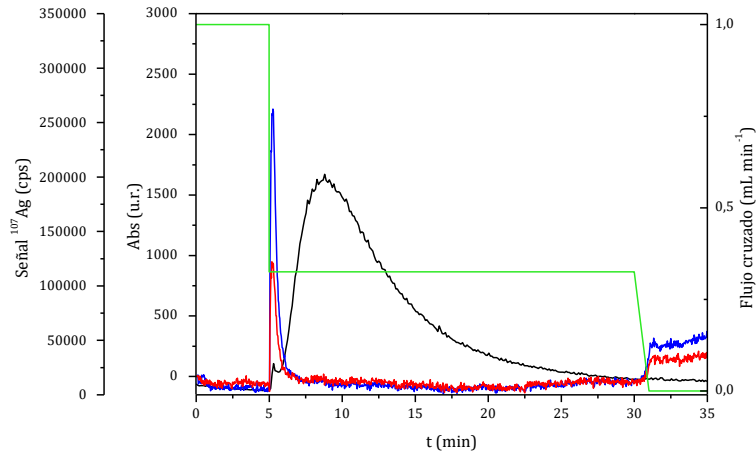


Figura 1.3.7. Fractograma correspondiente a la disolución liberada por el caolín-Ag en agua ultrapura. Negro señal de ^{107}Ag medida en ICPMS. Azul señal UV-Vis a 290 nm. Rojo señal UV-Vis a 405 nm. Verde flujo cruzado aplicado.

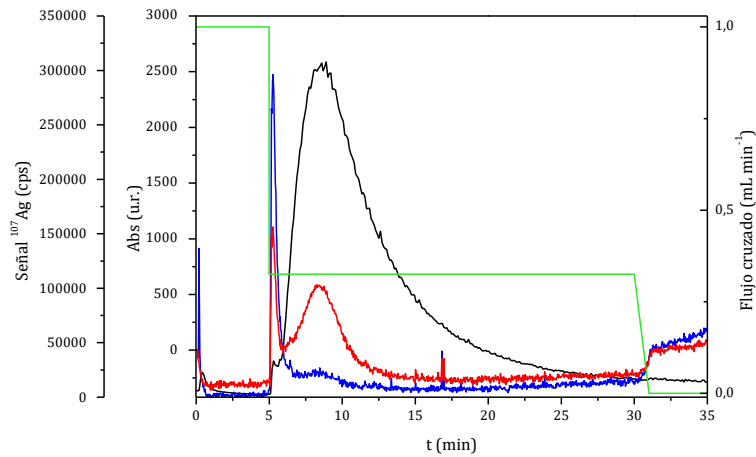


Figura 1.3.8. Fractogramas correspondientes a la disolución liberada por el caolín-Ag con adición de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de AgNPs de 20 nm. Negro señal de ^{107}Ag medida en ICPMS. Azul señal UV a 290 nm. Rojo señal UV-Vis a 405 nm. Verde flujo cruzado aplicado.

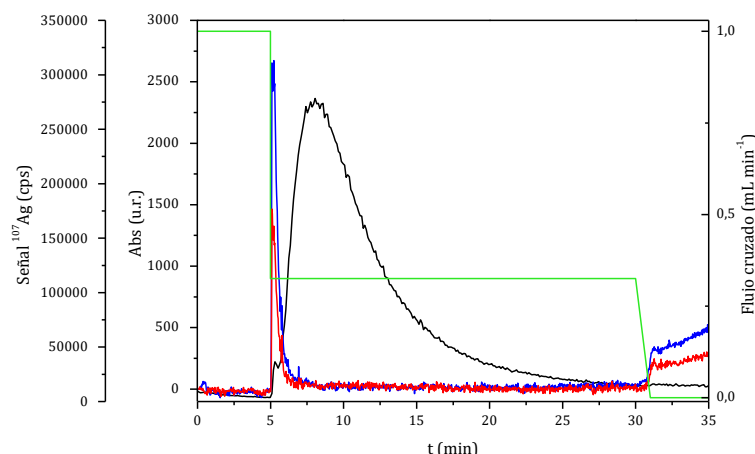


Figura 1.3.9. Fractograma correspondientes a la disolución liberada por el caolín-Ag con adición de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de plata (I). Negro señal de ^{107}Ag medida en ICPMS. Azul señal UV a 290 nm. Rojo señal UV-Vis a 405 nm. Verde flujo cruzado aplicado.

En los fractogramas anteriores se observa un aumento en la señal ICPMS del máximo tanto en el caso de adicionar plata en su forma nanoparticulada como en plata iónica. Además, para la adición de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de AgNPs de 20 nm en el caolín-Ag se puede diferenciar la señal UV-Vis a 405 nm; señal que no se obtiene en el fractograma correspondiente a caolín-Ag sin adición ni a caolín-Ag con adición de plata (I). Si se tienen en cuenta los resultados anteriormente obtenidos por ultrafiltración, la diferencia entre la plata total liberada y la plata encontrada en la fracción ultrafiltrada, es decir, la plata asociada a especies $>2 \text{ nm}$, estaría situada en torno a 1 mg L^{-1} . A estos niveles de concentración, y teniendo en cuenta que con la adición de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ sí se obtiene señal de las nanopartículas de plata en el UV-Vis, debería poder observarse el efecto plasmón de las mismas. Estos resultados inducen a pensar que las señales de plata obtenidas a través de AF4-ICPMS no se corresponden con nanopartículas de plata, sino con plata asociada a micropartículas del material que podrían permanecer en suspensión o incluso formarse en el medio de elución del sistema AF4. Para obtener mayor grado de información, se recogió a la salida del AF4 la fracción correspondiente al tiempo del máximo de elución del caolín-Ag y se observó a través de FESEM (Figura 1.3.10.).

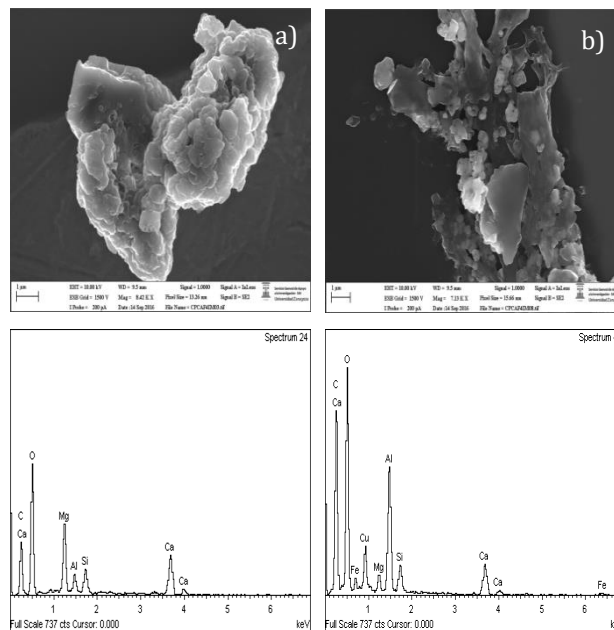


Figura 1.3.10. Imágenes FESEM de la muestra de caolín-Ag recogida a la salida del AF4 a 8,8 min junto con sus espectros EDX; (a) $\times 8420$; (b) $\times 7130$.

En las imágenes obtenidas mediante FESEM tan sólo se observaron algunas micropartículas de 1 a 4 micras de aluminosilicatos, pero no se observó la presencia de plata mediante el análisis por EDX.

Este caolín-Ag en agua ultrapura se inyectó también en el sistema empleando el programa de separación B descrito en la Tabla 1.3.1. En este programa el flujo cruzado empleado es mayor que el correspondiente al programa A, lo que permite aumentar el tiempo de retención de las especies que se eluyen en modo normal, de acuerdo a los principios de la separación en AF4. En la Figura 1.3.11. se muestran los fractogramas obtenidos para este caolín-Ag en agua ultrapura sin adición y con adición de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de plata (I) y de AgNPs de 20 nm.

En este caso el tiempo de elución en el máximo de la señal caolín-Ag se sitúa en 7,31 min, lo que supone un adelanto en el tiempo de elución de 1,5 min respecto a lo obtenido anteriormente a través del programa A. Asimismo, en el caso del caolín-Ag con adición de nanopartículas de plata se observa un primer pico que correspondería a las micropartículas del material y una segunda señal a los 26,7 min correspondiente a las nanopartículas de plata adicionadas. El menor tiempo de elución obtenido al aumentar el flujo cruzado parece indicar que la primera señal

corresponde a especies de gran tamaño (por encima de una micra) que no se eluyen en modo normal, sino en modo estérico. En este modo, al no influir la difusión, la influencia del flujo cruzado en la retención de las especies es pequeña, haciendo que las especies de mayor tamaño eluyan antes que las más pequeñas. Por su parte, la elución de las nanopartículas de plata (segundo pico en el fractograma de línea roja) sí estaría controlada por la difusión de las mismas y el flujo cruzado aplicado (elución en modo normal); observándose un aumento en el tiempo de elución de las mismas al aumentar el flujo cruzado.

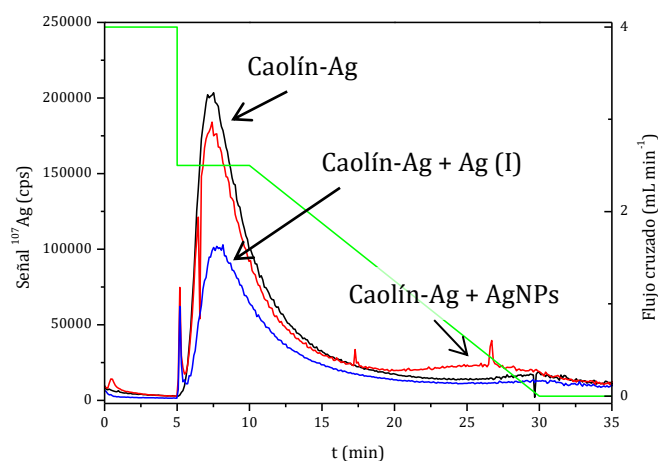


Figura 1.3.11. Fractogramas correspondientes a la señal de ^{107}Ag medida en ICPMS para la disolución liberada por el caolín-Ag (negro); caolín-Ag con adición de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de plata (I) (azul); caolín-Ag con adición de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de AgNPs de 20 nm (rojo). Verde flujo cruzado aplicado.

Aparentemente, el AF4-ICPMS estaría produciendo una distorsión en cuanto a las formas físico-químicas en las que se encuentra la plata en el medio, posiblemente relacionada con cambios en el pH al entrar en contacto con la disolución portadora (con un pH inferior respecto a la suspensión original tras el ensayo de lixiviación, pH = 8 vs. pH = 9,8), por formación de silicatos insolubles de tamaños superiores al corte realizado mediante la centrifugación previa a $0,5 \mu\text{m}$, a los que se asociaría parcialmente la plata (I) presente en disolución

De esta forma, el AF4-ICPMS no permitió confirmar la presencia de nanopartículas de plata en la disolución, sino la existencia de micropartículas de

aluminosilicatos asociadas a plata. A pesar de esto no se puede descartar totalmente la presencia de nanopartículas de plata, aunque se encontrarían en una proporción muy baja; tal y como se observó anteriormente en las imágenes de TEM (Figura 1.3.5.).

Los resultados obtenidos en el caso de la sepiolita-Ag fueron similares a los discutidos con el caolín-Ag. En la Figura 1.3.12. se muestra el fractograma obtenido para el ensayo de sepiolita-Ag en agua ultrapura, siguiendo el programa A descrito en la Tabla 1.3.1. En él se observa un máximo en la señal de Ag de ICPMS (línea negra) a los 9,1 min, similar a los tiempos obtenidos en el caso del caolín-Ag (8,8 min). De nuevo, no se observó señal UV-Vis a 405 nm en el máximo de ese pico (línea roja), por lo que la presencia de nanopartículas de plata no pudo ser confirmada mediante AF4-ICPMS, aunque las imágenes de TEM y los ultrafiltrados parecen indicar su presencia en los lixiviados.

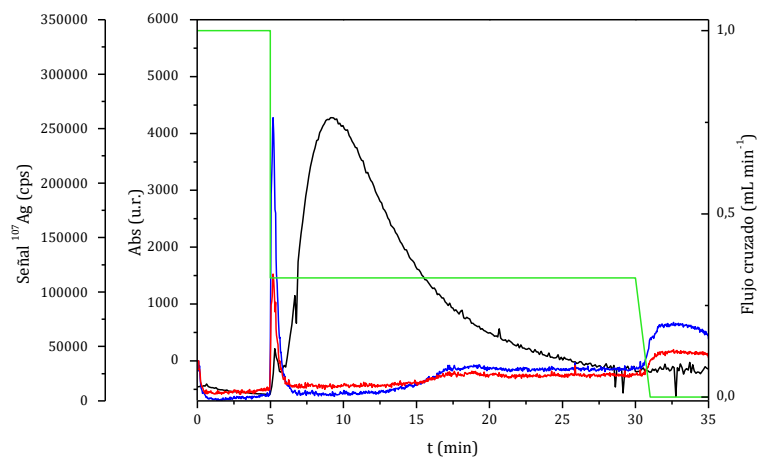


Figura 1.3.12. Fractograma correspondiente a la disolución liberada por la sepiolita-Ag en agua ultrapura. Negro señal de ^{107}Ag medida en ICPMS. Azul señal UV a 290 nm. Roja señal UV-Vis a 405 nm. Verde flujo cruzado aplicado.

1.3.4. CONCLUSIONES

La aplicación de la plataforma metodológica UF-ICPMS/SP-ICPMS/AF4-UV-Vis-ICPMS al estudio de la liberación de plata a partir de arcillas recubiertas con nanopartículas de plata en medios acuosos (agua ultrapura) ha permitido:

- Cuantificar el porcentaje de plata liberada en forma de plata (I) (UF-ICPMS).
- Detectar la liberación de la plata asociada a partículas, aunque no fue posible diferenciar si la plata se encontraba en forma de nanopartículas libres o asociada a micropartículas de arcillas. La capacidad de detección se vio limitada por la presencia de elevadas cantidades de plata disuelta (SP-ICPMS).
- En el caso de AF4, la información obtenida no fue concluyente, al estar la plata asociada aparentemente a especies de gran tamaño (mayores a 1 μm) que se eluyen en modo estérico. Dado que estas especies deberían estar ausentes en la suspensión tras la etapa de centrifugación previa, es posible que las condiciones utilizadas para la separación modifiquen la distribución original de las especies de plata presentes, lo que impide una correcta interpretación de los resultados obtenidos respecto a la situación inicial.

Mediante el uso de DLS se ha confirmado la presencia de micropartículas < 0,5 μm en las suspensiones estudiadas. Por otro lado, la presencia de nanopartículas de plata pudo ser confirmada mediante TEM.

Por lo que se refiere al comportamiento de las dos arcillas estudiadas, se han observado diferencias tanto en las cantidades como en las formas de plata liberada a partir de caolín-Ag y la sepiolita-Ag. En torno al 40-50 % de la plata presente en las arcillas se libera después de 24 horas en contacto con agua, siendo esta liberación ligeramente superior para el caso de la sepiolita-Ag. Por lo que se refiere a la forma de liberación, en el caso del caolín-Ag, un 90% de la plata liberada lo hace como plata (I), mientras que en la sepiolita-Ag, este porcentaje se reduce en torno al 50%. La mayor porosidad, área superficial y capacidad de intercambio catiónico de la sepiolita-Ag puede ser el motivo de dicho comportamiento.

Aunque no se puede descartar la presencia de nanopartículas en las disoluciones liberadas, la proporción de éstas sería muy baja, tal y como se deduce de las observaciones mediante TEM. Finalmente, el AF4-ICPMS-UV-Vis no permitió afirmar que hubiera nanopartículas de plata; debido fundamentalmente a la

ausencia de la banda de absorción por efecto plasmón característica de las nanopartículas de plata, justificada por la menor sensibilidad de la técnica, y a la posible modificación de la distribución de las distintas formas de plata presentes. Las modificaciones en el entorno de la muestra que se producen durante las distintas etapas en AF4 justificarían las diferencias observadas y ponen de manifiesto la importancia de adecuar las condiciones en las que se lleva a cabo la caracterización de las especies objeto de estudio al medio original.

1.4. LIBERACIÓN DE PLATA A PARTIR DE ARCILLAS RECUBIERTAS CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA UTILIZADAS EN PROCESOS DE VINIFICACIÓN

1.4.1. INTRODUCCIÓN

El dióxido de azufre (SO_2) es el aditivo más importante empleado en la fabricación de vino debido a sus propiedades antisépticas y antioxidantes. Inhibe el crecimiento de un amplio rango de microorganismos, como levaduras y bacterias lácticas y acéticas, haciendo que la fermentación no se produzca de manera incontrolada. Como antioxidante, el carácter reductor del SO_2 ayuda a reducir los efectos del oxígeno disuelto e inhibe la acción de ciertas enzimas catalizadoras de la oxidación de los fenoles [133]. Sin embargo, el SO_2 también puede producir efectos sensoriales negativos, provocando sabores y olores a sulfuro de hidrógeno y mercaptano [134]. A pesar de las ventajas del SO_2 , los sulfitos resultantes de su adición tienen efectos tóxicos en la salud humana, pudiendo producir dolores de cabeza, náuseas, dolor abdominal y reacciones alérgicas [135]. Por tanto, debido a los riesgos potenciales de los sulfitos en la salud humana, la legislación en torno a la presencia de este compuesto en alimentos, se está volviendo cada vez más restrictiva. De esta forma, la Comisión Europea (CE) y la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) han establecido límites legales de concentración máxima de SO_2 de 150 mg L^{-1} para vinos tintos secos y de 200 mg L^{-1} para vinos blancos secos [136,137]. Una consecuencia directa de todo lo dicho es un creciente interés por desarrollar e investigar sustancias o técnicas alternativas, inocuas para la salud y que replacen o complementen la acción del SO_2 , eliminando o reduciendo sus niveles en vino pero manteniendo efectos antisépticos similares [138,139]. Entre estas sustancias, y aprovechando sus propiedades antimicrobianas, se ha estudiado el uso de la plata en forma de nanopartículas de plata estabilizadas con polietilenglicol (PEG-AgNPs) y glutatión (GSH-AgNPs) [140], así como depositada en sustratos arcillosos (micropartículas de caolín) [141,142].

Según la Resolución de la OIV/OENO 145/2009, el tratamiento de vinos con cloruro de plata está aceptado para reducir los defectos de aroma debidos al hidrógeno sulfurado y a algunos mercaptanos. Sin embargo, la dosis utilizada no

debe sobrepasar 1 g hL^{-1} y el cloruro de plata debe aplicarse a un soporte inerte, como la tierra de diatomeas o el caolín. Además, el contenido máximo de plata en el vino tratado deberá ser inferior a $0,1\text{ mg L}^{-1}$ [143].

Los sustratos a base de arcillas con plata metálica depositada en su superficie, pueden liberar plata en forma de nanopartículas metálicas, así como en forma disuelta, debido a su oxidación a plata (I). En el caso de su aplicación en el tratamiento de vinos, la plata (I) podrá formar complejos preferentemente con compuestos que contengan grupos tiol, dada su alta afinidad por ellos. Por otra parte, las nanopartículas de plata liberadas podrían sufrir fenómenos de agregación o aglomeración, dando lugar a un incremento en su tamaño, así como interacciones con todas las especies presentes en el vino, que pueden modificar las propiedades relacionadas con su superficie [144]. Dependiendo de la estrategia utilizada para la aplicación del caolín-Ag, no se puede descartar la posibilidad de que una fracción de este material quede en el producto final.

El objetivo principal de este apartado se centra en la identificación de las formas físico-químicas de plata en vinos tratados con caolín-Ag, para confirmar la no existencia de plata en forma de nanopartículas en el producto final. Frente a las situaciones planteadas en los capítulos anteriores, en este caso la muestra presenta una matriz de mucha mayor complejidad, lo cual supone un problema añadido para aplicar la plataforma UF-ICPMS/SP-ICPMS/AF4-ICPMS.

1.4.2. EXPERIMENTAL

Instrumentación

Los instrumentos empleados se corresponden con los anteriormente descritos en la caracterización de las arcillas recubiertas con nanopartículas de plata (Apartado 1.3.2.).

Reactivos y estándares

Los reactivos empleados se corresponden con los anteriormente descritos en la caracterización de las arcillas recubiertas con nanopartículas de plata (Apartado 1.3.2.).

Muestras

- Caolín Plateado Coloidal (Caolín-Ag)

La descripción de este material queda recogida en el Apartado 1.3.2.

A lo largo de este trabajo se utilizó un caolín-Ag, cuya determinación del contenido de plata total tras ataque ácido y medida mediante F-AAS dio un contenido de $0,94 \pm 0,05$ % (m/m)

- Muestras de vino

Las muestras estudiadas son vinos tratados con caolín-Ag. Se dispuso de las botellas de vino originales. Una vez se cogieron los volúmenes necesarios para los análisis, las botellas se cerraron y se guardaron de nuevo eliminando el aire, con el objetivo de reducir procesos oxidativos. Las muestras de vino analizadas se recogen en la Tabla 1.4.1. Todos los vinos habían sido tratados con 1 g L^{-1} de caolín-Ag, excepto en el caso de los vinos 3 y 6 en el que la cantidad de caolín-Ag utilizada había sido de $0,1 \text{ g L}^{-1}$.

Tabla 1.4.1. Muestras de vino.

Muestra	Descripción	Concentración de plata total / mg L^{-1} *
Vino 1	Vino tinto; tempranillo – Caolín-Ag 1 g L^{-1}	< 0,010
Vino 2	Vino tinto; Merlot – Caolín-Ag 1 g L^{-1}	< 0,010
Vino 3	Vino tinto; Merlot – Caolín-Ag $0,1 \text{ g L}^{-1}$	< 0,010
Vino 4	Vino blanco; Parellada – Caolín-Ag 1 g L^{-1}	< 0,010
Vino 5	Vino blanco; Chardonnay – Caolín-Ag 1 g L^{-1}	0,013
Vino 6	Vino blanco - Caolín-Ag $0,1 \text{ g L}^{-1}$	< 0,010

* Análisis realizados por los laboratorios agroalimentarios del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medioambiente.

Procedimientos

- Experimentos de liberación con caolín-Ag

Para realizar los experimentos de liberación se tomaron 50 mg de caolín-Ag y se dejaron en agitación junto con 50 mL de diferentes medios (1 g L^{-1}): i) agua ultrapura, ii) pH = 3, iii) vino tinto tratado con $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de caolín-Ag (vino 3). Todos

los ensayos se mantuvieron en agitación 24 horas a temperatura ambiente en ausencia de luz. Transcurrido este tiempo se tomaron 10 mL de las suspensiones y se centrifugaron a 714 rpm durante 10 min a 20°C. Las condiciones de centrifugación se fijaron para eliminar partículas mayores a 1 µm.

- El resto de procedimientos se corresponden con los ya descritos en el Apartado 1.3.2.

1.4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.4.3.1. Determinación de la cantidad total de plata y de plata disuelta en ensayos de liberación con caolín-Ag

Con el objetivo de estudiar la potencial liberación de plata desde el caolín-Ag al medio durante su uso en el tratamiento de los vinos, se realizaron varios ensayos de liberación en distintos medios. La determinación de la plata total y de plata disuelta liberada se determinó por medida directa a través de ICPMS.

En la Tabla 1.4.2. se muestran los resultados obtenidos en la cuantificación de los ensayos de liberación con el producto caolín-Ag en distintos medios. En la tabla se recogen las concentraciones de plata determinadas en cada uno de los medios y liberadas desde el caolín-Ag tras 24 horas de agitación. La fracción total se refiere a la cantidad de plata total liberada en el ensayo (plata disuelta y asociada a partículas menores de 1 µm). La fracción ultrafiltrada hace referencia a la plata determinada en el ultrafiltrado, la cual estaría como Ag⁺ en los medios de agua ultrapura y pH = 3, o asociada a moléculas con un peso molecular menor a 3 kDa para el caso del vino. Asimismo, se muestra el porcentaje de plata ultrafiltrada respecto a la cantidad total de plata liberada. La última columna hace referencia a la cantidad de plata liberada en el medio respecto a la cantidad de plata presente en el caolín-Ag.

Por tanto, tal y como ya se había observado en el Apartado 1.3.3.1 – Tabla 1.3.2., se puede afirmar que la plata presente en el caolín-Ag tiende a ser liberada en disolución cuando se pone en contacto con agua (53 ± 1 % de la plata total en caolín-Ag se encuentra en disolución). Además, esta plata se libera en forma de plata (I) en elevado porcentaje (89 ± 1 %), lo que implica un proceso de oxidación de las nanopartículas de plata presentes en el material a plata (I).

El porcentaje de plata liberada a pH = 3 es algo mayor ($65 \pm 4 \%$), pero es significativamente menor en el caso del vino tinto (Vino 3) estudiado ($4 \pm 1 \%$). Esto sugiere que la oxidación de las nanopartículas de plata en el vino es menos pronunciada probablemente debido a su potencial reductor. Además, no se encontró plata asociada a moléculas por debajo de 3 kDa, por lo que la plata (I) como catión libre no pudo encontrarse en el vino. La presencia de sulfuros y tioles en vino puede influir en la liberación de plata (I) tal y como han apuntado otros autores [145,146], reduciendo la cantidad total de plata liberada por formación de Ag_2S en la superficie de las nanopartículas [147]. En cuanto a la naturaleza de la plata presente en la fracción > 3 kDa, estas especies podrían corresponder a nanopartículas de plata y a plata asociada a especies macromoleculares, aunque la presencia de micropartículas de caolín-Ag menores de $1 \mu\text{m}$ en la suspensión no se puede descartar.

Tabla 1.4.2. Concentración de plata liberada desde el caolín-Ag en diferentes medios (24 horas).

Medio	Fracción	Concentración de plata / mg L^{-1}	% Ag UF. vs. total	% Ag total liberada
Agua ultrapura	Total	$5,28 \pm 0,06$	89 ± 1	53 ± 1
	Ultrafiltrada	$4,70 \pm 0,03$		
pH 3	Total	$6,48 \pm 0,44$	92 ± 8	65 ± 4
	Ultrafiltrada	$5,94 \pm 0,48$		
Vino 3	Total	$0,42 \pm 0,09$	-	4 ± 1
	Ultrafiltrada	< LD		

1.4.3.2. Detección de nanopartículas de plata en ensayos de liberación con caolín-Ag mediante SP-ICPMS

Para la detección de micro/nano-partículas presentes que contengan plata se hace uso de SP-ICPMS. Las suspensiones procedentes de ensayos de liberación a partir de caolín-Ag tras 24 horas de contacto en agua ultrapura, pH = 3 y vino tinto 3, se introdujeron en el sistema ICPMS previa dilución con agua ultrapura. Las

diluciones realizadas se correspondieron con 1:10000 para agua ultrapura y pH = 3, y 1:2500 para el caso del vino tinto.

En la Figura 1.4.1. se muestran los barridos de tiempo obtenidos para estos casos. En ellos se puede diferenciar un número destacado de pulsos por encima de la línea base.

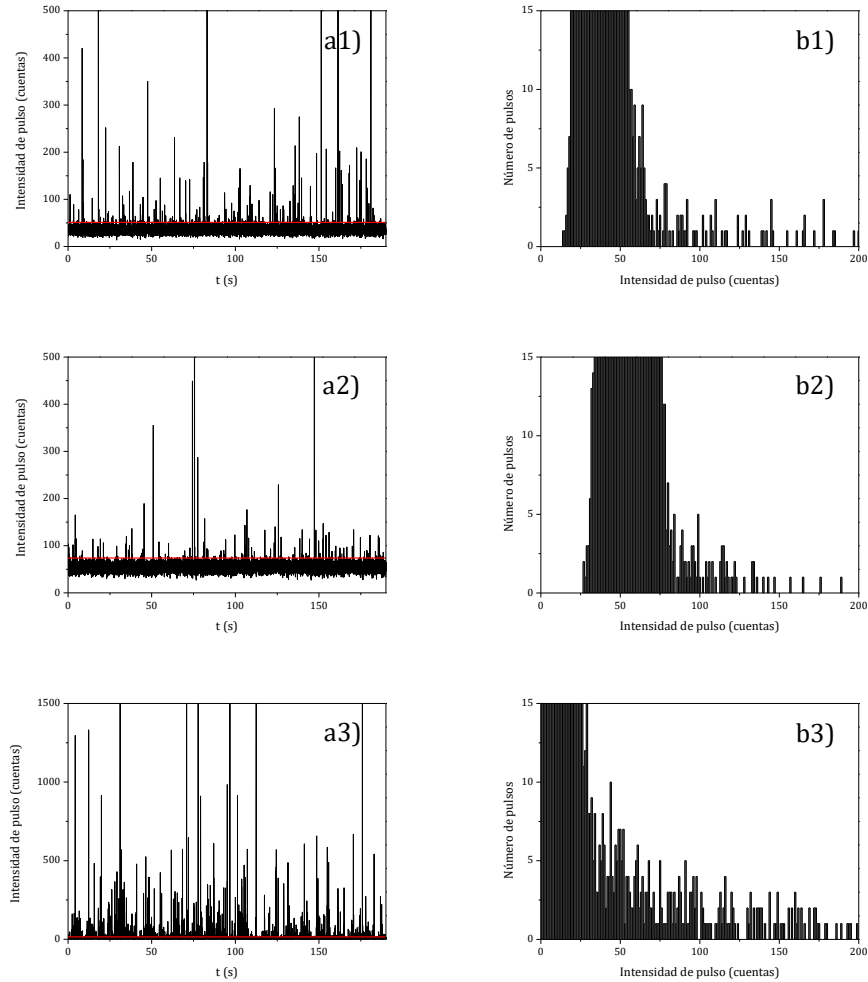


Figura 1.4.1. Barridos de tiempo (a1, b1, c1) e histogramas de intensidad (a2, b2, c2) correspondientes para las suspensiones procedentes de ensayos de liberación a partir de caolín-Ag tras 24 h en (a) agua ultrapura; (b) pH = 3; (c) vino tinto 3. Monitorización del isótopo ^{107}Ag .

La alta proporción de plata (I) encontrada previamente en los ensayos de ultrafiltración, indican que estos pulsos pueden ser debidos a micropartículas de

caolín-Ag de tamaños menores a $1\ \mu\text{m}$ que contengan plata o a la presencia de nanopartículas de plata en las muestras con tamaños por encima de 40 nm. En los histogramas de intensidad se muestra una ampliación de la zona baja del mismo para poder distinguir los eventos de micro/nano-partículas de la distribución debida a la señal de plata (I).

1.4.3.3. Detección y caracterización de especies de plata liberadas desde el caolín-Ag mediante AF4-UV-Vis-ICPMS

Con el objetivo de obtener más información sobre las formas de plata liberadas en las suspensiones (fracción $> 3\ \text{kDa}$), éstas fueron analizadas mediante AF4-UV-Vis-ICPMS. Las muestras fueron inyectadas directamente en el sistema.

En la Figura 1.4.2. se muestra el fractograma obtenido a partir de la suspensión procedente del ensayo de liberación con caolín-Ag en vino tinto 3, junto con las señales UV-Vis correspondientes

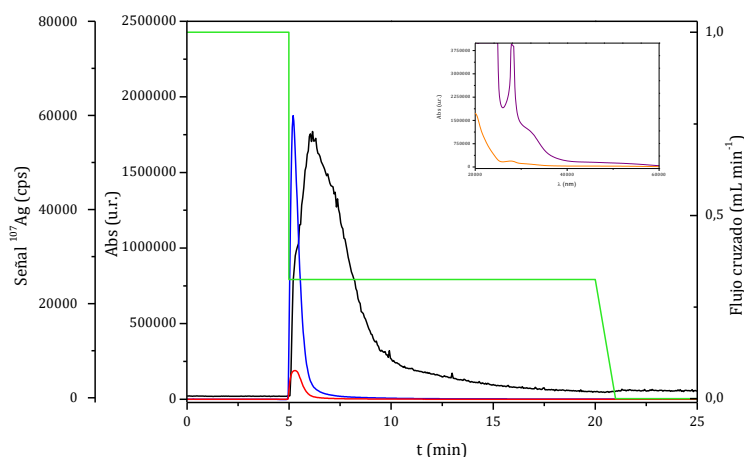


Figura 1.4.2. Fractograma correspondiente a la suspensión procedente del ensayo de liberación caolín-Ag en vino tinto 3. Negro señal de ^{107}Ag medida en ICPMS. Azul señal UV-Vis a 290 nm. Rojo señal UV-Vis a 405 nm. En la parte superior de la figura, se muestra el espectro UV-Vis de la muestra recogido a 5,2 y 6,0 min, púrpura y naranja respectivamente. Verde flujo cruzado aplicado.

En el fractograma anterior se observa un máximo a 6,0 min, lo que corresponde a tamaños menores de 10 nm, que podría estar relacionado con especies de plata (I) asociadas a las macromoléculas de mayor tamaño presentes en el vino, aunque la presencia de partículas del propio caolín-Ag o de plata asociada a micropartículas formadas en el propio medio no se puede descartar, tal y como se comentó en el Apartado 1.3.3.5. Si se observa el espectro UV-Vis a 5,2 min (volumen muerto) se detecta una elevada señal a 290 nm relacionada con compuestos orgánicos, que también es perceptible en el máximo del pico a 6,0 min. Como sucedió con el caolín-Ag en agua ultrapura (Apartado 1.3.3.5 – Figura 1.3.5), no se observó señal de UV-Vis relacionada con la presencia de nanopartículas de plata a 405 nm en el máximo del pico a 6,0 min.

1.4.3.4. Identificación de distintas especies de plata presentes en muestras de vino mediante AF4-ICPMS

La Figura 1.4.3. muestra los fractogramas obtenidos para las muestras de vinos tratados con caolín-Ag y descritas en la tabla 1.4.1. Las muestras fueron inyectadas sin dilución bajo las condiciones descritas en la Tabla 1.3.2 (programa A). Todas las muestras presentaron un perfil similar, con un máximo en torno a 5,8 min.

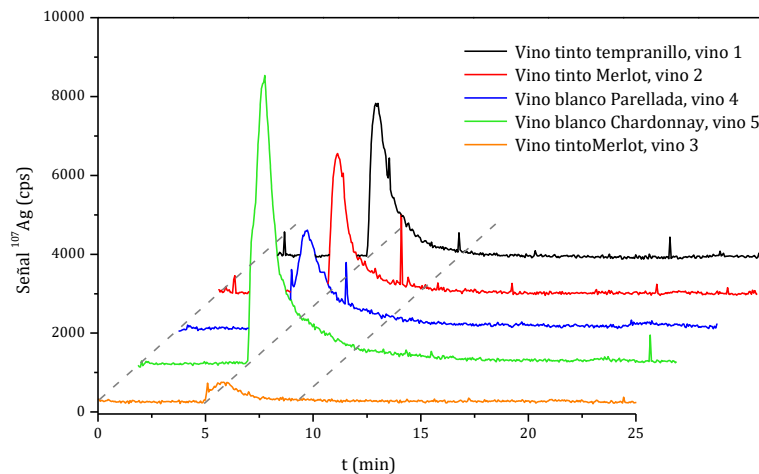


Figura 1.4.3. Fractogramas correspondientes a las muestras de vino tratadas con caolín-Ag.

En las muestras de Vino 3 y Vino 4 se observa un pico estrecho a 5,33 min que no queda resuelto del pico principal en el resto de las muestras. Este pico se corresponde con el tiempo muerto y está relacionado con especies no retenidas o no focalizadas correctamente en el canal.

La elucidación de la naturaleza del pico observado a 5,8 min se realizó por comparación con las señales obtenidas tras la adición tanto de estándares de plata (I) como de nanopartículas de plata de 10 nm a una de las muestras de vino (Vino 3). En la Figura 1.4.4. se muestra el fractograma obtenido tras estas adiciones a la muestra de vino.

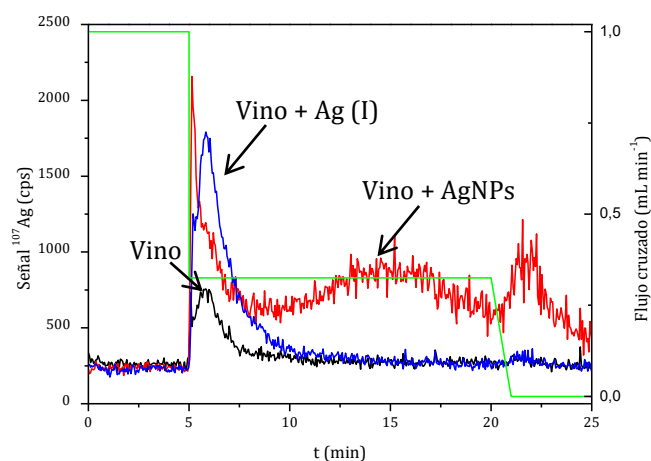


Figura 1.4.4. Fractogramas correspondientes a las muestras de vino tinto 3 sin adición (negro), vino tinto 3 con adición de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de plata (I) (azul) y vino tinto 3 con adición de $58 \mu\text{g L}^{-1}$ de AgNPs de 10 nm (rojo). Verde flujo cruzado aplicado.

A la vista de los fractogramas se puede observar que las adiciones de plata (I) y de nanopartículas de plata presentan diferentes perfiles. La adición de plata (I) provoca un incremento en el pico eluido a 5,8 min que también está presente en los fractogramas de los vinos sin ninguna adición. Por su parte, la adición de nanopartículas de plata de 10 nm al vino produce un pico a mayores tiempos de elución (máximo a 15 min) debido a la elución de las nanopartículas. Se puede afirmar por tanto que la plata presente en las muestras de vino no está como nanopartículas de plata sino como plata (I), probablemente asociada a

macromoléculas presentes en el vino tal y como se ha discutido en el apartado anterior (1.4.3.3).

La Figura 1.4.5. muestra el fractograma obtenido para nanopartículas de plata de 10 nm diluidas en el portador (SDS 0,01 % pH = 8). Si se comparan los tiempos de elución de estas nanopartículas en el portador (6,8 min) con los tiempos obtenidos para las nanopartículas adicionadas en el vino (15 min), se observa que estas últimas eluyen a tiempos mayores, lo que implica tamaños mayores de acuerdo a la base de la técnica, por lo que las nanopartículas de plata se podrían estar agregando en el vino. Este hecho se ve confirmado por la adición al vino de nanopartículas de plata de 40 nm (Figura 1.4.6.); como se puede observar, estas nanopartículas en vino se eluyen al mismo tiempo (15 min) que las de 10 nm, lo que sugiere una agregación de las mismas, eluyéndose todo en los mismos tiempos.

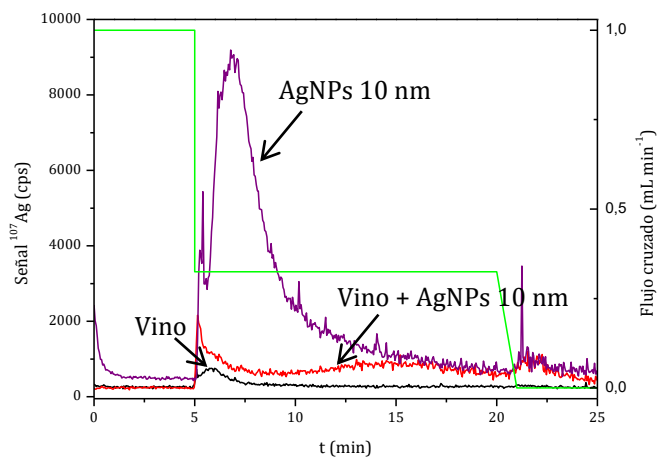


Figura 1.4.5. Fractogramas correspondientes a la muestra de vino tinto 3 sin adición (negro), vino tinto 3 con adición de $58 \mu\text{g L}^{-1}$ de AgNPs de 10 nm (rojo) y AgNPs de 10 nm en el portador (púrpura). Verde flujo cruzado aplicado.

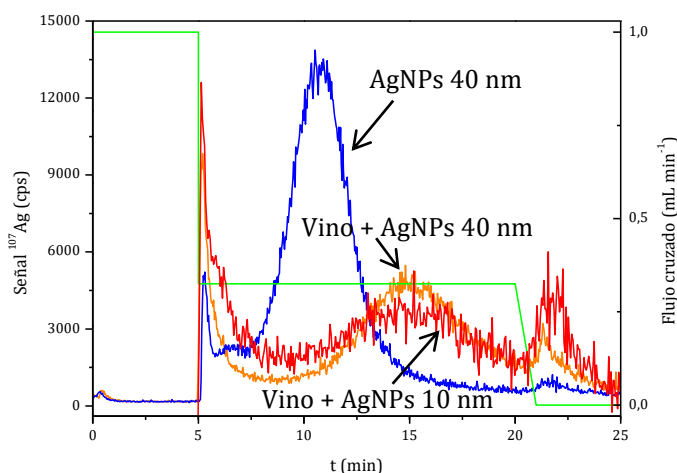


Figura 1.4.6. Fractogramas correspondientes a la muestra de vino tinto 3 con adición de $55 \mu\text{g L}^{-1}$ de AgNPs de 40 nm (naranja), vino tinto 3 con adición de $58 \mu\text{g L}^{-1}$ de AgNPs de 10 nm (señal x 4,5) (rojo), AgNPs de 40 nm (azul) en el portador. Verde flujo cruzado aplicado.

1.4.4. CONCLUSIONES

Los estudios de liberación de plata a partir de caolín-Ag en agua ponen de manifiesto la liberación de hasta un 65% de la plata a pH 3 (límite inferior en vinos), haciéndolo mayoritariamente en forma de plata (I) (92%). A pesar de ello, la plata total liberada en la matriz de vino no supera el 4%. Este comportamiento podría estar justificado por la presencia de sulfuros y otros compuestos azufrados en el vino, que pueden dar lugar a la formación de Ag_2S u otras especies organosulfuradas en la superficie de las nanopartículas, impidiendo su oxidación y la subsecuente liberación de plata. Este hecho, junto a las etapas de clarificación típicas en los procesos de vinificación, justifican los bajos contenidos de plata en vinos obtenidos a partir de la vinificación con caolín-Ag ($< 10 \mu\text{g L}^{-1}$).

La aplicación de la plataforma UF-ICPMS/SP-ICPMS/AF4-ICPMS se ha visto seriamente comprometida, ya que la presencia de la plata (I) asociada a complejos de distinto peso molecular ha invalidado el uso efectivo de la ultrafiltración. Por otro lado, el hecho de que las nanopartículas depositadas en el caolín presenten

tamaños en torno a 20 nm y la posible presencia de micropartículas de caolín-Ag ha limitado el uso de SP-ICPMS. Por estos motivos, los análisis se han restringido al uso de AF4-ICPMS.

Los análisis realizados mediante AF4-UV-Vis-ICPMS han puesto de manifiesto la ausencia de nanopartículas de Ag en los vinos tratados con caolín-Ag y que la plata presente lo está como plata (I), formando probablemente complejos con macromoléculas mayores a 3 kDa.

1.5. LIBERACIÓN DE PLATA A PARTIR DE ARCILLAS RECUBIERTAS CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA UTILIZADAS COMO ADITIVOS EN ALIMENTACIÓN ANIMAL: ENSAYOS IN VITRO E IN VIVO

1.5.1. INTRODUCCIÓN

El uso de antibióticos como promotores de crecimiento en alimentación animal ha sido utilizado durante décadas con el fin de alcanzar mayores rendimientos productivos. Estas sustancias actúan selectivamente contra ciertas especies microbianas patógenas, permitiendo un menor esfuerzo metabólico en el control inmunológico del animal, y haciendo que los nutrientes necesarios para este trabajo metabólico queden a disposición para otros fines fisiológicos. Sin embargo, el continuo uso de antibióticos como promotores de crecimiento puede provocar su retención en tejidos del animal, por lo que el posterior consumo de estos productos animales por el hombre incrementaría potencialmente en éste los procesos de resistencia a los antibióticos [148]. Como consecuencia, el uso de antibióticos como promotores de crecimiento en alimentación animal fue prohibido por parte de la Unión Europea en el año 2006 [149]. Ante esta situación, la búsqueda de nuevos promotores de crecimiento como alternativa a los antibióticos ha aumentado. Entre los productos más ampliamente usados en producción de aves y cerdos se encuentran ácidos orgánicos, probióticos, prebióticos, aceites esenciales y extractos de plantas [150–158]. Sin embargo, sus efectos en la prevención de desórdenes digestivos y en el aumento de la productividad son variables y en la mayor parte de los casos por debajo del efecto alcanzado con el uso de antibióticos.

Dentro de este contexto, el uso de la plata como agente antimicrobiano ha suscitado un renovado interés. El empleo tradicional de la plata en su forma iónica (nitratos, sulfatos o cloruros) como agente tóxico para muchos patógenos [159] se ha visto sustituido por el uso de plata metálica en forma de nanopartículas, debido a su mayor estabilidad, mayor actividad antimicrobiana y menor toxicidad para las células eucariotas [160]. Todas estas propiedades, junto con el desarrollo de procesos industriales que permiten la obtención de nanopartículas de plata a bajo coste, han permitido considerar a estas nanopartículas como alternativa a otros

productos utilizados actualmente en la alimentación animal. Estas nanopartículas de plata han sido empleadas y añadidas en agua de bebida y en la alimentación de pollos [161,162] y cerdos [163]. Aunque los estudios sobre el efecto de nanopartículas de plata metálica en experimentos de producción animal son escasos, el uso de la plata en forma de nanopartículas ha demostrado ser eficaz en la reducción de organismos potencialmente patógenos, como los coliformes, en el íleo de cerdos, sin afectar a la población de aquellos que compiten con la proliferación de patógenos (lactobacilos). De esta forma, se han observado mejoras en los rendimientos productivos de animales monogástricos (cerdos y pollos) en los que se había utilizado la plata metálica como aditivo en nutrición, sin apreciar retención de la misma en tejidos cuando el animal es adulto [163].

Una de las variables a tener en cuenta en la incorporación de las nanopartículas de plata en la dieta de estos animales es la forma de administración, ya que ha de permitir una dosificación correcta de las mismas. Dentro de los aditivos utilizados en alimentación animal, se encuentran las arcillas. Las arcillas se utilizan en alimentación animal para múltiples aplicaciones tecnológicas (poder aglomerante, fluidificante y antiapelmazante), nutricionales (aumento de digestibilidad de los nutrientes, reducción de la velocidad de tránsito), sanitarias (protección gástrica e intestinal, prevención contra diarreas) y ambientales (reducción de emisiones de amoníaco y malos olores) [111]. La actividad antibacteriana de las arcillas se basa en la fuerte adsorción de las toxinas producidas por bacterias, lo que da lugar a una reducción significativa de la adhesión de las bacterias a la superficie de las células epiteliales. Por tanto, los *nanocomposites* a base de arcillas y de nanopartículas de plata poseen una alta capacidad antimicrobiana debido al papel de ambos compuestos [164], lo que les convierte en una posible alternativa como aditivos promotores de crecimiento y antimicrobianos en alimentación animal.

El objetivo principal de este capítulo consiste en el estudio del comportamiento de arcillas (caolines y sepiolitas) recubiertas de nanopartículas de plata, utilizadas como aditivos en alimentación de cerdos, a lo largo del proceso digestivo. Para ello, se llevarán a cabo estudios *in vitro* de la liberación de especies de plata en las distintas etapas del proceso digestivo y su interacción con enzimas digestivas. Este estudio se complementa con el análisis de tejidos de cerdos

procedentes de un estudio *in vivo* realizado para evaluar la retención tisular de plata. El análisis de muestras procedentes de procesos digestivos *in vitro* supone un incremento de la complejidad de las matrices respecto a otros casos estudiados en capítulos anteriores, así como de las posibles especies de plata presentes. La aplicación de la plataforma UF-ICPMS/SP-ICPMS/AF4-ICPMS se va a centrar en el uso de AF4-ICP-MS, utilizándose la ultrafiltración únicamente en estudios preliminares. En este capítulo se prescindirá del uso de SP-ICPMS debido a la dificultad para identificar las posibles nanopartículas de plata liberadas de las micropartículas de arcillas (tamaños en torno a los 20 nm), como por la posible detección no selectiva de dichas micropartículas a través de la plata presente en las mismas, tal y como hemos visto en el capítulo anterior.

1.5.2. EXPERIMENTAL

Instrumentación

Los instrumentos empleados se corresponden con los anteriormente descritos en la caracterización de las arcillas recubiertas con nanopartículas de plata (Apartado 1.3.2.).

Reactivos y estándares

Además de los reactivos descritos en el Apartado 1.3.2. también se empleó dihidrógeno fosfato de sodio monohidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.); fosfato disódico (Na_2HPO_4) (Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.); pepsina (Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.); hidróxido de sodio (NaOH) (Scharlau, Barcelona, España); pancreatina (Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.); ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Scharlau, Barcelona, España) y viscozyme (Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.).

Muestras

- Caolín Plateado Coloidal (caolín-Ag) y Sepiolita Plateada (sepiolita-Ag)

La descripción de estos materiales queda recogida en el Apartado 1.3.2.

- Muestras de ensayos *in vivo*

Se cuenta con muestras de tejidos de músculo e hígado de cerdos sometidos a una alimentación basada en piensos con nanomateriales de plata, vehiculados en caolín o sepiolita. Estas muestras fueron proporcionadas por el Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Zaragoza. Las muestras de músculo e hígado proceden de lechones alimentados con un pienso que contiene estos nanomateriales de plata. Además, se dispone de muestras de lechones control sin plata.

Se emplearon muestras procedentes de dos sacrificios distintos. El primer sacrificio tiene lugar a los 14 días. Se obtienen muestras de 18 animales diferentes (6 por tratamiento control, 6 por tratamiento con caolín-Ag y 6 por tratamiento con sepiolita-Ag). Transcurridos 35 días de experimento, los animales pasan a recibir una dieta común, libre de plata, durante 4 semanas. Finalizado este periodo, se toman de nuevo muestras de 18 animales en un segundo sacrificio.

Procedimientos

- Experimentos de liberación con caolín-Ag y sepiolita-Ag

Para realizar los experimentos de liberación se tomaron 125 mg de caolín-Ag o de sepiolita-Ag en cada caso y se pusieron en contacto con 50 mL de HCl 0,01 M (2,5 g L⁻¹), manteniéndose en agitación 2 horas a temperatura ambiente en ausencia de luz. Transcurrido este tiempo se tomaron 10 mL de las suspensiones y se centrifugaron a 1430 rpm para el caso del caolín-Ag y a 1808 rpm para la sepiolita-Ag, durante 10 min a 20°C. Las condiciones de centrifugación se fijaron, teniendo en cuenta la diferencia en la densidad de cada uno de los materiales (caolín-Ag: 2,6 g cm³; sepiolita-Ag: 2,0 g cm³), para eliminar partículas mayores a 0,5 µm.

- Experimentos de liberación *in vitro*: simulación de procesos digestivos

Con el fin de estudiar la liberación de plata en procesos digestivos, se han desarrollado ensayos *in vitro* en los que se diferencian tres etapas del mismo. La primera etapa consiste en una simulación de la digestión gástrica mediante pepsina y ácido clorhídrico. A esta etapa le sigue una simulación de la digestión intestinal mediante el uso de pancreatina en medio neutro. Finalmente, el proceso termina con la simulación de la actividad del intestino grueso mediante el empleo de

celulasas. Para estos ensayos de digestibilidad se sigue el procedimiento desarrollado por Boisen y Fernández [165], y que se describe en la Tabla 1.5.1.

Tabla 1.5.1. Medios empleados en cada una de las fases de los ensayos de digestibilidad *in vitro*.

FASE	DURACIÓN	PASOS
1	2 h	<ol style="list-style-type: none"> 1. 0,1 g de arcilla/frasco 2. 25 mL tampon pH 6,0 3. 10 mL 0,2 M HCl (ajustar a pH 2) 4. 1 mL de pepsina (25 g L⁻¹)
2	4 h	<ol style="list-style-type: none"> 1. 10 mL buffer pH 6,8 2. 5 mL 0,6 M NaOH (ajustar a pH 6,8) 3. 1 mL pancreatina (100 g L⁻¹)
3	18 h	<ol style="list-style-type: none"> 1. 10 mL 0,2 M EDTA (ajustar a pH 4,8) 2. 0,5 mL viscozyme

Todos los ensayos se realizaron en erlenmeyers de polipropileno (PP) de 250 mL con tapa. En estos ensayos con caolín-Ag y sepiolita-Ag se toman inicialmente 100 mg del material, de manera que la concentración inicial (Fase 1) en el medio resultante para cada una de las arcillas se sitúe en 2,8 g L⁻¹ (concentración estimada de plata en el sistema digestivo de acuerdo a la ingesta de plata dada a los cerdos correspondiente a 20 mg Ag/Kg pienso). También se realizaron ensayos *in vitro* con una adición inicial de 1 mg L⁻¹ de plata (I) para comprobar la recuperación de la misma a lo largo del procedimiento. Los erlenmeyer se introducen en una incubadora (OVAN, Barcelona, España) a 39 °C y se someten a una agitación de 99 rpm. Se pesan todos los erlenmeyers tras la adición de los reactivos en cada una de las fases para conocer en todo momento el volumen de trabajo.

Finalizada cada una de las etapas se toman 10 mL de las suspensiones y se centrifugan para tamaños de partícula menores a 0,5 μm . Debido a que las condiciones de los medios ya no se corresponden con las condiciones del agua ultrapura, es necesario llevar a cabo primero una medida de la viscosidad y de la densidad de las fases, para ajustar así la velocidad de la centrífuga. De esta forma, los ensayos *in vitro* realizados con caolín-Ag y con plata (I) fueron sometidos a 1500 rpm durante 10 min a 20 °C; para el caso de los ensayos con sepiolita-Ag la velocidad de la centrífuga se situó en 1900 rpm.

Las muestras fueron diluidas con HCl 5 % (v/v) antes de su cuantificación mediante ICPMS.

- Determinación de plata en tejidos de músculo e hígado

Para el estudio de la retención de plata en muestras de músculo e hígado, se someten previamente las muestras a un ataque ácido asistido por microondas. Las muestras se muelen manualmente hasta un diámetro de partícula menor a 1 mm. Se pesan 200 mg de muestra molida en un vaso de digestión de microondas y se le añaden 7 mL de HNO₃ concentrado y 3 mL de HCl. La digestión se realiza a 200°C y 800 psi durante 30 min. Con el fin de evitar la formación de AgCl insoluble, la digestión se lleva a cabo en presencia de un exceso de cloruro para estabilizar la plata como AgCl₄³⁻. Tras la digestión, el volumen se lleva a 50 mL con HCl 3% (v/v). Posteriormente se cuantifica el contenido total de plata a través de ICPMS.

- El resto de procedimientos se corresponden con los ya descritos en el Apartado 1.3.2.

1.5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.5.3.1. Determinación de la cantidad total de plata liberada en ensayos de liberación con caolín-Ag y sepiolita-Ag

Con el objetivo inicial de simular un proceso digestivo sencillo, se realizaron ensayos de liberación desde el caolín-Ag y la sepiolita-Ag en HCl 0,01 M y agitación durante 2 horas. En la Tabla 1.5.2. se recogen los resultados obtenidos en la cuantificación mediante ICPMS. En ella se muestra la concentración de plata total liberada por cada uno de los materiales en HCl 0,01 M. La última columna hace

referencia a la cantidad de plata liberada en el medio respecto a la cantidad de plata presente en el caolín-Ag o en la sepiolita-Ag, respectivamente. Asimismo, y para facilitar la comparación, en la Tabla 1.5.2. se muestran de nuevo los resultados obtenidos para los ensayos de liberación en agua ultrapura de estos materiales.

Tabla 1.5.2. Concentración de plata liberada desde el caolín-Ag y la sepiolita-Ag en diferentes medios.

Muestra	Medio	Tiempo agitación	Concentración de plata / mg L ⁻¹	% Ag total liberada
Caolín-Ag	Agua ultrapura	24 h	10,60 ± 0,51	40 ± 2
	HCl 0,01 M	2 h	0,233 ± 0,042	0,9 ± 0,2
Sepiolita-Ag	Agua ultrapura	24 h	6,72 ± 0,19	48 ± 2
	HCl 0,01 M	2 h	0,169 ± 0,036	1,2 ± 0,3

De los resultados anteriores se ve una influencia importante del medio empleado, obteniendo una mayor liberación de plata total en las muestras puestas en disolución con agua ultrapura frente a las de HCl 0,01 M, donde en ambos casos la cantidad de plata liberada es del orden del 1 % de la presente en el material original.

Para diferenciar el posible efecto del medio sobre la estabilidad y formas de la plata en medio clorhídrico, se realizó un ensayo adicional en el que el ensayo de liberación durante 24 horas se realizó en agua ultrapura, y posteriormente se acidificó de forma que el medio final resultante fuera HCl 0,01 M. Posteriormente se procedió a la centrifugación de las disoluciones liberadas con corte a 0,5 µm. Los resultados obtenidos fueron similares a los de los ensayos en agua ultrapura, por lo que el efecto sobre la plata liberada se produce durante la liberación (probablemente debido a la formación de AgCl en la superficie del material). Para confirmar esta hipótesis se analizaron mediante FESEM los materiales tras someterlos al proceso de lixiviación en HCl durante 2 horas. Las imágenes obtenidas se muestran en la Figura 1.5.1., donde se comparan además con las obtenidas anteriormente para los materiales originales.

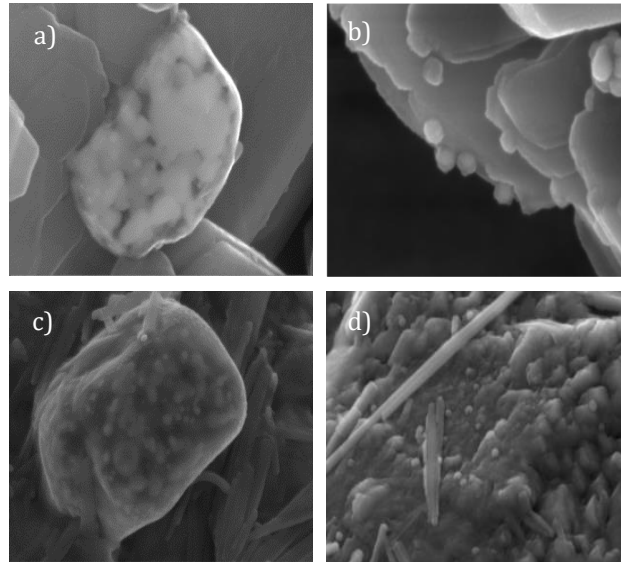


Figura 1.5.1. Imágenes FESEM de las disoluciones liberadas por (a) caolín-Ag y (c) sepiolita-Ag en HCl 0,01 M (x140740); así como de los materiales originales (b) caolín-Ag (x190570) y (d) sepiolita-Ag (x103360).

En las imágenes se pueden observar nanopartículas agregadas en cuya composición se detecta Ag y Cl (de acuerdo al análisis por EDX), lo que sugiere la formación de agregados con AgCl sobre la superficie de ambas arcillas al entrar en contacto con HCl.

1.5.3.2. Determinación de la cantidad de plata liberada en procesos digestivos *in vitro*

Una vez realizados los ensayos de lixiviación en HCl 0,01 M durante 2 horas, se llevan a cabo estudios de liberación de plata en cada una de las fases de ensayos de digestibilidad *in vitro*, con el fin de conocer el comportamiento de los nanomateriales en los mismos.

Inicialmente, se realizó la cuantificación de plata, sin adición de material ni de plata iónica. El objetivo era controlar los niveles de blanco que se obtienen con los reactivos empleados en cada una de las fases (2 h, 6 h, 24 h) que conforman los ensayos. En la Tabla 1.5.3. se muestran los contenidos de plata presentes en cada

uno de los medios. Se observa que los niveles de plata son del orden de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ o menores. Los valores más altos de plata se encuentran en la última fase (Fase 3); mientras que los medios correspondientes a la Fase 2 quedan por debajo del límite de cuantificación.

Tabla 1.5.3. Concentración de plata total en los medios utilizados en cada una de las fases del ensayo de digestibilidad.

Tratamiento	Fase	Ag total / $\mu\text{g L}^{-1}$
Blanco Medio	1	$0,868 \pm 0,116$
	2	< LQ
	3	$1,013 \pm 0,122$

Asimismo, se realizó un ensayo en el que se añadió inicialmente 1 mg L^{-1} de plata (I) para comprobar la recuperación de la misma como plata disuelta a lo largo del proceso. En la Tabla 1.5.4. se recogen los porcentajes de plata (I) presente en la fracción $< 0,5 \mu\text{m}$ (equivalente a la fracción disuelta) a lo largo de las distintas fases del ensayo de digestibilidad. La primera columna hace referencia a la cantidad de plata total recuperada en el medio respecto a la cantidad de plata añadida inicialmente. La segunda columna indica la cantidad de plata presente en la fracción ultrafiltrada ($< 3 \text{ kDa}$) respecto a la cantidad de plata añadida inicialmente. Finalmente, la última columna muestra el porcentaje de plata ultrafiltrada respecto a la cantidad total de plata medida.

Tabla 1.5.4. Recuperación de plata en cada una de las fases del ensayo de digestibilidad. Cantidad añadida inicialmente: 1 mg L^{-1} de plata (I).

Tratamiento	Fase	% Ag total recuperada	% Ag UF. recuperada	% Ag UF. vs. Ag total
Ag (I) 1 mg L^{-1}	1	$51,17 \pm 0,47$	$14,29 \pm 1,97$	$27,95 \pm 4,10$
	2	$95,60 \pm 2,48$	$17,33 \pm 2,55$	$18,17 \pm 3,14$
	3	$90,82 \pm 3,30$	$50,23 \pm 1,99$	$55,39 \pm 4,20$

Excepto en la Fase 1, las recuperaciones de plata total fueron próximas al 100 %. El ensayo de ultrafiltración se realizó con el fin de cuantificar la fracción

iónica de plata presente en cada una de las fases. En la Figura 1.5.2. se muestran estos resultados en forma de gráfico de barras.

De los datos anteriores se deduce que, debido a la presencia de cloruros en la Fase 1, parte de plata no se recupera al encontrarse en forma de AgCl, probablemente de tamaño mayor a $0,5 \mu\text{m}$. Por otro lado, no toda la plata se encuentra en forma iónica o formando complejos de masa molecular inferior a 3 kDa. Teniendo en cuenta que la masa molecular de la pepsina empleada en la Fase 1 es de 35 kDa y que la pancreatina empleada en la Fase 2 resulta ser una mezcla de diversas enzimas digestivas (amilasa, lipasa, proteasa, tripsina, ribonucleasa), los posibles complejos que se formen con la plata (I) adicionada quedarán retenidos por la membrana del ultrafiltro. En la Fase 3 se observa un aumento en el porcentaje de plata ultrafiltrada, el cual puede estar relacionado con el cambio de pH del medio y la formación de complejos de Ag^+ con EDTA (complejos < 3 kDa, que atravesarían la membrana de los ultrafiltros). En esta fase, los complejos de plata (I) con las distintas carbohidrasas presentes en el viscozyme (arabanasa, celulasa, β -glucanasa, hemicelulasa y xilanasas) quedarían retenidos en la membrana.

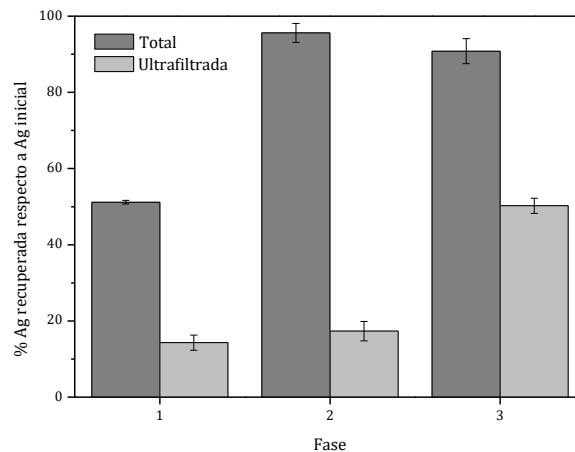


Figura 1.5.2. Gráfico de barras correspondiente al porcentaje de plata recuperada en cada una de las fases de un proceso digestivo *in vitro* tras la adición inicial de 1 mg L^{-1} de plata (I).

Posteriormente, se llevaron a cabo los ensayos para la cuantificación de plata movilizada desde el caolín-Ag y la sepiolita-Ag a lo largo del proceso de

digestión *in vitro*. La cantidad de caolín-Ag o de sepiolita-Ag inicial era de 2,8 g L⁻¹, por lo que teniendo en cuenta el porcentaje de plata presente en cada uno de los materiales (1 % y 0,56 %, respectivamente), la cantidad de plata inicial puesta en los ensayos de digestión se corresponde con 28 mg L⁻¹ para el caso del caolín-Ag y 16 mg L⁻¹ para la sepiolita-Ag. En este caso se habla de movilización, ya que parte de la plata liberada del material puede precipitar como AgCl, pudiendo no ser cuantificada en la fracción < 0,5 µm. En la Tabla 1.5.5. se muestran los valores obtenidos en estos ensayos. La primera y segunda columnas hacen referencia al porcentaje de plata total y ultrafiltrada movilizada en el medio, respectivamente, respecto al contenido total de Ag en el material original. La plata total es la plata presente en la fracción < 0,5 µm, y la ultrafiltrada la plata determinada en el ultrafiltrado de la fracción < 0,5 µm. La fracción total estaría compuesta por Ag⁺, complejos de Ag (I), nanopartículas de plata y micropartículas de arcillas u otros precipitados de plata (I) con tamaños inferiores a 0,5 µm. La fracción ultrafiltrada estaría compuesta por las especies de plata menores a 3 kDa. Finalmente, la última columna muestra el porcentaje de plata ultrafiltrada respecto a la cantidad total de plata movilizada. En la Figura 1.5.3. se muestran estos resultados en forma de gráfico de barras.

Tabla 1.5.5. Cantidad de plata movilizada en cada una de las fases del ensayo de digestibilidad respecto a la total contenida inicialmente en el material utilizado en el ensayo. Concentración de caolín-Ag o sepiolita-Ag añadida inicialmente: 2,8 g L⁻¹.

Tratamiento	Fase	% Ag total movilizada*	% Ag UF. movilizada*	% Ag UF. vs. Ag total movilizada
Caolín-Ag	1	0,88 ± 0,05	0,38 ± 0,01	43,37 ± 3,02
	2	17,21 ± 0,13	0,82 ± 0,10	4,75 ± 0,64
	3	10,16 ± 0,71	1,94 ± 0,05	19,15 ± 1,79
Sepiolita -Ag	1	1,31 ± 0,10	0,78 ± 0,02	59,64 ± 6,19
	2	4,51 ± 0,25	1,67 ± 0,03	37,18 ± 1,38
	3	7,31 ± 0,07	3,81 ± 0,16	52,07 ± 1,69

En los ensayos con caolín-Ag se observó una baja movilización de plata en

la primera fase del proceso; encontrándose concentraciones de plata del orden de $260 \mu\text{g L}^{-1}$. Esto puede estar relacionado con la presencia de cloruros procedentes del medio utilizado. Los porcentajes de plata total medidos en esta fase están de acuerdo con los valores obtenidos en ensayos anteriores de liberación de plata en HCl 0,01 M ($0,9 \pm 0,2 \%$) (Apartado 1.5.3.1. – Tabla 1.5.2.). En la segunda fase del proceso se observa un aumento en la proporción de plata movilizada, que podría deberse a la redisolución de parte del AgCl precipitado en la Fase 1, aunque este porcentaje vuelve a disminuir en la Fase 3.

En el caso de la sepiolita-Ag, la movilización de plata aumenta conforme se suceden las distintas fases del proceso digestivo. Este aumento podría estar relacionado con una solubilización progresiva del AgCl precipitado en la Fase 1, con una liberación de plata diferenciada en función del medio de cada una de las fases, justificado por la capacidad de intercambio catiónico del material, o con una posible redisolución del AgCl formado sobre la superficie del material. Asimismo, esta liberación gradual de plata podría estar relacionada con la menor accesibilidad del material; en cuanto a su estructura pseudolaminar con canales, que podría justificar el menor efecto del HCl de la Fase 1, dejando un mayor porcentaje de plata (I) disponible. Al igual que lo observado en el caso del caolín-Ag, el porcentaje de plata total medido en la Fase 1 está de acuerdo con los valores anteriormente obtenidos en los ensayos en HCl 0,01 M ($1,2 \pm 0,2 \%$).

Por tanto, se observa una baja movilización de plata en la Fase 1, independientemente del material de arcilla empleado, tal y como sucedía en lo estudiado en medios de HCl 0,01 M. Por su parte, en las Fases 2 y 3 existe en ambos casos un aumento de la plata total movilizada, con diferencias entre los dos materiales, aunque siempre por debajo de lo movilizado en agua ultrapura tras 24 horas ($40 \pm 2 \%$ y $48 \pm 1 \%$ para caolín-Ag y sepiolita-Ag, respectivamente). En estos dos medios, se observan además diferencias apreciables entre los dos materiales para la cantidad de plata ultrafiltrada.

El hecho de que la movilización/liberación de plata sea mayor por parte del caolín-Ag respecto a la sepiolita-Ag estaría relacionado con el mayor porcentaje de liberación de plata (I) observado anteriormente en agua para el caolín-Ag ($91 \pm 5 \%$ vs. $53 \pm 2 \%$). En cuanto al porcentaje de plata asociada a la fracción $< 3 \text{ kDa}$ se observa un aumento desde la Fase 1 a la Fase 3, aunque esta cantidad de plata es relativamente baja respecto a la cantidad de plata total en el material original. El

aumento de ese porcentaje en la Fase 3 podría estar relacionado con el cambio del pH del medio y la presencia de EDTA en el mismo.

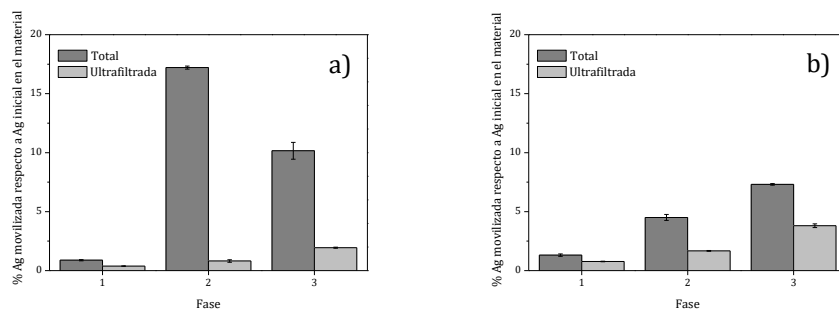


Figura 1.5.3. Gráficos de barras correspondientes al porcentaje de plata movilizada desde (a) caolín-Ag y (b) sepiolita-Ag en cada una de las fases de un proceso digestivo *in vitro* tras la adición inicial de 2,8 mg L⁻¹ de material.

Con estos resultados no se pudo establecer diferencias entre la plata en forma de AgCl, AgNPs o Ag unida a enzimas formando complejos mayores de 3 kDa, por lo que se hizo uso del AF4 para obtener mayor información.

1.5.3.3. Detección y caracterización de especies de plata liberadas desde el caolín-Ag en ensayos *in vitro* mediante AF4-UV-Vis-ICPMS

Con el objetivo de obtener más información sobre las formas de plata movilizadas en los ensayos de digestibilidad *in vitro*, las suspensiones (fracción > 3 kDa) fueron analizadas mediante AF4-UV-Vis-ICPMS. En este caso se inyectaron directamente en el sistema 100 µL de las muestras correspondientes a la Fase 2 y a la Fase 3 del proceso digestivo con el caolín-Ag. Se escogió este material respecto a la sepiolita-Ag debido a la mayor cantidad de plata movilizada observada en los ensayos de cuantificación (Apartado 1.5.3.2). La Fase 1 no fue inyectada ya que como se ha visto anteriormente, la mayor parte de la plata se encontraba precipitada como AgCl.

Los ensayos de ultrafiltración mostraban que el 5 % y el 19 % de la plata movilizada por el caolín-Ag en las Fases 2 y 3, respectivamente, se correspondía con plata o complejos de plata menores de 3 kDa; el resto de plata estaría formando complejos macromoleculares con alguno de los componentes del medio, aunque la

presencia de nanopartículas de plata y/o AgCl coloidal < 0,5 μm no podía ser descartada. En la Figura 1.5.4. se muestran los fractogramas obtenidos para las Fases 2 y 3 del proceso digestivo del caolín-Ag, siguiendo el programa A descrito en la Tabla 1.3.1. Asimismo, se muestran las señales recogidas a 254 nm, 290 nm y 405 nm mediante UV-Vis. En la Figura 1.5.5. se comparan estos fractogramas con los anteriormente obtenidos para el caolín-Ag en agua ultrapura.

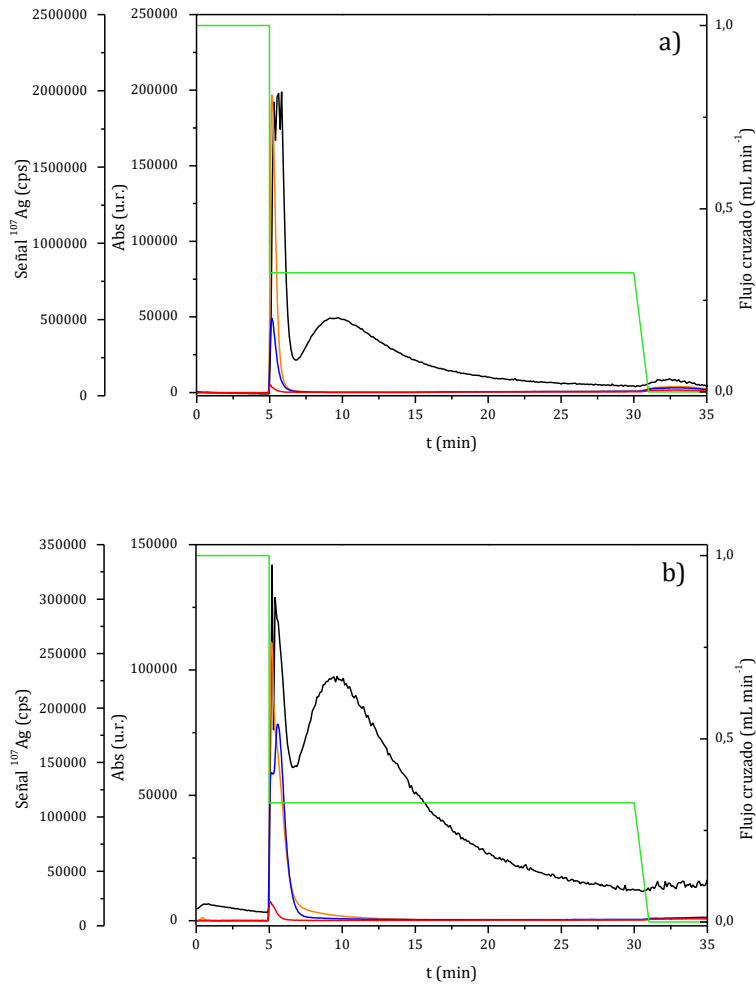


Figura 1.5.4. Fractogramas correspondientes a la suspensión obtenida a partir de caolín-Ag en la (a) Fase 2 y (b) Fase 3 del proceso digestivo in vitro. Negro señal de ^{107}Ag medida en ICPMS. Naranja señal UV-Vis a 254 nm. Azul señal UV-Vis a 290 nm. Rojo señal UV-Vis a 405 nm. Verde flujo cruzado aplicado.

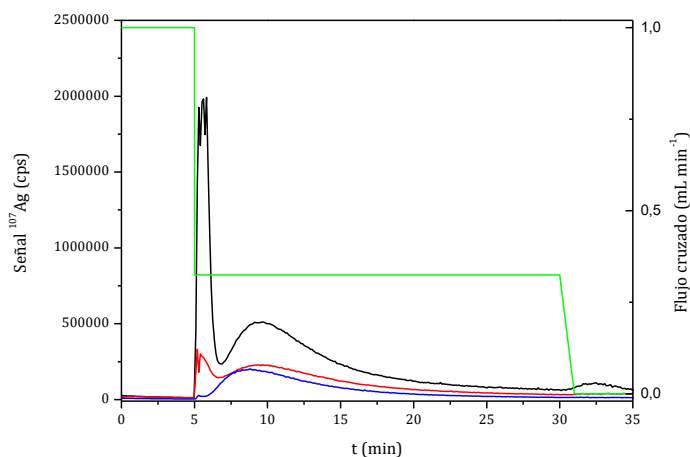


Figura 1.5.5. Comparación de los fractogramas correspondientes a la suspensión obtenida a partir de caolín-Ag en agua ultrapura (azul), en la Fase 2 (negro) y Fase 3 (rojo) de un proceso digestivo *in vitro*. Verde flujo cruzado aplicado.

Los fractogramas anteriores (Figura 1.5.4) tienen ambos un perfil similar con dos picos diferentes no resueltos, aunque en el caso de la Fase 2 la cantidad de plata detectada es mayor, tal y como se había visto anteriormente en el Apartado 1.5.3.2. En este caso, los dos fractogramas muestran uno de los máximos de señal a los 9,65 min. Estas señales recuerdan al perfil observado para el caolín-Ag en agua ultrapura, donde el máximo se situaba a los 8,8 min (Figura 1.5.5.). Esta señal podría estar relacionada con nanopartículas de plata mayores de 20 nm, con micropartículas del material asociadas a plata o AgCl coloidal; pero al igual que sucedía en el caolín-Ag en agua ultrapura (Apartado 1.3.3.5. – Figura 1.3.7.), no se observó para estos tiempos de retención la señal del efecto plasmón característico de las nanopartículas de plata en UV-Vis, por lo que la naturaleza de esta señal no pudo ser confirmada. Al inicio de los fractogramas de las dos fases aparece una gran señal de plata asociada a complejos de plata con materia orgánica presente en el medio.

Para tratar de dilucidar la naturaleza de estas señales se inyectaron en el sistema estas dos fases digestivas (Fase 2 y 3) empleando el programa de separación B descrito en la Tabla 1.3.1. En este programa el flujo cruzado empleado

es mayor que el correspondiente al programa A. En la Figura 1.5.6. se muestran los fractogramas obtenidos para las Fases 2 y 3 del proceso digestivo del caolín-Ag, siguiendo el programa B; así como las señales UV-Vis recogidas a 254 nm, 290 nm y 405 nm. En la Figura 1.5.7. se comparan estos fractogramas con los anteriormente obtenidos para el caolín-Ag en agua ultrapura. Finalmente, la Figura 1.5.8. muestra una comparación de los fractogramas de ambas fases para los dos programas de separación empleados en AF4.

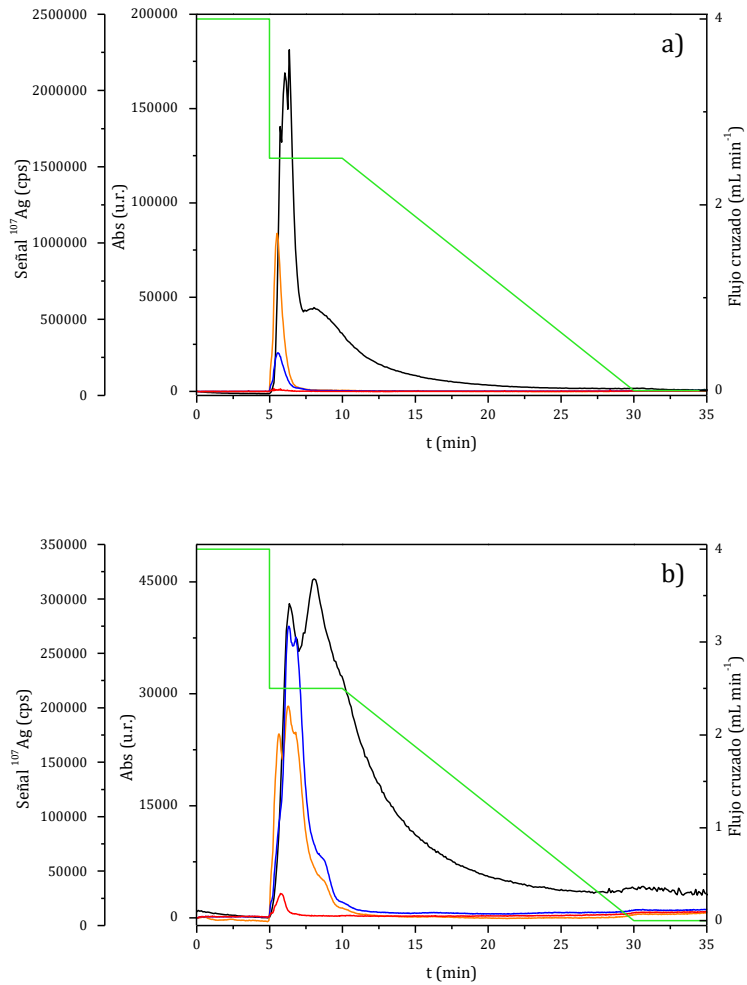


Figura 1.5.6. Fractogramas correspondientes a la suspensión obtenida a partir de caolín-Ag en la (a) Fase 2 y (b) Fase 3 del proceso digestivo *in vitro*. Negro señal de ^{107}Ag medida en ICPMS. Naranja señal UV-Vis a 254 nm. Azul señal UV-Vis a 290 nm. Rojo señal UV-Vis a 405 nm. Verde flujo cruzado aplicado.

En este caso, los fractogramas obtenidos para ambas fases ya no tienen perfiles similares entre sí. Para la Fase 2 se sigue manteniendo el perfil observado anteriormente, en el que se diferenciaban dos picos no resueltos entre sí. Se observa una gran señal de plata al principio del fractograma (asociado a materia orgánica) y una segunda señal a los 8,06 min que se correspondería al observado anteriormente a 9,65 min. Mientras que los primeros picos se eluyen a tiempos mayores al utilizar este programa de separación de flujo cruzado alto, el tiempo de elución de esta segunda señal sufre un adelanto de 1,5 min respecto a lo obtenido anteriormente a través del programa A, al igual que ocurría en el caso del caolín-Ag en agua ultrapura. Como ya se ha comentado en el Apartado 1.3.3.5., en AF4 valores más altos de flujo cruzado implican mayores tiempos de retención para una misma sustancia eluida en modo normal; por lo que aparentemente este segundo pico se eluiría en modo estérico, y correspondería a especies de gran tamaño (mayores a 1 μm).

En la Fase 3 se observan dos picos no resueltos a 6,36 min y 8,06 min, y un ligero hombro a 9,43 min. La señal del primer pico estaría asociada a complejos de plata con materia orgánica del medio, tal y como reflejan las señales de UV-Vis.

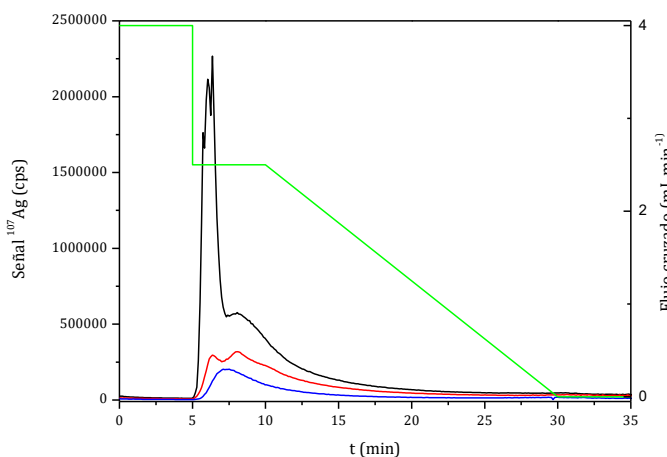


Figura 1.5.7. Comparación de los fractogramas correspondientes a la suspensión obtenida a partir de caolín-Ag en agua ultrapura (azul), en la Fase 2 (negro) y Fase 3 (rojo) de un proceso digestivo *in vitro*. Verde flujo cruzado aplicado.

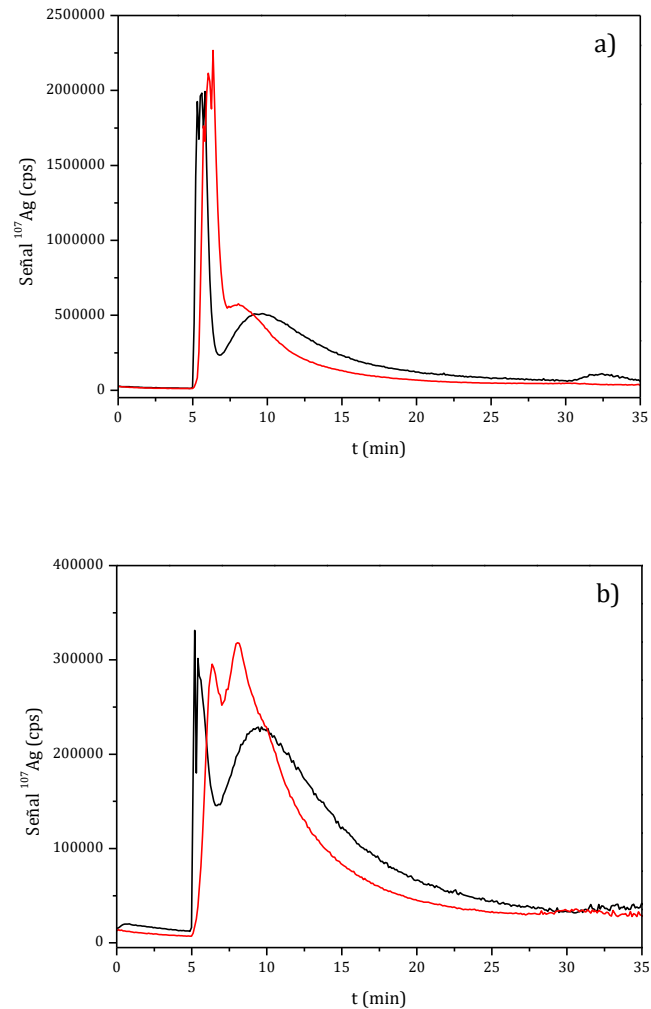


Figura 1.5.8. Fractogramas correspondientes a suspensión obtenida a partir de caolín-Ag en la (a) Fase 2 y (b) Fase 3 del proceso digestivo *in vitro* al aplicar el programa de separación A de flujo cruzado bajo (negro) o el programa de separación B de flujo cruzado alto (rojo).

De estos resultados se podría confirmar la existencia de dos poblaciones diferenciadas de las diversas formas en las que puede encontrarse la plata en suspensión tras los ensayos de digestibilidad en las Fases 2 y 3. Por un lado, una plata aparentemente unida a moléculas orgánicas (enzimas presentes en el medio con masas moleculares mayores de 3 kDa), y por otro lado, una fracción que aparentemente no se correspondería a AgNPs (no se observa señal de efecto

plasmón), y de mayor tamaño. Al igual que lo observado en la caracterización de los materiales en agua ultrapura, esta fracción podría estar relacionada con plata asociada a micropartículas del material que podrían permanecer en suspensión o incluso formarse en el medio de elución del sistema AF4. La inversión en el orden de elución observado al aplicar un programa de flujo cruzado mayor, confirmaría que se trata de especies de gran tamaño ($> 1 \mu\text{m}$). En cuanto a su naturaleza, se podría pensar en la misma naturaleza que en el caso de los lixiviados en agua, donde aparentemente se producía una distorsión en las formas físico-químicas en las que se encontraba la plata en el medio por cambios en el pH al entrar en contacto con la disolución portadora; sin embargo, aquí los pH de los medios no son básicos como ocurría en el caso del agua, sino que son más bien neutros (fase 2) o ácidos (fase 3) y, por tanto, el cambio no debería ser tan significativo respecto al del portador. También podría tratarse de compuestos insolubles como AgCl, aunque su densidad ($5,56 \text{ g cm}^3$) es mayor que la del caolín-Ag, y por tanto, en la centrifugación llevada a cabo para realizar el corte a $< 0,5 \mu\text{m}$ se eliminarían incluso los de menor tamaño.

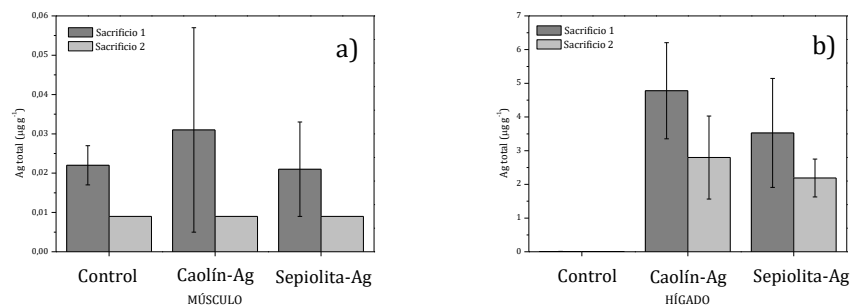
1.5.3.4. Determinación de plata total en tejidos de músculo e hígado de cerdos tratados con caolín-Ag y sepiolita-Ag

Para la determinación de plata en tejidos de músculo e hígado de cerdo se emplearon muestras procedentes de dos sacrificios distintos, tal y como se describe en el Apartado 1.5.2. En el primero de ellos, los animales habían estado durante 14 días con una dieta basada en el uso de caolín-Ag o sepiolita-Ag. En el segundo de ellos, y transcurridos 35 días de experimento, los animales pasaron a recibir una dieta común, libre de plata, durante 4 semanas antes de llevar a cabo su sacrificio.

Los resultados individuales procedentes de los análisis de las distintas muestras mediante ICPMS quedan recogidos en el Anexo 2. En la Tabla 1.5.6. se muestra una comparación de los resultados obtenidos. En la Figura 1.5.9. se representan estos resultados en formas de gráfico de barras.

Tabla 1.5.6. *Contenidos de Ag total en músculo e hígado de cerdos, $\mu\text{g g}^{-1}$.*

	Tratamiento	Sacrificio 1	Sacrificio 2
MÚSCULO	Control	0,020 \pm 0,007 (n = 5)	< 0,009 (n = 6)
	Caolín-Ag	0,031 \pm 0,026 (n = 4)	< 0,009 (n = 6)
	Sepiolita-Ag	0,022 \pm 0,005 (n = 4)	< 0,009 (n = 6)
HÍGADO	Control	< 0,009 (n = 2)	< 0,009 (n = 4)
	Caolín-Ag	4,780 \pm 1,428 (n = 6)	2,798 \pm 1,232 (n = 5)
	Sepiolita-Ag	3,527 \pm 1,616 (n = 6)	2,189 \pm 0,562 (n = 5)

**Figura 1.5.9.** *Gráficos de barras correspondientes a la cantidad de plata total encontrada en (a) músculos e (b) hígados de cerdo ($\mu\text{g g}^{-1}$) para cada uno de los sacrificios.*

De los resultados anteriores se observa que los valores de concentración de plata en los músculos de cerdos sacrificados tras ser sometidos al tratamiento con caolín-Ag o sepiolita-Ag (sacrificio 1) son similares a los observados en los animales control. A pesar de que los niveles encontrados estaban por encima de los límites de detección, la plata detectada debe asociarse a problemas de contaminación en la obtención/tratamiento de las muestras. Estos problemas no se observaron en el sacrificio 2, ni en las muestras control de hígado.

En el caso de cerdos sacrificados tras cuatro semanas de suspenderse el tratamiento con plata (sacrificio 2), los niveles de plata en músculo son equivalentes a los encontrados en los controles, estando por debajo del límite de detección.

En todos los casos se observa una mayor retención de plata en el hígado respecto al músculo. Asimismo, aunque el caolín-Ag proporciona una mayor

cantidad de plata retenida en los tejidos respecto a la sepiolita-Ag, al llevar a cabo un test estadístico t con un nivel de confianza del 95 %, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los casos.

Por otra parte, se observa una disminución del contenido de plata en hígado de los animales sometidos a una segunda dieta sin plata durante cuatro semanas. Las diferencias en este caso sí son significativas en el caolín-Ag, pero no para la sepiolita-Ag.

1.5.4. CONCLUSIONES

Dada la complejidad de las muestras analizadas, la determinación de contenidos totales y de fracciones ultrafiltrables de plata en las muestras procedentes de las distintas etapas digestivas ha permitido obtener información orientativa de interés para su posterior análisis mediante AF4-ICPMS, poniéndose de manifiesto las fortalezas y limitaciones de la plataforma metodológica.

De acuerdo a los ensayos realizados se puede concluir que los materiales utilizados como soportes de nanopartículas de plata, y que se emplean como aditivos en alimentación animal (caolín-Ag y sepiolita-Ag), presentan diferencias en cuanto a la liberación de la plata según el medio en el que se encuentren.

De los ensayos en medio clorhídrico, se deduce que hay una menor liberación de plata al medio, respecto a lo que se obtiene en agua ultrapura, debido a la precipitación de plata (I) en forma de AgCl sobre la superficie del material (tanto caolín-Ag como sepiolita-Ag), tal y como muestran las imágenes de microscopía electrónica.

El ensayo de digestibilidad *in vitro* pone de manifiesto que, a pesar de que parte de la plata liberada pueda precipitar en la Fase 1 (digestión gástrica), a lo largo de la Fase 2 y 3 (digestión intestinal) se incrementa la fracción de plata movilizada, haciéndolo en mayor proporción a partir del caolín-Ag que de la sepiolita-Ag. Los análisis mediante AF4-ICPMS permitieron confirmar la presencia de dos poblaciones distintas de especies que contienen plata en las fases 2 y 3, una asociada con moléculas orgánicas procedentes de los medios y otra fracción de mayor tamaño, de la que no se ha podido establecer su naturaleza.

La evaluación de la retención tisular de plata a partir de muestras de

músculo e hígado procedentes de estudios *in vivo*, muestra que se produce una mayor retención de plata en hígado que en músculo. En el caso del músculo, a las cuatro semanas de suprimir la dieta con aditivo, los niveles de plata se sitúan por debajo de los límites de detección ($<9 \mu\text{g Kg}^{-1}$). En el caso del hígado, existe una mayor retención de plata para caolín-Ag que para sepiolita-Ag, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas. Este comportamiento podría asociarse a la mayor liberación de plata a lo largo del proceso digestivo para el caolín-Ag. La eliminación del aditivo en la dieta da lugar a una reducción de los niveles de plata en hígado. Esta diferencia entre un sacrificio y otro fue estadísticamente significativa en el caso de caolín-Ag, pero no así en el caso de la sepiolita-Ag.

1.6. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN CÉLULAS UTILIZADAS EN ENSAYOS DE NANOTOXICIDAD

1.6.1. INTRODUCCIÓN

Debido al rápido crecimiento de la nanotecnología, la preocupación sobre su riesgo y toxicidad en la salud humana y el medio ambiente ha aumentado. Para ocuparse de este problema, la nanotoxicología se ocupa del estudio de la toxicidad de los nanomateriales sintéticos. La mayoría de los trabajos sobre los riesgos de las nanopartículas se hacen a través de estudios de toxicidad estándar. Sin embargo, debido a las propiedades que poseen las nanopartículas, principalmente relacionadas con su tamaño, pero también a otros parámetros físicos y químicos, es necesario hacer modificaciones en los protocolos de estos ensayos. Los parámetros mínimos recomendados para la caracterización de estudios nanotoxicológicos incluyen [166]: distribución en tamaño de la partícula, estado de agregación/aglomeración, forma, composición global y superficial, pureza, área y carga superficial, y, en el caso de nanopartículas metálicas, la estabilidad, incluyendo la liberación de material a través de procesos de disolución [167]. Estas consideraciones se hacen especialmente importantes en sistemas *in vitro* ya que las nanopartículas pueden mostrar fuertes interacciones con el medio de cultivo. Cuando las nanopartículas entran en contacto con un medio biológico y/o con células, éstas pueden sufrir procesos de oxidación [11] o cambios en su estado de agregación [168], debido a la fuerza iónica del medio. Estos procesos pueden afectar a la citotoxicidad de las nanopartículas [168].

Los estudios realizados con nanopartículas de plata indican que la toxicidad puede estar relacionada tanto con las propiedades específicas de las nanopartículas, como a los efectos de los iones plata liberados desde las mismas [85]. La identificación y caracterización de AgNPs en células sometidas a ensayos de citotoxicidad con nanopartículas, resulta ser una tarea complicada, ya que las nanopartículas pueden haber sufrido distintos procesos en el interior de las células que dificulten su identificación [169]. Por una parte, las AgNPs pueden liberar iones plata que contribuyan a los mecanismos de toxicidad. La liberación de iones desde

las nanopartículas puede depender de diversos factores, entre los que se encuentra el tamaño de las nanopartículas [170]. Una menor liberación de plata (I) podría estar relacionada con una alta velocidad de aglomeración de las AgNPs en el medio celular. Aglomerados de nanopartículas, con un área superficial menor, mostrarían una liberación de iones reducida, en comparación con las nanopartículas primarias, de mayor área de superficie reactiva [171]. La aglomeración puede afectar a la capacidad de las AgNPs para interactuar con las células. Por su parte, las nanopartículas se pueden asociar a la membrana celular, favoreciendo la internalización de algunas de estas partículas en las células [172]. La presencia de AgNPs en el interior de dos líneas celulares de estudio (A549 y HepG2) ha sido demostrada mediante análisis TEM [173].

La separación y caracterización de nanopartículas por FFF en alimentos y muestras medioambientales fue revisada por von der Kammer y col. [22] en 2011. Desde entonces, se han desarrollado un gran número de aplicaciones a muestras complejas, entre las que se incluyen muestras biológicas [144,174–181]. En la mayor parte de los casos, se necesita un pretratamiento de la muestra para la puesta en disolución de las nanopartículas o para la degradación de la matriz antes de llevar a cabo la separación por FFF [31]. En ocasiones, este proceso de digestión puede conducir a que las nanopartículas presentes en la muestra se asocien a restos sin solubilizar de la matriz y no permita una correcta separación de las mismas [174].

Frente a los casos estudiados en los capítulos anteriores, donde el objetivo último era detectar, caracterizar y/o cuantificar nanopartículas y otras especies de plata (I) liberadas a partir de distintos nanomateriales, en este capítulo el objetivo principal se centra en la identificación y caracterización de nanopartículas de plata presentes en células utilizadas en ensayos de nanotoxicidad. Por otro lado, teniendo en cuenta que las nanopartículas de plata en el nanomaterial utilizado presentan tamaños por debajo de los 20 nm y que la posible plata (I) podrá estar asociada a distintas macromoléculas, la aplicación de la plataforma UF-ICPMS/SP-ICPMS/AF4-ICPMS se limitará al uso de AF4-ICPMS. Con estos condicionantes, los objetivos específicos se centran en:

- Establecer una estrategia alternativa al ataque ácido para la digestión de las células manteniendo la integridad de las

nanopartículas de plata, para lo que se propone el uso del hidróxido de tetrametilamonio (TMAH).

- Desarrollar un procedimiento basado en el uso de la técnica de separación AF4 acoplada a UV-Vis e ICPMS para la identificación y caracterización de las nanopartículas de plata, así como de otras especies de plata presentes.

1.6.2. EXPERIMENTAL

Instrumentación

Para la detección y determinación del contenido de plata se empleó un espectrómetro ICPMS ELAN DRC-e (Perkin Elmer, Toronto, Canadá) equipado con un nebulizador concéntrico de vidrio y una cámara de nebulización ciclónica.

Se utilizó un equipo de Fraccionamiento en Flujo mediante Campo de Flujo Asimétrico (AF4) AF2000 (Postnova Analytics, Landsberg, Alemania).

Para las imágenes obtenidas a través de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) se empleó un JEOL-2000 FXII (JEOL, Tokio, Japón). Las imágenes se grabaron utilizando una cámara GATAN CCD. El microscopio estaba además equipado con un sistema de dispersión de energía de rayos X INCA 200 X-Sight (Oxford Instruments, Abingdon, Reino Unido) para el análisis elemental y la localización de elementos en las muestras. Las rejillas de cobre se prepararon con un recubrimiento de una fina lámina de carbono. Se depositaron en torno a 10 μ L de cada muestra medida en la rejilla y se dejaron secar completamente, repitiendo este procedimiento cinco veces.

Reactivos y estándares

El portador empleado en las separaciones mediante AF4 fue una disolución de dodecilsulfato sódico (SDS) (BioRad, California, EE.UU.) 0,01 % (m/V) preparada en agua ultrapura (Milli-Q Advantage, Molsheim, Francia) y ajustada a pH = 8. Para su filtración se utilizaron filtros de membrana de nylon con tamaño de poro de 0,2 μ m (Millipore, Billerica, EE.UU.). Este portador fue desgasificado mediante un desgasificador a vacío colocado en línea antes de las bombas.

Las disoluciones de plata (I) se prepararon a partir de una disolución de estándar comercial de 1000 mg L⁻¹ (Panreac, Barcelona, España). Por su parte, las disoluciones de nanopartículas de plata correspondientes se prepararon a partir de estándares comerciales con diámetros nominales de 10 nm (PlasmaChem, Berlín, Alemania), 20 ± 5, 40 ± 5 y 60 ± 5 nm (BBInternational, Cardiff, Reino Unido). Se emplearon también disoluciones de Colargol (Laboratorios Argenol S.L., España) preparadas a partir de polvo comercial.

Además se utilizó HNO₃ 69,0-70,0 % y HCl 36,5-38,0% (Baker Instra Analyzed for Trace Metals Analysis, J.T. Baker, Holanda); hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) (Alfa Aesar - 25% w/w aq. soln., electronic grade, Karlsruhe, Alemania); L-cisteína (Aldrich, St. Louis, EE.UU.); Triton™ X-100 (Aldrich, St. Louis, EE.UU.).

Todas las disoluciones y suspensiones se prepararon por pesada en una balanza analítica GH-200 (A&D, California, EE.UU.) con una precisión de ± 0,1 mg. Las muestras fueron sonicadas durante 1 min justo antes de cada medida.

Muestras

- Descripción del Colargol

El Colargol, N^o CAS: 9007-35-6, fue proporcionado por el fabricante (Laboratorios Argenol S.L., España) como un polvo granulado. El Colargol es también conocido como plata coloidal y está descrito en la farmacopea europea como un fuerte antiséptico. Su contenido en plata está entre el 68-70 % (m/m), en su mayor parte en forma de nanopartículas de 14-17 nm de diámetro. El resto del contenido del producto es materia orgánica procedente del proceso de síntesis de las nanopartículas. Esta materia orgánica son proteínas, fundamentalmente caseínas, con un porcentaje de plata (I) en esta matriz proteica inferior al 0,5 % [73].

La disolución inicial de Colargol de 1000 mg L⁻¹ se preparó a partir del producto original (sólido) y disolviéndolo en un volumen adecuado de agua ultrapura. El resto de disoluciones se prepararon mediante la dilución correspondiente.

- Descripción de las muestras de cultivos celulares

Las muestras objeto de estudio eran células pertenecientes a la línea celular de hepatocarcinoma humano HepG2 (ATCC, LGC, Promochen, HB8065, Salisbury, Reino Unido).

Estas células se sometieron a dos tipos de ensayo: cultivo con nanopartículas de plata (AgNPs) adicionadas como Colargol y cultivo con plata (I) adicionada como AgNO_3 , a distintas dosis en ambos casos. Las concentraciones a las que se trabajó correspondían a niveles que afectan a la viabilidad celular.

El medio de cultivo empleado fue el DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Medium) (Lonza, Barcelona, España) suplementado con suero fetal bovino (FBS), aminoácidos no esenciales, penicilina, estreptomycin, glutamina y HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico). Los medios de cultivo fueron retirados tras 24 horas de incubación, dejando únicamente las células en los frascos para cultivos celulares, y congelándolas inmediatamente a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

En el caso en el que la plata se adicionó en forma de AgNPs, éstas procedían del Colargol. Los ensayos desarrollados con HepG2 se correspondían con:

- Células incubadas + Colargol 15 mg L^{-1} (equivalente a una concentración de $10,2\text{ mg L}^{-1}$ de AgNPs. La masa adicionada se corresponde con $102\text{ }\mu\text{g}$). Sin efecto sobre la viabilidad celular.
- Células incubadas + Colargol 30 mg L^{-1} (equivalente a una concentración de $20,4\text{ mg L}^{-1}$ de AgNPs. La masa adicionada se corresponde con $204\text{ }\mu\text{g}$). Efecto sobre la viabilidad celular del 50%.
- Células incubadas + Colargol 50 mg L^{-1} (equivalente a una concentración de 34 mg L^{-1} de AgNPs. La masa adicionada se corresponde con $340\text{ }\mu\text{g}$). Efecto sobre la viabilidad celular próxima al 90%.

Por su parte, en las células cultivadas con plata (I), ésta se adicionó como nitrato de plata (AgNO_3). Los ensayos desarrollados con HepG2 se correspondían con:

- Células incubadas + AgNO_3 $0,5\text{ mg L}^{-1}$ (equivalente a una concentración de $0,32\text{ mg L}^{-1}$ de plata (I). La masa adicionada se corresponde con $3,2\text{ }\mu\text{g}$). Sin efecto sobre la viabilidad celular.

- Células incubadas + AgNO_3 2 mg L⁻¹ (equivalente a una concentración de 1,27 mg L⁻¹ de plata (I). La masa adicionada se corresponde con 12,7 µg). Efecto sobre la viabilidad celular del 50%.
- Células incubadas + AgNO_3 4 mg L⁻¹ (equivalente a una concentración de 2,54 mg L⁻¹ de plata (I). La masa adicionada se corresponde con 25,4 µg). Efecto sobre la viabilidad celular del 90%.

Asimismo, se contó con cultivos celulares de control, en los que no se añadió plata al medio en ninguna de sus formas.

Procedimientos

- Puesta en disolución de las muestras

Para la puesta en disolución de las muestras se siguieron dos estrategias: digestión ácida y digestión mediante TMAH.

- Digestión ácida

Se llevó a cabo un ataque ácido para la determinación del contenido total de plata presente en las distintas muestras de células. Para ello se añadieron 10 mL de una disolución de ataque compuesta por HNO_3 : HCl (7:3) en cada uno de los frascos de cultivo que contenían las células y se dejaron durante 18 h en ligera agitación (50 rpm) en una placa agitadora Rotamax 120 (Heidolph, Schwabach, Alemania). Transcurrido este tiempo se recogió la disolución de ataque en HCl 3% hasta 50 mL. Para la cuantificación por ICPMS se hizo una dilución previa a la medida en HCl 3%.

- Digestión con TMAH

Para la digestión de las muestras con TMAH, los cultivos celulares se pusieron en presencia de 4 mL de TMAH (25% w/w) y 1 mL de Triton X-100 0,25 %, de manera que la proporción de éste en el medio de digestión fuera 0,05 %. A continuación, se dejó en agitación durante 4 horas para que tuviera lugar el proceso de digestión. Transcurrido este tiempo, se tomaron 2 mL del medio solubilizado y se diluyeron hasta 8 mL con Triton X-100 al 0,05 %. El medio final en que se encontraban las células solubilizadas era TMAH 5 % y Triton X-100 0,05 %.

- AF4-ICPMS

En la Tabla 1.6.1. se resumen los programas empleados para llevar a cabo la separación.

Se usó un volumen de inyección de 100 μL . Las muestras fueron inyectadas directamente en el sistema AF4 sin dilución previa.

Tabla 1.6.1. Programa de inyección y de flujo cruzado utilizado para las medidas de AF4 con un flujo a la salida del detector de 1,0 mL min^{-1} .

Etapa del programa	Tiempo /min	Flujo cruzado	
		Modo	mL min^{-1}
Programa A: flujo cruzado bajo			
Inyección/focalización	5	(Flujo de inyección, 0,2 mL min^{-1})	1
Separación	20	Constante	0,325
	5	Caída lineal	0,325 a 0
	5	Constante	0
Programa B: flujo cruzado alto 1			
Inyección/focalización	5	(Flujo de inyección, 0,2 mL min^{-1})	4
Separación	30	Constante	3
	1,5	Caída exponencial	3 a 0
	10	Constante	0
Programa C: flujo cruzado alto 2			
Inyección/focalización	5	(Flujo de inyección, 0,2 mL min^{-1})	4
Separación	5	Constante	2,5
	20	Caída lineal	2,5 a 0
	5	Constante	0

El espaciador utilizado tenía 350 μm de espesor. Como pared de acumulación se utilizaron membranas de ultrafiltración de poliétersulfona (PES) con un tamaño de poro de 1 y 4 kDa (Postnova Analytics).

La caracterización de tamaños de las nanopartículas de plata se hizo calibrando el sistema AF4 frente a estándares de AgNP con tamaños de 20 a 60 nm. La relación lineal entre el logaritmo del factor de retención R ($R = t_0/t_r$) y el

logaritmo del diámetro (d) en nanómetros encontrada experimentalmente para el programa C fue: $\log R = -0,9665 \log d + 0,9345$ ($r^2 = 0,9986$).

El portador se dirigió desde el canal de separación hasta un detector UV-Vis de diodos (Shimadzu, Duisburg, Alemania) que recogió la señal entre 200 y 650 nm; y hasta el espectrómetro ICPMS colocado en línea. La resonancia plasmón de las AgNPs fue utilizada para su detección online a través del detector UV-Vis. Se registró un espectro completo del eluyente cada 2 s.

1.6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.6.3.1. Estudio de las condiciones experimentales para la digestión con TMAH del material biológico presente en los ensayos de nanocitotoxicidad

La caracterización de nanopartículas de plata en células sometidas a estudios de toxicidad en presencia de dichas nanopartículas mediante AF4-ICPMS requiere la digestión de las células sin afectar a las nanopartículas de plata presentes, lo que impide hacer uso de una digestión convencional con ácidos.

En una primera aproximación para realizar la digestión de las células, se tomó como punto de partida el procedimiento optimizado dentro del grupo de investigación para la digestión de heces de ratones procedentes de ensayos *in vivo* con el mismo nanomaterial [175], que permitieron llevar a cabo la determinación de plata y la identificación de AgNPs en este tipo de muestras. En este procedimiento se utilizaba el TMAH como alternativa al ataque ácido. Este reactivo es capaz de provocar la ruptura hidrolítica y la metilación de enlaces éster, amida y algunos enlaces éter, solubilizando así la materia orgánica. El TMAH es una base fuerte que va a producir la precipitación de la plata. Para mantener la plata en disolución, se utiliza un complejante. Entre todos los complejantes que se estudiaron se encontró que el que mejores resultados daba era la cisteína. Además, se empleó Triton X-100 (surfactante no iónico) como emulsionante para las posibles fracciones de células no solubilizadas y como estabilizante para las nanopartículas.

El procedimiento óptimo se basaba en digerir la muestra con 2 mL de TMAH y cisteína 0,1 % en agitación durante 24 horas. Tras la agitación se diluía

hasta un volumen de 10 mL con Triton X-100 0,05 %. El medio final en el que quedaba la muestra era TMAH 5 %, cisteína 0,1 % y Triton X-100 0,05 %.

Los experimentos preliminares se llevaron a cabo para optimizar la cantidad de TMAH y el tiempo de contacto necesario con la muestra para solubilizar las células. En primer lugar se trató de emplear el mismo procedimiento de digestión llevado a cabo en estudios anteriores. A la vista de que 2 mL de TMAH no eran suficientes para cubrir toda la superficie del recipiente de cultivo donde se encuentran las células procedentes del ensayo de citotoxicidad, se decidió emplear el doble, 4 mL, y dejarlo junto con cisteína 0,1 % en agitación durante 24 h, diluyendo hasta un volumen final de 20 mL para mantener siempre la misma proporción de TMAH en el medio final (1:5).

Se realizó la digestión siguiendo este procedimiento de un cultivo control al que se adicionó AgNPs, estudiando las especies presentes mediante AF4-ICPMS. De estos ensayos no se obtuvieron buenos resultados, al no detectarse nanopartículas, probablemente debido a la inestabilidad de las AgNPs en el medio frente al tiempo.

1.6.3.2. Estudio de la estabilidad de las nanopartículas de plata en las condiciones del ensayo de digestión con TMAH

A la vista de los resultados anteriores, se realizaron algunas modificaciones para estudiar la estabilidad de las nanopartículas de plata en función del tiempo en las condiciones de digestión.

Los primeros ensayos se realizaron en frascos de cultivo vacíos, para que el contacto de las nanopartículas con el medio fuera comparable al que sufrían las células cuando se llevaba a cabo su digestión. De esta forma, se dejaron AgNPs (concentración final en el medio diluido: 10 mg L⁻¹) en agitación con 4 mL de TMAH y cisteína 0,1 %. Se tomó una pequeña fracción en el momento de poner en contacto las NPs con el medio (t_0) y otra fracción transcurridas 4 horas (t_{4h}). En ambos casos se diluyó la muestra con Triton X-100 de manera que el medio final fuera TMAH 5 %, cisteína 0,1 % y Triton X-100 0,05 %.

Estas fracciones se inyectaron en el equipo de AF4 siguiendo el programa A (Tabla 1.6.1.) para identificar las nanopartículas de plata. Los fractogramas que se muestran en la Figura 1.6.1. se corresponden con la señal obtenida a una longitud

de onda de 405 nm (característica del efecto plasmón de las AgNPs) para ambos casos. Para la muestra tomada a t_0 se observa un pico a 7,8 min que se corresponde a las AgNPs. Sin embargo, tal y como había ocurrido anteriormente en la muestra en agitación 24 h (Apartado 1.6.3.1), en el fractograma correspondiente a la muestra a t_{4h} no se observó la presencia de AgNPs.

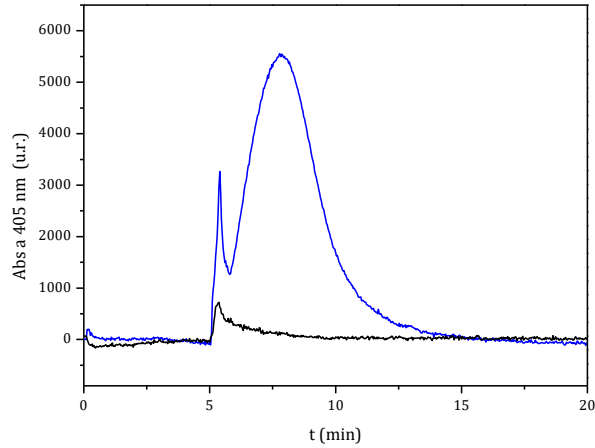


Figura 1.6.1. Fractogramas de AgNPs en el medio de digestión (TMAH 5 %, cisteína 0,1%, Triton X-100 0,05%) a t_0 (azul) y transcurridas 4 horas (negro).

Estas observaciones llevaron a pensar que los resultados obtenidos anteriormente, en los que no se observaba la presencia de AgNPs tras agitación durante 24 h, podían ser debidos a un exceso de tiempo de contacto de la muestra con el TMAH y a la presencia de cisteína. Se sabe que la cisteína es capaz de estabilizar la plata (I) formando complejos con ella ($\log K' = 11,9$). Este ligando se utiliza para disminuir la concentración de plata (I) libre en el medio y, por tanto, para liberar de la toxicidad total la contribución de la plata (I) de la de las AgNPs [59]. Pero es posible que en este caso la cisteína estuviera dificultando la identificación de las nanopartículas de plata facilitando el proceso de oxidación por formación de complejos con la plata (I) liberada. Esta hipótesis se comprobó visualmente a través del color amarillo de las suspensiones de AgNPs. Así, se observó que tras poner en contacto las nanopartículas de plata con TMAH en ausencia de cisteína, la disolución de AgNPs diluida en Triton X-100 seguía manteniendo su color característico, mientras que si se le adicionaba cisteína ésta

perdía la coloración, por lo que se concluyó que la cisteína estaba favoreciendo la disolución de las AgNPs.

A continuación, se llevó a cabo un estudio de la influencia de la concentración de cisteína, así como la presencia de Triton X-100 sobre las AgNPs presentes en el Colargol con el tiempo. Se puso Colargol en agitación en distintos medios y se fueron recogiendo distintas fracciones cada 30 minutos durante 3 horas y diluyéndose con Triton X-100 0,05 %. Estas suspensiones se midieron a través de EAM-UV-Vis empleando cubetas de cuarzo.

Los medios estudiados fueron:

1. Colargol + 4 mL TMAH.
2. Colargol + 4 mL TMAH + cisteína 0,002 % (1 mL).
3. Colargol + 4 mL TMAH + cisteína 0,02 % (1 mL).
4. Colargol + 4 mL TMAH + cisteína 0,1 % (1 mL).
5. Colargol + 4 mL TMAH + Triton X-100 0,05 % (1 mL).

En la Figura 1.6.2. se muestra el porcentaje de la señal de absorción que se mantiene con el tiempo respecto a la señal a t_0 para cada uno de los medios estudiados.

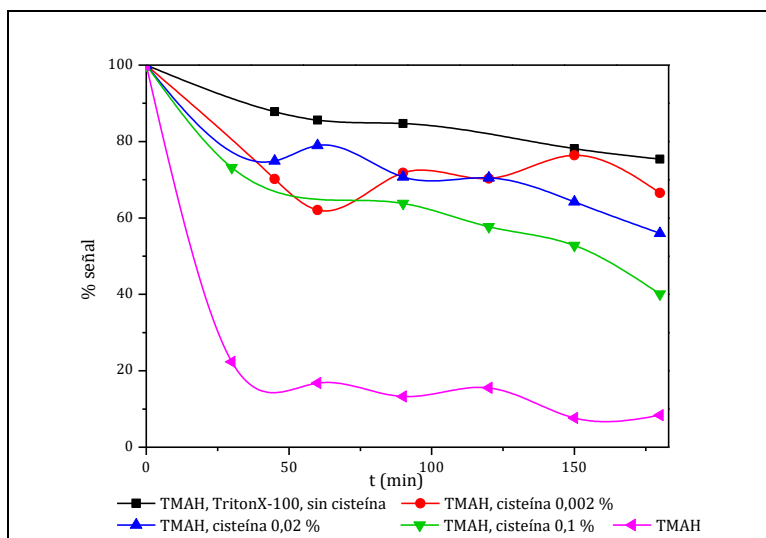


Figura 1.6.2. Variación de la señal de absorción relativa respecto a t_0 con el tiempo para los distintos medios.

En el caso de las AgNPs del Colargol en presencia únicamente de 4 mL de TMAH se observó una diferencia de señal del 77 % respecto a la señal inicial (t_0) pasados 30 min, además de apreciarse un precipitado por las paredes del tubo, por lo que se dedujo que la plata presente en el ensayo precipitaba en forma de hidróxido al haber medio básico.

Por su parte, al poner en agitación las AgNPs del Colargol con 4 mL de TMAH y cisteína en distintas proporciones (0,002 %, 0,02 % y 0,1 %) se observa que un aumento en la concentración de cisteína en el medio, produce un aumento en el grado de disolución de las AgNPs con el tiempo, al favorecer este proceso. En todos los casos la cisteína está en exceso respecto a la cantidad de plata presente, siendo la relación molar entre Ag y cisteína de 1:3,5, 1:35 y 1:88 para las proporciones 0,002 %, 0,02 % y 0,1 %, respectivamente. Finalmente, para el caso de las AgNPs del Colargol en 4 mL de TMAH y Triton X-100 0,05 % se observa una diferencia de señal del 26 % respecto a la señal inicial (t_0) transcurridas 3 h.

A la vista de los resultados se puede concluir que la adición de cisteína acelera el proceso de oxidación, tanto más cuanto mayor es la concentración de cisteína en el medio.

Para el caso del ensayo con Triton X-100, la disminución de señal no es tan acusada. En estas condiciones, se consideró que los mejores resultados se obtenían realizando la digestión en presencia únicamente de tensoactivo Triton X-100.

Al eliminar la cisteína como complejante, la plata (I) que no se encuentre estabilizada por formación de complejos con especies procedentes de la muestra precipitará. Para el caso de las AgNPs parece que el tensoactivo evita su oxidación, impidiendo su transformación a plata (I) y su posterior precipitación en el medio básico.

Para comprobar si en estas condiciones de estabilización, únicamente con Triton X-100 0,05 % en presencia de TMAH, se podía llevar a cabo la identificación de AgNPs mediante AF4, se puso Colargol en agitación en este medio y se inyectaron distintas fracciones diluidas con Triton X-100 a distintos tiempos (t_0 , t_{1h} y t_{4h}) (programa A) (Figura 1.6.3.).

Al integrar los picos de la Figura 1.6.3. correspondientes a las AgNPs (pico con máximo a 7-8 min), y considerando el área a t_0 como 100 % de la señal para poder evaluar el efecto en términos relativos del tiempo sobre la integridad de las AgNPs, se observa que en las condiciones de medida, un aumento en el tiempo de

digestión en presencia de TMAH y Triton X-100 conduce a una reducción en el área del pico correspondiente a las AgNPs. En este caso, transcurrida 1 h la señal se redujo un 31 %; tras 4 horas esta disminución se situó en un 44 %.

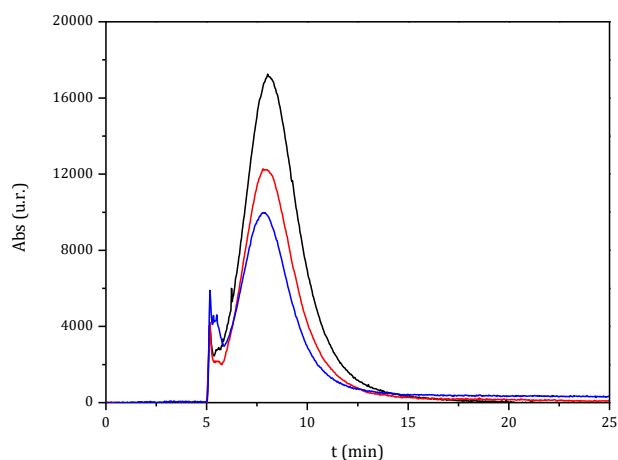


Figura 1.6.3. Fractogramas de AgNPs en el medio de digestión (TMAH 5 %, Triton X-100 0,05%). Señales obtenidas a t_0 (negro), t_{1h} (rojo) y t_{4h} (azul).

Finalmente, éste fue el medio que se eligió para llevar a cabo la digestión de las células. Realmente se trata de una solución de compromiso, ya que un aumento en el tiempo de digestión conlleva una pérdida de AgNPs por disolución de las mismas, mientras que un tiempo menor puede llevar a una digestión incompleta del medio biológico objeto de estudio. En la bibliografía se utilizan tiempos mayores para la digestión de muestras biológicas complejas (como tejidos) del orden de 12 o 24 h [182]. Estos tiempos son excesivamente largos para poder mantener la presencia de AgNPs en el medio, por lo que se optó por un tiempo en el que en principio se permitiera la completa disolución de la muestra biológica, pero asegurando que al menos un porcentaje significativo seguiría estando en la forma elemental como NPs. A través de posteriores ensayos de cuantificación de la plata se confirmó que 4 horas son suficientes para la digestión completa de las células. Además, esto quedó validado por comparación de resultados tras ataque ácido como se discute en el Apartado 1.6.3.3.

1.6.3.3. Determinación de la concentración de plata total en las células mediante digestión con TMAH. Validación del procedimiento

Tras realizar la digestión con TMAH de las muestras de células cultivadas con Colargol y AgNO_3 se hizo la cuantificación de plata presente en las mismas a través de ICPMS. Para la cuantificación de plata se inyectaron volúmenes discretos de las muestras y de un patrón de plata (I) de concentración conocida, y se integraron las áreas de las señales transitorias obtenidas. De esta manera, se pudo cuantificar la cantidad de plata presente en los cultivos celulares solubilizados. En la Tabla 1.6.2. se muestran las cantidades de plata encontradas tras la digestión con TMAH y tras el ataque ácido de estos mismos cultivos.

Tabla 1.6.2. *Cantidades de plata encontradas tras la digestión con TMAH y tras ataque ácido.*

Muestra	Concentración de plata / μg	
	Digestión con TMAH	Ataque ácido
Células + Colargol 30 mg L ⁻¹	77,2 ± 9,9	75 ± 1
Células + AgNO_3 4 mg L ⁻¹	7,4 ± 1,1	6,76 ± 0,04

Aplicando un test t con un nivel de confianza del 95 % se puede afirmar que el procedimiento de digestión con TMAH da similares resultados a los obtenidos mediante un ataque ácido de los medios celulares. No se encontraron diferencias significativas entre ambos métodos. Esto confirma que el procedimiento de digestión con TMAH permite la puesta en disolución de la plata presente en las muestras de células de forma completa y sin pérdidas significativas por procesos de precipitación.

Este procedimiento permite por tanto la cuantificación de plata total en este tipo de medio biológico permitiendo de forma simultánea la identificación de formas metálicas de plata.

1.6.3.4. Detección de nanopartículas de plata en células mediante AF4-ICPMS tras digestión con TMAH. Condiciones iniciales

Se realizó un ensayo con células cultivadas con 50 mg L⁻¹ de Colargol.

Estas células fueron solubilizadas según el procedimiento descrito anteriormente.

Para realizar la identificación de AgNPs se utilizó AF4-UV-Vis-ICPMS (programa A). En la Figura 1.6.4. se muestran las señales de UV-Vis a 254 nm y 405 nm, junto con la señal ICPMS de las células solubilizadas. Asimismo, se refleja el espectro UV-Vis en el tiempo del máximo de los picos observados a 405 nm.

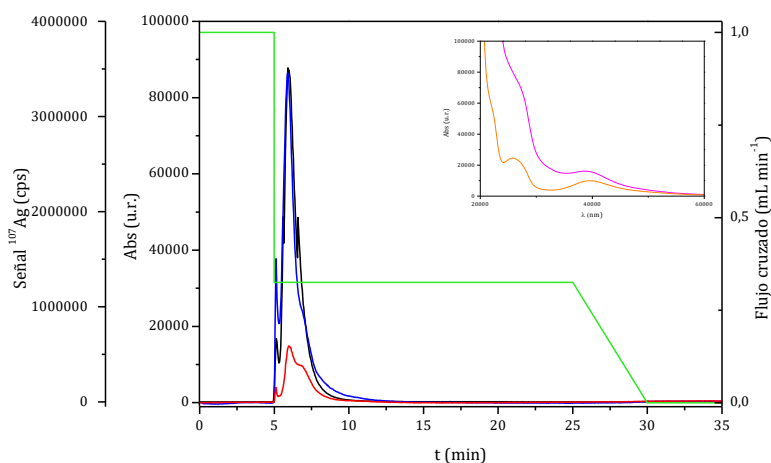


Figura 1.6.4. Fractograma correspondiente a células cultivadas con una dosis de 50 mg L^{-1} de Colargol. Negro señal de ^{107}Ag medida en ICPMS. Azul señal UV-Vis a 254 nm. Rojo señal UV-Vis a 405 nm. En la parte superior de la figura, se muestra el espectro UV-Vis recogido a 6 y 6,86 min, rosa y naranja respectivamente. Verde flujo cruzado aplicado.

De la señal de ICPMS se observa la presencia de un pico de plata al principio del fractograma, sin resolver del pico correspondiente al tiempo muerto, asociado a la señal obtenida a 254 nm. Este pico puede estar relacionado con plata (I) asociada a materia orgánica de la muestra. El espectro UV-Vis para los máximos del fractograma a 405 nm confirmaron la presencia de nanopartículas de plata en las células solubilizadas. Sin embargo, se hace necesario modificar las condiciones de separación ya que los dos picos que aparecen al principio del fractograma no están bien resueltos. Se debía optimizar un programa de flujo cruzado que permitiera separar estas AgNPs del resto de especies que contienen plata en el medio de digestión.

1.6.3.5. Optimización de las condiciones de separación de nanopartículas de plata en AF4. Programa de flujo cruzado

Para la optimización de las condiciones de separación de AgNPs en AF4 se utilizó como sistema de detección únicamente el detector de UV-Vis. Se realizaron ensayos sobre muestras de células y sobre nanopartículas de plata.

- *Ensayos de optimización sobre células tratadas con Colargol*

Los primeros ensayos para llevar a cabo la optimización del programa de separación se realizaron sobre la muestra descrita en el Apartado 1.6.3.4. (células cultivadas con una dosis de 50 mg L^{-1} de Colargol). El objetivo era desarrollar un programa que permitiera separar las AgNPs de la fracción de materia orgánica presente en el medio. Esto requiere de una etapa con elevado flujo cruzado, que permita eluir las especies de menor tamaño, seguida de otra con un flujo cruzado menor que permita la elución de las AgNPs.

Se partió de un programa optimizado por el grupo de investigación (Tabla 1.6.1. – programa B) que se había utilizado para la identificación de especies de plata asociada a proteínas presentes en medios de cultivo. En la Figura 1.6.5. se muestra el fractograma obtenido.

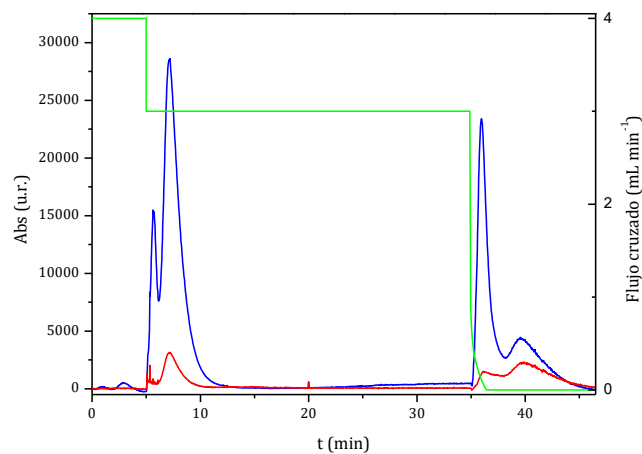


Figura 1.6.5. Fractograma correspondiente al ensayo con células cultivadas con una dosis de 50 mg L^{-1} de Colargol. Azul señal UV-Vis a 254 nm. Rojo señal UV-Vis a 405 nm. Verde flujo cruzado aplicado.

Tal y como se ha descrito, el primer pico corresponde a especies de bajo peso molecular y de naturaleza orgánica (elevada señal a 254 nm). El pico con una mayor proporción en la señal a 405 nm indica presencia de AgNPs.

Para confirmar la naturaleza de estas dos poblaciones se inyectaron con este mismo programa AgNPs y células de control solubilizadas siguiendo el mismo procedimiento, por separado. Los fractogramas obtenidos se muestran en la Figura 1.6.6.

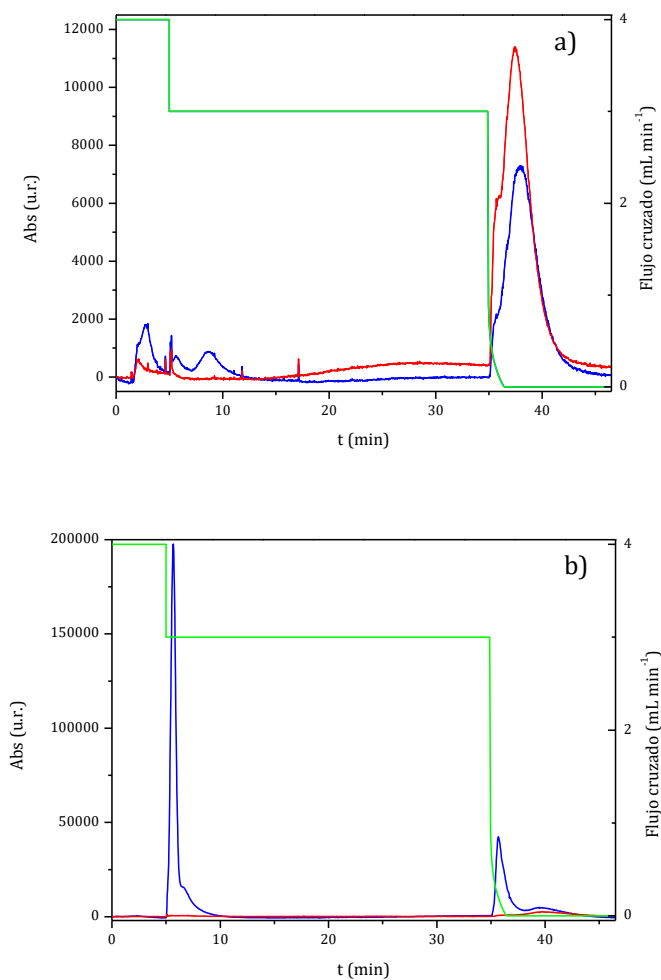


Figura 1.6.6. Fractogramas correspondiente al ensayo (a) con AgNPs en el medio de digestión; (b) con células de control tras someterse al proceso de digestión. Azul señal UV-Vis a 254 nm. Rojo señal UV-Vis a 405 nm. Verde flujo cruzado aplicado.

Comparando los fractogramas, se puede observar que el pico a 39,6 min de la Figura 1.6.5. se corresponde con el pico a 38 min de AgNPs de la Figura 1.6.6. (a), lo que confirma la presencia de nanopartículas en dicha fracción. Por su parte, al comparar los picos a 254 nm de la Figura 1.6.5. con los que aparecen en la Figura 1.6.6. (b) de las células de control, se observa coincidencia en los picos que aparecen a 5,6 min, 35,9 min y 39,6 min lo que confirma la naturaleza orgánica procedente de las células de dichos picos. El pico a 7,2 min en la Figura 1.6.5. y que no se observa en la Figura 1.6.6. (b), podría estar relacionado con la presencia de nanopartículas de pequeño tamaño asociadas a material orgánico.

A pesar de que este programa permitió la separación de las AgNPs de la fracción orgánica de menor tamaño, éstas se eluían al final del fractograma, donde no es posible obtener información acerca del tamaño de las mismas al eluirse en ausencia de flujo cruzado. El hecho además de que otras especies de gran tamaño de naturaleza orgánica, coeluyeran en estos tiempos y que también pudieran llevar asociada plata, hizo que se buscara un programa más adecuado.

- *Ensayos de optimización sobre células control*

Para estos ensayos de optimización del programa de separación, se utilizaron células de control sobre las que se adicionaron AgNPs.

Tras varios programas se obtuvo uno que permitía la separación de las AgNPs del resto de especies presentes en el medio solubilizado (Tabla 1.6.1. – programa C). Los fractogramas obtenidos para la muestra solubilizada de células de control, muestra más adición posterior de AgNPs y para AgNPs en el medio de digestión se muestran en la Figura 1.6.7. Cuando se aplica un flujo cruzado constante de 2,5 mL min⁻¹ durante 5 min, se eluyen las macromoléculas pequeñas. En el siguiente paso de caída lineal de flujo cruzado desde los 2,5 a 0 mL min⁻¹ durante 20 min se permite la elución de macromoléculas mayores (o en su caso AgNPs) a diferentes tiempos. Finalmente, se introduce una etapa sin flujo cruzado para asegurar que todas las especies inyectan son eluidas.

En estos fractogramas se observa la separación entre las AgNPs adicionadas posteriormente a la muestra de control digerida y el material orgánico presente en la muestra debido a la digestión de las células.

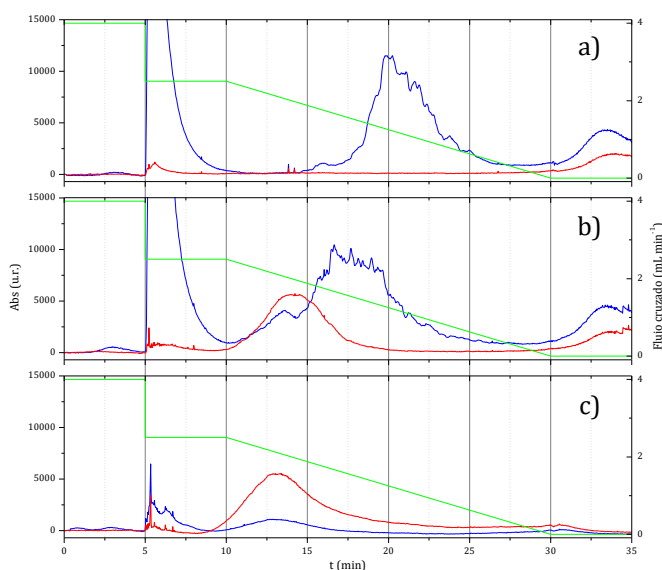


Figura 1.6.7. Fractogramas correspondientes a (a) los ensayos de células de control digeridas, (b) células de control digeridas con adición posterior de AgNPs (b) y (c) AgNPs en el medio de digestión. Azul señal UV-Vis a 254 nm. Rojo señal UV-Vis a 405 nm. Verde flujo cruzado aplicado. Para la separación de la muestra (c) se empleó una membrana PES 4 kDa.

Con este programa se consiguió la separación parcial de las AgNPs debidas al Colargol y del material orgánico debido a la digestión de las células. El programa C descrito en la Tabla 1.6.1. se tomó como el más adecuado para llevar a cabo la separación de nanopartículas de plata en medios celulares solubilizados.

1.6.3.6. Identificación y caracterización de nanopartículas de plata en los medios solubilizados mediante AF4-ICPMS. Análisis mediante TEM de las fracciones recogidas en el AF4

El programa de separación aplicado para la separación de las nanopartículas de plata es el programa C descrito en la Tabla 1.6.1.

Las muestras estudiadas en este caso fueron los medios celulares tratados con una dosis de 4 mg L⁻¹ de AgNO₃ y 30 mg L⁻¹ de Colargol. El medio tratado con AgNO₃ se utilizó con fines comparativos, con el fin de establecer por diferencia

aquellas señales que fueran debidas a la presencia de AgNPs. En la Figuras 1.6.8. se comparan las señales de UV-Vis a 254 nm y 405 nm para ambas muestras.

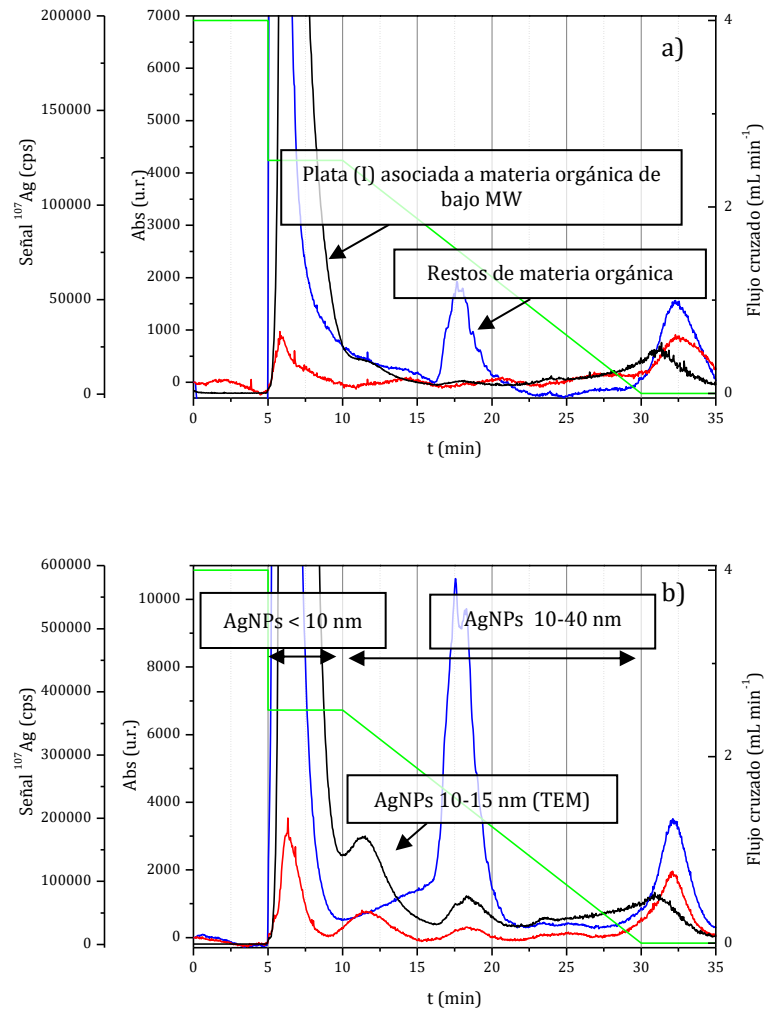


Figura 1.6.8. Fractogramas correspondientes a la muestra de células tratada con (a) AgNO_3 4 mg L^{-1} ; (b) Colargol 30 mg L^{-1} Negro señal de ^{107}Ag medida en ICPMS. Azul señal UV-Vis a 254 nm. Rojo señal UV-Vis a 405 nm. Verde flujo cruzado aplicado.

En la Figura 1.6.8. (a) las señales de plata que se observan en ICPMS corresponden a plata asociada a fracciones de bajo peso molecular de material orgánico sin solubilizar.

En la Figura 1.6.8. (b) la señal de ^{107}Ag muestra un gran pico a los 7 min, y dos más pequeños a 11 y 17 min. También se eluye una pequeña cantidad de plata

al final del programa, cuando no se aplica flujo cruzado. La calibración del canal frente a estándares de tamaño de AgNPs muestran que las especies eluidas antes de los 10 min son menores de 10 nm, mientras que las que se eluyen entre 10 y 30 min están en un rango de 10-40 nm. Especies mayores de este tamaño se eluirían a tiempos mayores.

A la vista de los fractogramas de UV-Vis obtenidos en ambos casos (Figura 1.6.8.) se deduce que la presencia de algunas fracciones en la muestra del cultivo celular tratado con Colargol están relacionadas con la presencia de nanopartículas. Estas fracciones se pueden dividir en tres:

1. Primera fracción, correspondiente al pico a 254 nm con un tiempo de elución de 7 min.
2. Una segunda fracción, correspondiente al pico de 405 nm eluido a 11 min, asociado a una señal de plata al mismo tiempo.
3. La tercera fracción, correspondiente al pico a 254 nm eluido a 17 min.

Para la confirmación de la presencia o no de nanopartículas de plata, se tomaron también distintas fracciones de las muestras a esos tiempos de elución para una posterior observación de las muestras por TEM (Figura 1.6.9.). La muestra original sin separación también se observó a través de TEM [Figura 1.6.9. (a)].

Estas imágenes [Figura 1.6.9. (a) correspondiente a la muestra original, sin inyectar en el canal] muestran nanopartículas con un rango de tamaños relativamente amplio, desde diámetros de 35-40 nm hasta numerosas nanopartículas de 3-4 nm, vistas a una mayor resolución [detalle Figura. 1.6.9. (a)]. Estas pequeñas nanopartículas se deberían eluir a tiempos menores de 10 min. Sin embargo, las imágenes correspondientes a la fracción recogida a los 7 min muestran la presencia de AgNPs en un rango de tamaños de 5-10 nm [Figura 1.6.9. (b)], pero no menores. La gran dilución dentro del canal (la masa inyectada en 100 μ L es eluida en 30 mL) y la baja resolución de tamaño del TEM utilizado, cercana a 2-3 nm, puede justificar la ausencia de estas pequeñas nanopartículas en las imágenes obtenidas. Es posible que el pico a 7 min corresponda a AgNPs de 3-4 nm sin resolver de la plata (I) asociada a macromoléculas no solubilizadas en la disolución restante.

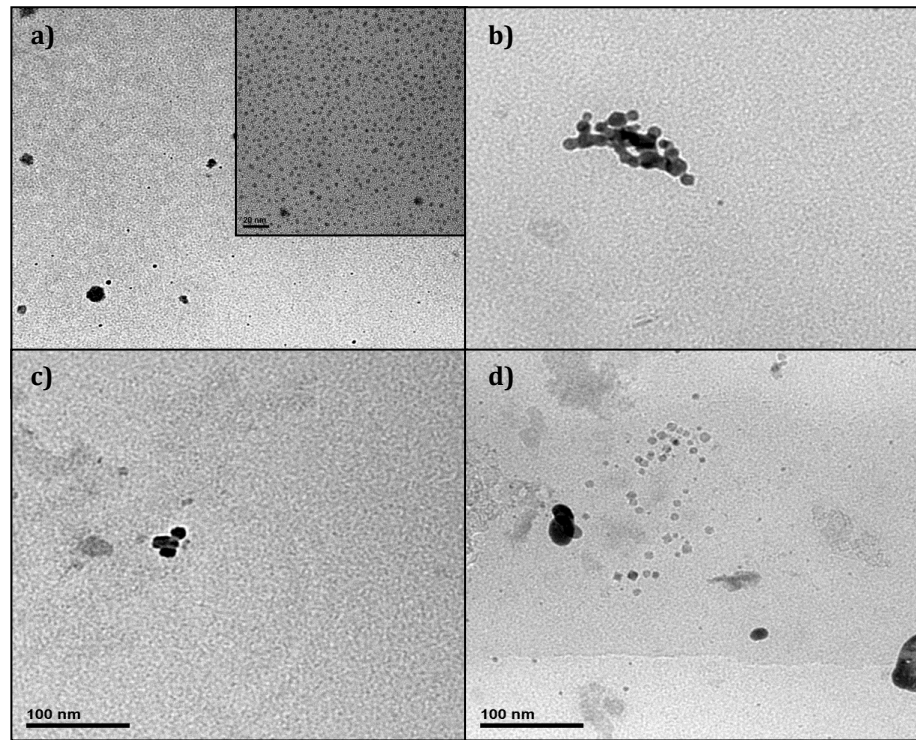


Figura 1.6.9. Imágenes TEM de la muestra de células tratadas con Colargol: (a) muestra solubilizada sin separación 15000X y 100000X (cuadrado pequeño). Fracciones de muestra recogidas del sistema AF4 a (b) 7 min 60000X; (c) 11 min 40000X; (d) 17 min 40000X.

Las imágenes de la fracción recogida a 11 min únicamente revelan unas pocas nanopartículas de alrededor de 15 nm de tamaño. A pesar del bajo número de nanopartículas observadas, estos resultados están de acuerdo con la información obtenida por los fractogramas dada la alta absorbancia a 405 nm asociada a este pico. En el pico correspondiente a un tiempo de 11 min, se aprecia en la muestra tratada con Colargol el típico efecto plasmón de las nanopartículas de plata a 400 nm. Este efecto no se observa en la muestra tratada con AgNO_3 al mismo tiempo de elución.

La última fracción recogida corresponde al pico eluido a los 17 min. Las imágenes muestran muchas partículas de diferentes tamaños, desde 10 nm a 30 nm, y un material no homogéneo y más brillante en el fondo. Este material podrían ser restos materiales de células parcialmente solubilizadas. Esto podría justificar el gran pico de absorbancia a 254 nm asociado a la señal de plata.

A través de la señal de plata obtenida mediante ICPMS, de los espectros de UV-Vis y de las imágenes de TEM se confirma la presencia de AgNPs en el medio solubilizado y, por lo tanto, en las células.

La recuperación de plata en el canal AF4 fue de $75 \pm 9 \%$ para una muestra de AgNPs de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ y de $71 \pm 6 \%$ para la muestra de células digeridas que habían sido cultivadas con Colargol 30 mg L^{-1} . Estos valores están en consonancia con los obtenidos con los patrones de AgNPs comerciales. Estos valores de recuperación indican que un pequeño porcentaje de la muestra es adsorbido de forma irreversible en el interior del canal, sobre la membrana de permeación.

1.6.4. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado una metodología que, a diferencia de la desarrollada en el capítulo 1.2, ha permitido detectar la presencia de nanopartículas asociadas a las células utilizadas en ensayos de nanotoxicidad. Este desarrollo incluye la digestión de las células mediante TMAH, de manera que se ha mantenido la integridad de las nanopartículas presentes, con recuperaciones cuantitativas. En un segundo paso, ha sido posible la caracterización de las distintas especies de Ag presentes en el medio de digestión mediante AF4-UV-Vis-ICP-MS. Por la propia complejidad del medio se ha descartado la utilización de la ultrafiltración, al quedar la plata asociada a los restos de materia orgánica procedente de la digestión, así como SP-ICPMS por el propio tamaño de las NPs.

Esta metodología abre el camino a la caracterización e identificación de nanopartículas de plata en matrices biológicas complejas, lo que puede aportar información relevante para estudios de toxicidad de estas nanopartículas en entornos biológicos.

***2. DETECCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y
CUANTIFICACIÓN DE
NANOPARTÍCULAS MEDIANTE
DETECCIÓN DE PARTÍCULAS
INDIVIDUALES ICPMS (SP-ICPMS)***

2.1. DETECCIÓN DE PARTÍCULAS INDIVIDUALES MEDIANTE ICPMS: TIEMPOS DE LECTURA DE MICROSEGUNDOS VS. MILISEGUNDOS

2.1.1. INTRODUCCIÓN

Originariamente, SP-ICPMS fue desarrollado con espectrómetros de masas de cuadrupolo. Con estos instrumentos, la frecuencia de adquisición de datos está directamente controlada por el tiempo de estancia (t_{dwell}), también denominado tiempo de lectura, que es el tiempo utilizado en la adquisición de datos para una masa atómica específica, y por el tiempo de asentamiento (*settling time*), que es el tiempo empleado para la estabilización del cuadrupolo una vez que cambia de una masa atómica a otra. De manera indirecta, la transmisión y el almacenamiento de datos desde el instrumento al ordenador también puede limitar la viabilidad de las frecuencias de adquisición [64]. Inicialmente, los tiempos de lectura estaban limitados al rango de milisegundos, permitiendo la monitorización de sólo un elemento/isótopo por partícula. Bajo estas condiciones, se recomienda trabajar a tiempos de lectura entre 3 y 10 ms y a concentraciones en número de partícula por debajo de 10^8 L^{-1} [36]. Los eventos debidos a partículas se registran en este caso como pulsos individuales. Cuando se trabaja en el rango de milisegundos se debe evitar trabajar a tiempos de lectura demasiado bajos (p.ej. 1 ms) para evitar registrar los pulsos de forma parcial.

Actualmente, están disponibles comercialmente instrumentos de cuadrupolo que permiten llevar a cabo barridos en modo ultrarrápido, por lo que el uso de tiempos de lectura en el rango de microsegundos (100 – 10 μs) se está convirtiendo en una práctica común [66,183]. Debido a que cada evento producido por una partícula tiene una duración en el detector de 300-500 μs [66,67], cuando se utilizan tiempos de lecturas iguales o inferiores a 100 μs , los eventos debidos a partículas se pueden registrar como señales transitorias en lugar de como pulsos. Además, se pueden detectar hasta dos elementos/isótopos en la misma partícula [183]. Más recientemente, con la implementación de la detección de partículas individuales en instrumentos de tiempo de vuelo (SP-TOF-ICPMS), la posibilidad de registrar todo el espectro de masas con tiempos de lectura de 30-40 μs supone

disponer de capacidad de detección multielemental simultánea por partícula [184]. Por otra parte, los fabricantes de instrumentos están implementando módulos para la adquisición y procesado de datos de *single particle* en sus respectivos softwares de ICPMS, haciendo más sencillo el análisis de partículas a través de SP-ICPMS para usuarios inexpertos.

Mientras que en la primera parte de esta Tesis Doctoral se ha utilizado un instrumento de cuadrupolo con capacidad para trabajar con tiempos de lectura en el rango de los milisegundos, en esta segunda parte se van a utilizar instrumentos de cuadrupolo de última generación, capaces de utilizar tiempos de lectura en el rango de los microsegundos. Por este motivo, el objetivo principal de este capítulo se centra en evaluar las prestaciones de SP-ICPMS cuando se utilizan tiempos de lectura del orden de microsegundos en comparación con milisegundos. Como objetivos específicos se va a estudiar la importancia de seleccionar la concentración en número adecuada dependiendo de las condiciones de trabajo utilizadas para obtener información cuantitativa de la mejor calidad, así como la influencia y contribución de la presencia de especies disueltas en los resultados según el tiempo de lectura empleado.

2.1.2. EXPERIMENTAL

Instrumentación

Se empleó un espectrómetro de masas con plasma de acoplamiento inductivo como fuente de ionización (ICPMS) Perkin Elmer NexION® 350X (Shelton, USA). La muestra se introdujo a través de un nebulizador concéntrico de perfluoroalcóxido politetrafluoroetileno PFA PTFE y una cámara de nebulización ciclónica de cuarzo. Los parámetros instrumentales y de adquisición de datos se recogen en la Tabla 2.1.1. Se eliminó el tiempo de asentamiento durante la adquisición de datos.

Tabla 2.1.1. *Parámetros instrumentales y de adquisición de datos.*

Parámetros instrumentales	
Potencia RF	1600 W
Flujo de gas argón	
Plasma	18 L min ⁻¹
Auxiliar	1,2 L min ⁻¹
Nebulizador	0,97 L min ⁻¹
Caudal de introducción de muestra	0,95 mL min ⁻¹
Parámetros de adquisición de datos	
Tiempo de estancia (t_{dwell})	10 ms, 5 ms, 100 μ s, 50 μ s
Lecturas por réplica	6000, 12000, 600000, 1000000
Tiempo de asentamiento	-
Tiempo total de adquisición	60 s, 300 s, 600 s
Isótopos monitorizados	¹⁰⁷ Ag, ¹⁹⁷ Au

Estándares

Las suspensiones diluidas de nanopartículas de oro y plata se prepararon a partir de suspensiones comerciales. Como patrón de nanopartículas de oro se utilizó el material de referencia RM 8013 (NIST, Maryland, EE.UU.) con un diámetro nominal de 60 nm. Las nanopartículas de plata monodispersas estabilizadas con citrato provenían de Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Suiza) y tenían diámetros nominales de 40 ± 4 , 60 ± 4 y 100 ± 8 nm. Las concentraciones en número se calcularon a partir de los diámetros nominales y las concentraciones en plata en masa se determinaron por ICPMS (17,9 y 19,0 mg L⁻¹ para las suspensiones de 60 y 100 nm, respectivamente). La contribución de la plata disuelta se determinó por SP-ICPMS y fue considerada para los cálculos (0,5 y 0,4 % para las suspensiones de 60 y 100 nm, respectivamente). Todas las diluciones se prepararon a partir de alícuotas de las suspensiones concentradas, por pesada en una balanza analítica de precisión ($\pm 0,1$ mg), en agua ultrapura (MilliQ, Millipore Corporation, MA, EE.UU) y tras 1 min de sonicación. Se evitaron mayores tiempos de sonicación para evitar un calentamiento excesivo de las suspensiones.

Las disoluciones acuosas de plata se prepararon a partir de una disolución estándar de 1001 mg L⁻¹ (Merck, Darmstadt, Alemania) por dilución en agua ultrapura. Las disoluciones acuosas de oro se prepararon a partir de una disolución estándar de 1000 mg L⁻¹ (Panreac, Barcelona, España) por dilución en ácido clorhídrico 5 % (v/v) (Baker Instra-Analyzed, J.T. Baker, Holanda).

Procesamiento de datos

Cuando se utilizan tiempos de lectura del orden de milisegundos, el procesado de las señales obtenidas se basa en discriminar las señales correspondientes a eventos de nanopartículas (registrados como pulsos individuales) de aquellos debidos a la línea base, la cual incluye la contribución de las señales de fondo y/o de las especies disueltas [64]. Para ello se han propuesto diversos algoritmos. Pace y col. [65] propusieron un algoritmo iterativo basado en un criterio 3σ , donde σ es la desviación estándar de todo el conjunto de datos, para establecer el límite que permite diferenciar los dos tipos de eventos. Por su parte, Tuoriniemi y col. [50] propusieron un criterio 5σ para asegurar que la contribución de eventos contados erróneamente como debidos a nanopartículas (falsos positivos) fuera menor del 0,1 % de los eventos de nanopartículas. A lo largo de esta Tesis Doctoral se ha empleado el criterio 3σ para la diferenciación de la señal de fondo de los eventos debidos a nanopartículas. Utilizando microsegundos, los eventos producidos por nanopartículas se registran como señales transitorias y los datos de intensidad se procesan de manera similar a un pico obtenido en un cromatograma. Una vez que cada señal transitoria se identifica sobre la línea base continua, ésta se integra sumando las medidas registradas a lo largo de la señal transitoria.

Para el procesamiento de datos se empleó la aplicación Syngistix™ Nano Application Module, así como programas propios basados en Matlab (MathWorks, Natick, EE.UU.) y hojas de cálculo Excel (Microsoft, Redmond, EE.UU.). También se utilizó el software de análisis de datos OriginPro 8 (OriginLab Corporation, Northampton, EE.UU.).

El rendimiento de nebulización se calculó de acuerdo al método desarrollado por Pace y col. [65] conocido como método de frecuencia de nanopartículas. En él, el rendimiento de nebulización se calcula midiendo un patrón de concentración en número conocida, el caudal de introducción de muestra y

aplicando la Ecuación 2.1.2. Se desarrolló una hoja de cálculo para el cálculo de la concentración en número óptima en cualquier instrumento o tipo de condiciones de medida elegidas. Esta hoja, disponible online, queda recogida en el Anexo 1.3.

2.1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1.3.1. Tiempos de lectura de microsegundos vs. milisegundos: Registro de las señales

Cuando una suspensión de nanopartículas suficientemente diluida se introduce en el plasma, cada nanopartícula produce un paquete de iones. Estos paquetes de iones se registran como señales transitorias, con una anchura que depende del tamaño de nanopartícula (Tabla 2.1.2). Utilizando tiempos de lectura de 50 μ s, para el instrumento y las condiciones de medida descritas en el Apartado 2.1.2. se obtuvieron señales con anchuras de 400 a 500 μ s para AgNPs de 40 a 100 nm, respectivamente. Por otro lado, nanopartículas de Ag y de Au de 60 nm, que contienen similar número de átomos por NP, produjeron señales transitorias con anchuras medias similares, de 450 μ s.

Tabla 2.1.2. Duración de la señal en función del tamaño de nanopartícula.

Tamaño AgNP (nm)	Duración de la señal (μ s)
40	400
60	450
100	500

La Figura 2.1.1. muestra la apariencia de las señales generadas por AuNPs de 60 nm en función del tiempo de lectura empleado. Utilizando tiempos de lectura iguales o menores a 100 μ s, se puede registrar el perfil de la señal transitoria producida por cada nanopartícula; mientras que trabajando a tiempos de lectura en el rango de los milisegundos, se obtiene una única medida y los paquetes de iones se miden como pulsos. No se consideraron tiempos de lectura en el rango de 1 ms – 200 μ s, cercanos a la anchura de las señales transitorias generadas por cada paquete individual de iones, debido a una mayor probabilidad de medir solo una parte del mismo [36]. Aunque el efecto de utilizar tiempos de lectura largos en relación con la aparición de eventos múltiples de nanopartículas se tratará

posteriormente, es importante resaltar que las señales transitorias de las AuNPs de 60 nm no se registraron correctamente al trabajar con tiempos de lectura demasiado cortos (p.ej. 10 μ s), por lo que dichos tiempos de lectura deberían evitarse. La razón para este comportamiento se justifica por el bajo número de iones contados durante estos cortos periodos de tiempo y la gran incertidumbre asociada. A modo de ejemplo, si desde una AuNP de 60 nm se registraran 50 iones, durante los 500 μ s de duración de la señal se detectarían 1 ± 1 iones cada 10 μ s, si los 50 iones estuvieran homogéneamente distribuidos. Sin embargo, debido a que los iones llegan de manera aleatoria al detector, el conteo fluctuaría entre 0 y 3 cuentas en cada periodo de medida según la estadística de Poisson, tal y como se observa en la Figura 2.1.1.

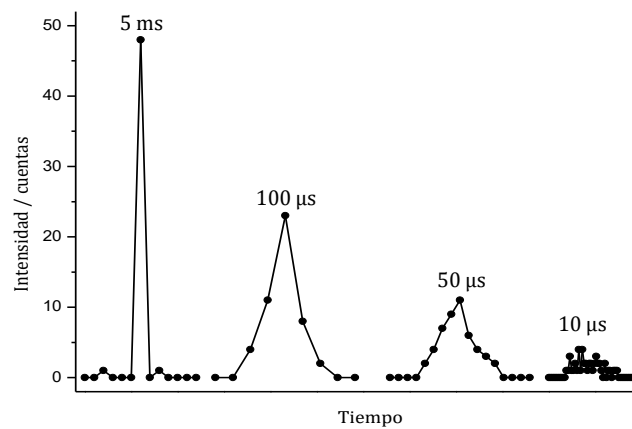


Figura 2.1.1. Apariencia de la señal de SP-ICPMS en relación con el tiempo de lectura seleccionado (escala de tiempo para 100, 50 y 10 μ s, $\times 100$). Nanopartículas de oro de 60 nm NIST RM 8013. Intensidad total, 48 cuentas.

2.1.3.2. Efecto de la concentración sobre la incidencia de eventos múltiples

Cuando se registran en SP-ICPMS los eventos producidos por nanopartículas individuales, ya sean como señales transitorias o como pulsos, el flujo de nanopartículas en el plasma debe ser seleccionado en base a la frecuencia de adquisición de datos empleada. Para las concentraciones utilizadas en SP-ICPMS, la llegada de nanopartículas al plasma se puede considerar un proceso aleatorio, de

manera que se puede utilizar la estadística de Poisson para estimar la probabilidad de que una o más nanopartículas sean detectadas como un evento [67]. La probabilidad $P(n)$ de obtener una señal a partir de n nanopartículas en un tiempo de lectura viene dada por:

$$P(n) = \frac{\lambda^n}{n!} e^{-\lambda} \quad (2.1.1)$$

donde λ representa el flujo de nanopartículas que entran en el plasma (Q_{NP}) multiplicado por el tiempo de lectura. Este tiempo de lectura se corresponde con el tiempo de estancia cuando se trabaja en el rango de los milisegundos ($\lambda = Q_{NP} \times t_{dwell}$) y con la anchura del pico (w_{peak}) de las señales transitorias (500 μ s en este caso) cuando se trabaja en el rango de los microsegundos ($\lambda = Q_{NP} \times w_{peak}$). Cuando se utiliza un sistema de nebulización convencional, el flujo de nanopartículas se expresa como:

$$Q_{NP} = \eta_{neb} Q_{sam} C_{NP} \quad (2.1.2)$$

donde η_{neb} es el rendimiento de nebulización, Q_{sam} es el caudal de introducción de muestra, y C_{NP} es la concentración en número de nanopartículas. De la ecuación 2.1.1. se deduce que cuando se trabaja a tiempos de lectura en el rango de milisegundos, el uso de tiempos de lectura más cortos permite trabajar a flujos mayores y, por tanto, a mayores concentraciones en número de nanopartículas, manteniendo una baja incidencia de eventos múltiples ($n > 1$) [94]. Por otra parte, cuando se trabaja en el rango de los microsegundos, no debería haber influencia del tiempo de lectura, y la incidencia de eventos múltiples dependerá directamente de la concentración en número.

La Figura 2.1.2. (a) muestra perfiles típicos de las señales transitorias, obtenidas a un tiempo de lectura de 100 μ s, correspondientes a una, y a dos o tres nanopartículas no resueltas. En cualquier caso, las tres señales transitorias serán contadas como eventos producidos por una sola nanopartícula, debido a las dificultades inherentes para resolver de manera correcta las contribuciones múltiples. La Figura 2.1.2. (b, c), muestra el efecto de la concentración en número en la aparición de estos eventos múltiples para concentraciones de $3,8 \times 10^8$ y $2,2 \times$

10^9 L⁻¹. Dependiendo de la concentración se obtienen distribuciones adicionales a intensidades dobles o triples a las correspondientes a eventos debidos a una nanopartícula, mientras que la reducción del tiempo de lectura de 100 a 50 μ s no produce ningún cambio significativo, como se había predicho.

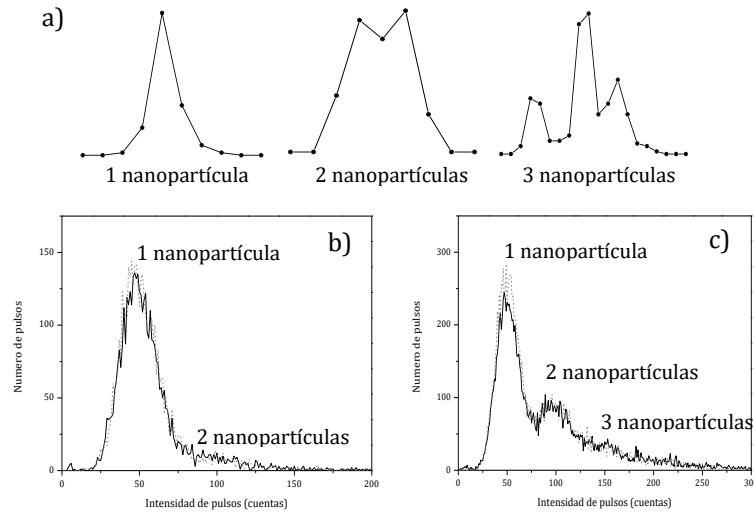


Figura 2.1.2. Efecto de la concentración en número de nanopartícula en la aparición de eventos múltiples de nanopartículas. Nanopartículas de oro NIST RM 8013 60 nm. (a) Señales transitorias correspondientes a una nanopartícula y a dos y tres nanopartículas no resueltas (t_{dwell} , 100 μ s). Histogramas de intensidad correspondientes a concentraciones en número de (b) $3,8 \times 10^8$ y (c) $2,2 \times 10^9$ L⁻¹ y tiempos de lectura de 100 μ s (línea sólida negra) y 50 μ s (línea quebrada gris).

2.1.3.3. Efecto de los parámetros de adquisición y de la concentración en número de nanopartículas sobre la incertidumbre de los resultados

Como se ha visto en el apartado anterior, la concentración en número de nanopartículas controla la incidencia de eventos debidos a dos o más nanopartículas. La presencia de estos eventos múltiples implica un error sistemático en los resultados, al ser considerados como eventos producidos por una sola nanopartícula. Por otra parte, el número de eventos contados durante un periodo específico de tiempo, y por lo tanto, los errores aleatorios debidos al

conteo, también depende de la concentración en número de nanopartículas. El error aleatorio está controlado por la estadística de Poisson, y se puede estimar a partir del número total de nanopartículas contadas ($N = Q_{NP} t_i$) donde t_i es el tiempo total de adquisición de datos. Este error aleatorio se puede expresar como una desviación estándar relativa (rsd_{NP}):

$$rsd_{NP} = \frac{1}{\sqrt{t_i Q_{NP}}} \quad (2.1.3)$$

El error sistemático proviene de la dificultad de diferenciar los eventos producidos por una nanopartícula de aquéllos producidos por dos o más nanopartículas y se cuantifica como un sesgo. Asumiendo que la incidencia de eventos múltiples debidos a 3 o más nanopartículas se podían considerar despreciables, se estableció una aproximación de relación lineal entre el sesgo absoluto ($bias_{NP}$) y el flujo de nanopartículas [94]. Este sesgo está relacionado con el tiempo de estancia cuando se trabaja en milisegundos y con la anchura de la señal transitoria cuando se trabaja en el orden de los microsegundos:

$$bias_{NP} \approx \frac{t_{dwell}}{2} Q_{NP} \quad (2.1.4)$$

$$bias_{NP} \approx \frac{w_{peak}}{2} Q_{NP} \quad (2.1.5)$$

Las ecuaciones 2.1.4 y 2.1.5 muestran que el sesgo se incrementa linealmente con el flujo de nanopartículas, mientras que la desviación estándar relativa disminuye con la inversa de la raíz cuadrada del mismo (ecuación 2.1.3.).

La Figura 2.1.3. muestra este comportamiento opuesto entre el sesgo y la desviación estándar relativa para distintos valores de t_i y t_{dwell} . En una publicación previa del grupo de investigación [94], se propuso un criterio basado en las contribuciones de errores sistemáticos y aleatorios asociados al conteo de eventos, utilizando tiempos de lectura en el rango de los milisegundos, para controlar la incertidumbre de los resultados. Para un t_i y un t_{dwell} fijos, existe un flujo óptimo en la intersección de ambas funciones donde la desviación estándar relativa y el sesgo

son iguales y, por tanto, ambos tipos de error contribuyen de igual manera a la incertidumbre en el proceso de conteo. A concentraciones más altas, el sesgo es mayor que la desviación estándar relativa, mientras que a concentraciones menores, es la desviación estándar relativa la que predomina sobre el sesgo. Este flujo óptimo se puede relacionar con la concentración en número de nanopartícula utilizando la ecuación 2.1.2. y las condiciones de nebulización específicas utilizadas. Como se ve en la Figura 2.1.3., la incertidumbre se considera independiente del tiempo de lectura cuando los eventos se registran como señales transitorias, lo que implica trabajar a tiempos de lectura iguales o menores de 100 μ s.

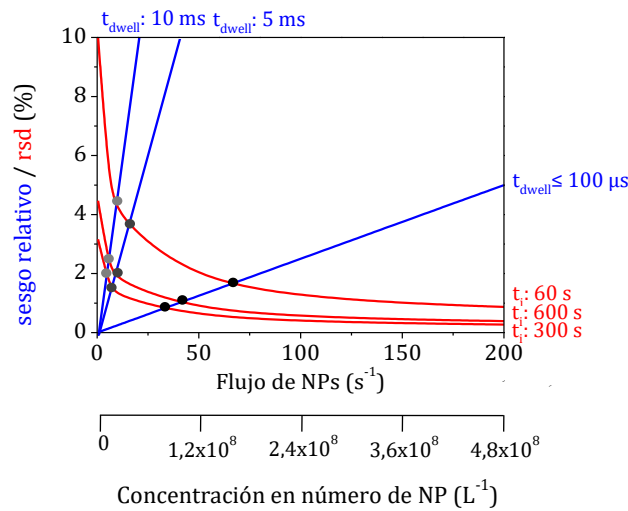


Figura 2.1.3. Comportamiento teórico de la desviación estándar relativa (curvas rojas) y del sesgo relativo (rectas azules) asociado con el conteo de nanopartículas para diferentes tiempos de lectura y de adquisición. Los puntos corresponden al flujo/concentración en número de nanopartículas óptimos para los tiempos de lectura y de adquisición seleccionados.

Bajo las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, con un caudal de introducción de muestra de 0,95 mL min⁻¹, el rendimiento de nebulización fue de 2,6 %. La concentración en número óptima calculada a partir de las ecuaciones 2.1.3 y 2.1.4 o 2.1.5, para un tiempo total de adquisición de 60 s, fue 1,55 x 10⁸ L⁻¹ trabajando a t_{dwell} ≤ 100 μ s, y casi de un orden de magnitud menor al trabajar a 5 o 10 ms (3,40 x 10⁷ y 2,06 x 10⁷ L⁻¹, respectivamente). Los datos de la

Tabla 2.1.3. muestran que al disminuir el tiempo de lectura, la incidencia de eventos debidos a dos nanopartículas disminuye y, por tanto, también lo hace el sesgo, permitiendo de esta manera una concentración en número óptima mayor y mejorando la desviación estándar relativa debido a la estadística del conteo. Utilizando un tiempo total de adquisición de 1 min y un tiempo de lectura de 5 ms, se predice una rsd de 3,6 %; mientras que para tiempos de lectura de 100 y 50 μ s ésta se sitúa en 1,6 %. Estas estimaciones están en consonancia con los valores de rsd obtenidos en la práctica a la concentración en número óptima para nanopartículas de plata de 60 nm: 3,9 %, 1,3 % y 1,4 % (n = 10), respectivamente. Un aumento de 1 a 5 o 10 min en el tiempo total de adquisición, supone una disminución de la rsd de 1,0 % y 0,8 %, respectivamente, con mejoras menores a tiempos mayores. Por tanto, para el sistema de introducción de muestra empleado a lo largo de este trabajo y utilizando tiempos de lectura en el rango de los microsegundos, con un tiempo de adquisición mínimo de 300 s, se puede considerar el 1 % como un límite práctico que se puede conseguir en la precisión de las medidas. Esta situación se podría mejorar aumentando el flujo de nanopartículas a través de la mejora de la eficiencia de la nebulización sin disminuir el caudal de introducción de muestra, lo cual no sucede con los nebulizadores neumáticos convencionales.

Tabla 2.1.3. Concentración en número óptima calculada para diferentes tiempos de lectura y de adquisición y su incertidumbre estimada.

Tiempo lectura	Tiempo total adquisición / s	Concentración en número / L ⁻¹	bias _{NP} = rsd _{NP} / %
10 ms	60	2,06 x 10 ⁷	4,3
5 ms	60	3,40 x 10 ⁷	3,6
≤ 100 μs	60	1,55 x 10 ⁸	1,6
	300	9,98 x 10 ⁸	1,0
	600	8,05 x 10 ⁸	0,8

2.1.3.4. Efecto del tiempo de lectura sobre el rango lineal

La determinación de la concentración en número de nanopartícula se basa en la siguiente expresión:

$$N_{NP} = \eta_{neb} Q_{sam} t_i C_{NP} \quad (2.1.6)$$

donde N_{NP} es el número de eventos contados durante un tiempo de adquisición determinado (t_i). La ecuación 2.1.6. asume que todos los eventos contados se corresponden a una sola nanopartícula. A altas concentraciones en número, se espera que la incidencia de eventos debidos a dos o más nanopartículas sea significativo, tal y como se puede calcular a partir de la ecuación 2.1.1., dando lugar a una desviación de la linealidad debido al sesgo ya discutido en el apartado anterior.

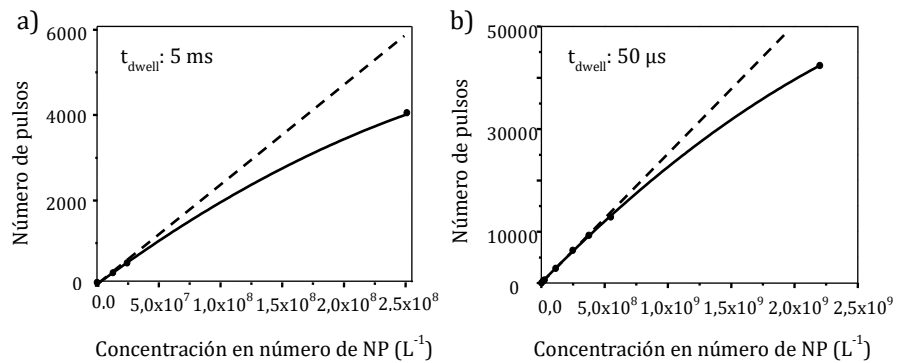


Figura 2.1.4. Calibraciones en concentración en número de nanopartícula para diferentes tiempos de lectura. (a) 5 ms, (b) 50 μ s. Calibración teórica (ecuación 2.1.6.) (línea quebrada); calibración experimental (línea sólida). Suspensión de nanopartículas de oro de 60 nm NIST RM 8013. Tiempo total de adquisición, 60 s.

La Figura 2.1.4. muestra cómo las calibraciones en concentración en número en SP-ICPMS muestran una clara curvatura, tanto a tiempos de lectura de milisegundos como de microsegundos, debido a la incidencia negativa de los eventos debidos a dos o más nanopartículas. Esta incidencia es más significativa al trabajar con tiempos de lectura de milisegundos, por lo que los rangos lineales son más cortos que utilizando microsegundos, tal y como se puede observar en la

Figura 2.1.4. Al utilizar un tiempo de lectura de 5 ms, el rango lineal llega hasta $2,5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$; mientras que al trabajar en el rango de los microsegundos (t_{dwell} , 50 μs), el rango lineal aumenta un orden de magnitud, llegando hasta $3,8 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$. En cualquier caso, la determinación de la concentración óptima es una buena manera de estimar el orden de magnitud del límite superior del rango lineal.

2.1.3.5. Tiempo de lectura y efecto de las especies disueltas

Los iones poliatómicos generados en el plasma y las especies disueltas del elemento medido contribuyen a la señal de fondo que produce una línea base continua que aparece en los barridos de tiempo cuando se trabaja en el modo de detección individual. Al representar los barridos de tiempo como histogramas de frecuencia, esta contribución se corresponde con la primera distribución, la cual debería ajustarse a un perfil de Poisson [64]. El efecto más significativo de altos niveles de señal de fondo o de la presencia de altas concentraciones de especies disueltas es el aumento en los límites de detección en tamaño de nanopartículas. La contribución de los iones poliatómicos del plasma depende del isótopo medido, y resulta crítico en el caso de algunos isótopos (p.ej. ^{56}Fe , ^{48}Ti , ^{28}Si), aunque se puede reducir mediante el empleo de celdas de colisión o reacción [35]. Por otra parte, si la muestra contiene tanto nanopartículas como especies disueltas del mismo elemento, el efecto es similar al producido por las especies poliatómicas y supone la necesidad de eliminar las especies disueltas para solucionar este problema [185].

La Figura 2.1.5. muestra los histogramas correspondientes a suspensiones de nanopartículas de plata de 60 nm ($2,5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$) solas [Fig. 2.1.5. (a-d)] y en presencia de plata disuelta a una concentración de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ [Fig. 2.1.5. (e-h)] y $4 \mu\text{g L}^{-1}$ [Fig. 2.1.5. (i-l)]. Los barridos de tiempo se registraron a 10 y 5 ms, así como a 100 y 50 μs . Idealmente, los histogramas deberían mostrar dos distribuciones: la primera debida a la plata disuelta y la segunda a las nanopartículas. En el caso de la Figura 2.1.5. a-d, donde no se añadió plata disuelta, la primera distribución se produce por plata residual (contribución del blanco). Las especies disueltas se distribuyen de manera homogénea dentro de las gotas del aerosol, produciendo un flujo continuo de analito al plasma y, por tanto, una señal constante de cuentas en el detector, cuya desviación estándar depende únicamente de la estadística de

Poisson, siendo igual a la raíz cuadrada de la señal expresada en cuentas, para señales por debajo de 1000 cuentas [186]. La intensidad en el máximo de estas distribuciones aumenta con la concentración de las especies disueltas, como se puede observar de manera clara en la Fig. 2.1.5. para tiempos de lectura de 10 y 5 ms. Por otra parte, si se acorta el tiempo de lectura, esta intensidad disminuye proporcionalmente, como se ve en la Fig. 2.1.5. (e, f, i, j) para tiempos de lectura de 10 y 5 ms.

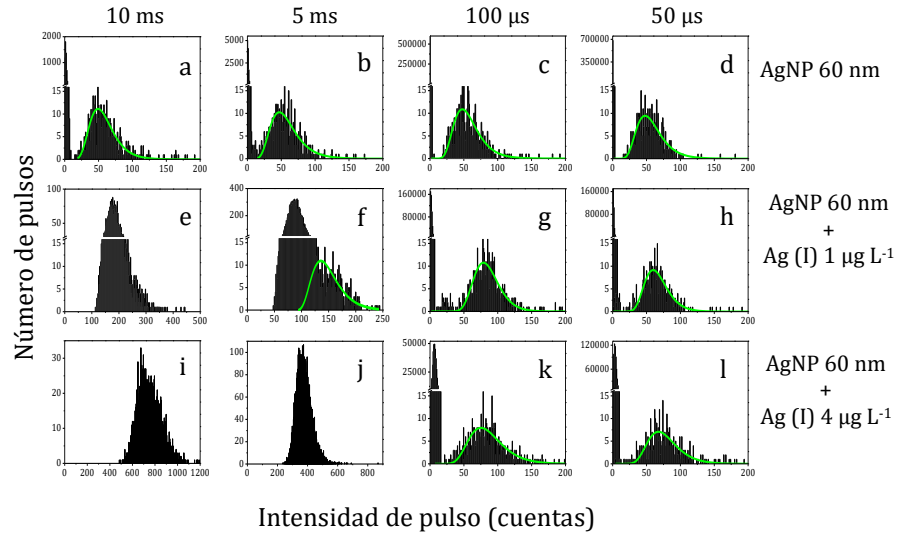


Figura 2.1.5. Histogramas correspondientes a (a-d) suspensiones de nanopartículas de 60 nm de $2,5 \times 10^7 L^{-1}$, (e-h) suspensiones de nanopartículas de 60 nm de $2,5 \times 10^7 L^{-1}$ con $1 \mu g L^{-1}$ de Ag (I), (i-l) suspensiones de nanopartículas de 60 nm de $2,5 \times 10^7 L^{-1}$ con $4 \mu g L^{-1}$ de Ag (I). Tiempos de lectura: 10 ms, 5 ms, 100 μs y 50 μs .

La intensidad correspondiente a especies disueltas/señal de fondo (μ_B) afecta directamente al límite de detección en tamaño alcanzable (LOD_{size}) a través de su desviación de estándar (σ_B). Aplicando un criterio 3σ para nanopartículas esféricas, sólidas y puras, el LOD_{size} viene dado por la siguiente expresión [36,94]:

$$LOD_{size} = \left(\frac{18 \sigma_B}{\pi \rho X_M K_{ICPMS} K_M} \right)^{\frac{1}{3}} = \left(\frac{18 \sqrt{\mu_B + 1}}{\pi \rho X_M K_{ICPMS} K_M} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (2.1.7)$$

donde ρ es la densidad de la nanopartícula, X_M la fracción en masa del elemento en la NP, K_{ICPMS} el rendimiento de detección (relación del número de iones detectados frente al número de átomos introducidos en el ICP), y $K_M (=A N_{Av}/M_M)$ incluye la contribución del elemento medido (A , abundancia atómica del isótopo considerado; N_{Av} , número de Avogrado; M_M , masa atómica). Además de la influencia de las especies disueltas/señal de fondo en el límite de detección en tamaño, la ecuación 2.1.7. incluye el efecto del rendimiento de detección, el cual depende de cada instrumento en particular.

La Tabla 2.1.4. recoge los LOD_{size} calculados de los datos mostrados en la Fig. 2.1.5. para los distintos tiempos de lectura y las diferentes concentraciones de plata disuelta estudiados. Los límites de detección determinados corroboran la apariencia de los histogramas de la Fig. 2.1.5. (e, i, f, j), correspondientes a tiempos de lectura de 10 y 5 ms, donde la distribución correspondiente a las nanopartículas queda parcial o completamente solapada con la distribución de la plata disuelta. Por otra parte, al trabajar en el rango de los microsegundos (100 y 50 μ s), a pesar de que la presencia de plata disuelta también afecta a los límites de detección, el efecto es menos crítico, permitiendo la identificación de distribuciones de nanopartículas de plata incluso en presencia de 4 μ g L⁻¹ de plata disuelta.

Tabla 2.1.4. Límites de detección en tamaño para nanopartículas de plata en presencia de distintas concentraciones de plata (I) disuelta.

Tiempo de lectura	LOD _{size} / nm		
	Agua ultrapura	1 μ g L ⁻¹ Ag (I)	4 μ g L ⁻¹ Ag (I)
10 ms	17	34	43
5 ms	16	30	39
100 μ s	14	17	21
50 μ s	14	16	19

2.1.3.6. Aproximación práctica para la cuantificación de la concentración en número de nanopartículas

La cuantificación correcta de una suspensión de nanopartículas implica la selección de la dilución adecuada, en función de la concentración original, y

gestionar convenientemente la presencia de especies disueltas. Si la concentración de nanopartículas no es demasiado baja, eligiendo la dilución más conveniente, se puede llevar a cabo la determinación en torno a la concentración óptima de nanopartículas para conseguir la mejor incertidumbre. De manera similar, se puede reducir la contribución del elemento disuelto, mejorando así los límites de detección en tamaño y permitiendo la detección de nanopartículas. Como ya se ha comentado anteriormente, seleccionando tiempos de lectura del orden de microsegundos, la contribución de las especies disueltas se puede reducir también de manera significativa. Además, el uso de tiempos de lectura iguales o menores de 100 μs permite conseguir rsd y sesgos menores, los cuales no dependen del tiempo de lectura seleccionado.

Desde un punto de vista práctico, la manera más sencilla de seleccionar la dilución correcta correspondiente a la concentración óptima consiste en comprobar el número de eventos de nanopartícula registrados a partir una dilución inicial. A partir de las condiciones experimentales utilizadas (rendimiento de nebulización, caudal de introducción de muestra, tiempo de lectura, tiempo total de adquisición) se puede calcular la concentración óptima correspondiente, así como el número de eventos de nanopartículas que deberían ser contados (Ecuaciones 2.1.3. – 2.1.5.). Comparando el número de eventos esperados y el medido, la dilución correcta se puede encontrar fácilmente de manera iterativa. Por ejemplo, teniendo en cuenta las condiciones utilizadas en este trabajo (Tabla 2.1.1.), con un rendimiento de nebulización del 2,6 %, un tiempo total de adquisición de 1 min, y un tiempo de lectura de 50 μs , la concentración óptima calculada es de $1,55 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, lo que debería dar lugar a 3900 eventos. De esta manera, una dilución de la muestra que produjera en torno a 4000 eventos sería la mejor elección. Por el mismo motivo, una calibración con un estándar en torno a estos valores produciría los mejores resultados [187]. La Tabla 2.1.5. muestra los resultados obtenidos para la determinación de la concentración en número de suspensiones de nanopartículas de 60 y 100 nm utilizando la aproximación descrita anteriormente. La calibración se realizó con nanopartículas de oro de 60 nm NIST RM 8013. Se obtuvieron recuperaciones cuantitativas en torno al 99-109 %.

La Tabla 2.1.6. muestra la capacidad de SP-ICPMS al utilizar tiempos de lectura de microsegundos (100 y 50 μs) para la cuantificación de concentraciones de nanopartículas del orden de ng L^{-1} en presencia de especies disueltas en

concentraciones del orden de $\mu\text{g L}^{-1}$. Las nanopartículas de Ag de 60 nm fueron cuantificadas en presencia de 1 y 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Ag (I) con recuperaciones alrededor de 85-98 %.

Tabla 2.1.5. Determinación de la concentración en número de nanopartícula de suspensiones comerciales de nanopartículas. Media \pm intervalo de confianza ($n = 3$).

Tamaño	Concentración en número / L^{-1}		
	Calculada	Medida	
		t_{dwell} : 100 μs	t_{dwell} : 50 μs
60 nm	$2,23 \pm 0,17 \times 10^8$	$2,35 \pm 0,02 \times 10^8$	$2,43 \pm 0,12 \times 10^8$
100 nm	$2,34 \pm 0,37 \times 10^8$	$2,32 \pm 0,05 \times 10^8$	$2,44 \pm 0,07 \times 10^8$

Tabla 2.1.6. Determinación de la concentración en número de nanopartícula de suspensiones de nanopartículas de plata de 60 nm en presencia de Ag (I). Media \pm intervalo de confianza ($n = 3$).

Concentración Ag (I)	Concentración en número / L^{-1}		
	Calculada	Medida	
		t_{dwell} : 100 μs	t_{dwell} : 50 μs
1 $\mu\text{g L}^{-1}$	$2,47 \pm 0,17 \times 10^7$	$2,41 \pm 0,35 \times 10^7$	$2,18 \pm 0,15 \times 10^7$
4 $\mu\text{g L}^{-1}$	$2,46 \pm 0,17 \times 10^7$	$2,17 \pm 0,25 \times 10^7$	$2,09 \pm 0,32 \times 10^7$

2.1.4. CONCLUSIONES

La disponibilidad de instrumentos comerciales ICPMS de cuadrupolo con capacidad para realizar barridos ultrarrápidos, utilizando tiempos de lectura de hasta 10 μs y eliminando el tiempo de asentamiento, ha abierto nuevas posibilidades en la detección de partículas individuales mediante ICPMS. Aparte de la capacidad de monitorizar más de un isótopo por partícula, el uso de tiempos de lectura en el rango de los microsegundos permite trabajar con mayores concentraciones de nanopartículas sin que se produzcan solapamientos de señales, lo que se traduce en mayores rangos lineales para calibraciones en concentración en número, y una mejor precisión, hasta 1 % e incluso mejor, con respecto al uso de

tiempos de lectura en el rango de los milisegundos. Además, estas mejoras son independientes del tiempo de lectura seleccionado si éste es igual o menor de 100 μ s y mayor de 10 μ s. Por otra parte, la presencia de especies disueltas, así como la existencia de altos niveles de señal de fondo, se puede solucionar de manera más sencilla que al trabajar en el rango de los milisegundos porque los límites de detección en tamaño están menos afectados por la presencia de las especies disueltas.

A pesar de las ventajas de utilizar tiempos de lectura de microsegundos en SP-ICPMS, siempre hay que tener en cuenta que las condiciones óptimas de trabajo para la obtención de resultados de la mejor calidad, van a depender del instrumento y de las condiciones experimentales utilizadas y que requieren un selección caso por caso.

2.2. DETECTION AND CHARACTERIZATION OF SELENIUM NANOPARTICLES IN SELENIZED YEASTS BY SP-ICPMS

2.2.1. INTRODUCTION

Selenium is an essential element which plays a fundamental role in human health. Selenium is well known for its high biological activity as antioxidant and catalyst for the production of thyroid hormone. It is equally necessary for the proper functioning of the immune system and is suspected of working as protector against some types of cancer [188]. Diet is the main source of selenium in humans. Selenium-enriched yeast grown in the presence of selenite is one of the most popular food supplement of selenium [189,190]. However, excess selenium intakes can turn into adverse health effects. The concentration range in which selenium is considered physiologically essential or toxic is relatively narrow [191]. Selenium occurs in four valence states: +6 (selenate), +2 (selenite), -2 (selenide) and 0 (elemental selenium), and can form compounds with oxygen, sulfur, metals, and/or halogens [192]. The environmental fate and the toxicity of selenium strongly depend on its chemical speciation, with water soluble oxyanions selenite (SeO_3^{2-}) and selenate (SeO_4^{2-}) showing the highest toxic effects to biota [192,193]. Therefore, bioavailability and positive or negative effect of selenium depend on its concentration and on the chemical form in which it is present. Due to its importance, many studies about speciation of selenium in selenium-enriched yeasts have been published [194–200]. The analytical methods currently available allow the determination of selenomethionine, selenocystein and the speciation of selenium present in small water-soluble molecules (selenometabolome) and in water-insoluble proteins (selenoproteome) [194]. However, the experience over the past decade indicates that, with the exception of a few samples, there is a gap between the mass balance of selenium in the identified species and the total selenium concentration which would suggest the presence of unaccounted forms of selenium [189,194].

Tailored metal/metalloid biogenic nanoparticles with specific physicochemical properties have been shown to be highly toxic to several pathogenic bacteria and may offer an attractive alternative as therapy for infections by antibiotic resistant bacteria. In particular selenium nanoparticles (SeNPs)

synthesized by microorganisms, such as bacteria, fungi or yeast were demonstrated to possess antibacterial, antiviral and antioxidant properties [201,202]. The process of the Se⁰ nanoparticle formation is based on the reduction of a toxic selenate or selenite to the less toxic (for the host organism) elemental selenium through the intra- or extracellular formation of SeNPs with a typical spherical shape and a diameter of 50-400 nm [203,204].

Fine characterization of yeast samples is essential for regulatory and safety agencies. For that reason, it is necessary to develop analytical methods in order to provide information about all the selenium species in food, being elemental selenium in its nanoparticulate form one of these species.

The specific objectives in this chapter are:

- The development of a methodological approach based on the use of SP-ICPMS for detection and characterization of selenium nanoparticles.
- The application of this approach to complex samples like Se-enriched yeasts.
- To verify the occurrence of nanoparticulate selenium in Se-enriched yeast, in order to consider this species in the speciation scenario of the element.

2.2.2. EXPERIMENTAL

Instrumentation

- SP-ICPMS analysis and data processing

An Agilent 7900 Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (ICPMS) (Agilent, Tokyo, Japan) was used throughout. The sample introduction system consisted of a concentric nebulizer and a quartz cyclonic spray chamber. Default instrumental and data acquisition parameters are listed in Table 2.2.1. Settling time during data acquisition was eliminated.

Nebulization efficiency was calculated according to the particle frequency method developed by Pace et al. [65], already explained in the Section 2.1.2. The sample flow rate was calculated daily by measuring the mass of water taken up by

the peristaltic pump for two minutes. This operation was repeated three times and the average value used for calculations.

Dwell times of 5 ms and 100 μ s were studied. Single Nanoparticle Application Module for ICPMS MassHunter software and Excel (Microsoft, Redmond, USA) spreadsheets were used for data processing. OriginPro 8 data analysis software (OriginLab Corporation, Northampton, USA) and MatLab software (MathWorks, Natick, USA) were also used.

Table 2.2.1. *Default instrumental and data acquisition parameters for single-particle ICPMS.*

Instrumental parameters	
RF Power	1550 W
Argon gas flow rate	
Plasma	15 L min ⁻¹
Auxiliary	0.9 L min ⁻¹
Nebulizer	1.10 L min ⁻¹
Reaction cell flow rate (H₂)	5.0 mL min ⁻¹
Sample uptake rate	0.35 mL min ⁻¹
Data acquisition parameters	
Dwell time	5 ms, 100 μ s
Readings per replicate	12000, 600000
Settling time	-
Total acquisition time	60 s
Isotopes monitored	⁷⁸ Se, ⁸⁰ Se, ¹⁹⁷ Au

In order to get right size distributions, initial MassHunter signal distributions were corrected.

The relationship between the signal R (ions counted per time unit) and the mass concentration C^M of a solution of an analyte nebulized into an ICPMS, can be expressed as [94]:

$$R = K_{intr} K_{ICPMS} K_M C^M \quad (2.2.1)$$

On the other hand, for a suspension of spherical, solid and pure nanoparticles, the total counts per nanoparticle (r_P) can be expressed as:

$$r_P = K_{ICPMS} K_M m_P \quad (2.2.2)$$

or to the size of the particle if the composition, shape and density of the particle are known):

$$r_P = \frac{1}{6} \pi \rho X_P K_{ICPMS} K_M d^3 \quad (2.2.3)$$

Measuring a dissolved selenium standard and knowing the value of K_{intr} (= $\eta_{neb} Q_{sam}$), " $K_{ICPMS} K_M$ " term can be deduced from Equation 2.2.1. Once this term is known, the MassHunter signal distribution histograms can be transformed into mass distribution histograms and hence into size distribution ones.

- Size Exclusion chromatography – ICPMS

A Superdex Peptide 10/300 GL column (GE Healthcare, Pittsburgh, USA) was coupled to an Agilent 7700x ICPMS (Agilent, Tokyo, Japan) instrument. Chromatographic separations were performed by using a model 1200 series HPLC pump (Agilent) as a delivery system. The exit of the column was connected in series to an UV-visible detector (Agilent) and the ICPMS instrument.

- Transmission electron microscopy

Samples were prepared on holey carbon films on mesh copper grids. A few microliters of each sample were dropped on the grid and left to dry completely. Images were obtained using a FEI TECNAI 12 (FEI, Hillsboro, USA) and recorded using an ORIUS SC1000 11MPx (GATAN, Pleasanton, USA) CCD camera. The microscope was equipped with an energy-dispersive X-ray analysis system for elemental analysis.

Reagents and chemicals

Diluted suspensions of gold and selenium nanoparticles were prepared from commercially available suspensions. A reference gold nanoparticle suspension

RM 8013 of 60-nm nominal diameter was obtained from NIST (NIST, Maryland, USA). Suspensions of selenium nanoparticles of nominal diameters lower than 50 and 100 nm were purchased from Nanocs (Nanocs, New York, USA). Dilutions were prepared in ultrapure water by accurately weighing (± 0.1 mg) aliquots of the stock suspensions after 1 min sonication. After dilution and before each analysis, the suspensions were bath sonicated for 1 min. Longer sonication times were not used to avoid excessive heating of the suspensions.

Aqueous selenium solutions were prepared from a standard stock solution of 10000 mg L⁻¹ (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) by dilution in ultrapure water. Ultrapure water (18.2 M Ω cm) obtained from a Milli-Q system (Millipore, Guyancourt, France) was used throughout.

Samples

A selenium-rich Brewer's yeast sample, corresponding to a yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* was used.

Procedures

- Acid digestion

The content of total selenium in selenium nanoparticle suspensions was determined by ICPMS following acid digestion in a DigiPREP digestion system (SCP Science, Quebec, Canada). 250 μ L of H₂O₂ (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France) and 1 mL of conc. HNO₃ (Baker, Daventer, Holland) were added to 250 μ L of sample. The digestion was performed at 65 °C for 270 min. After digestion the volume was made up to 50 mL so that the final medium was HNO₃ 2% (v/v). Digestions were made in duplicate. Blank attacks were also performed.

- Enzymatic digestion

200 mg of the Se-enriched yeast sample were sonicated for 1 hour with 5 mL of ultrapure water and then centrifuged at 5000 rpm for 10 min. The supernatant was discarded and 5 mL of driselase (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) 4% (m/v) in Tris (Sigma Aldrich) 30 mM at pH 7.5 were added to the residue. The sample was incubated during 17 hours at 25°C and centrifuged at 5000 rpm for 10 min. The supernatant was discarded and finally, 5 mL of sodium

dodecyl sulphate (SDS, Sigma Aldrich) of 4% (m/v) were added to the residue. The suspension was sonicated for 1 hour and centrifuged at 5000 rpm for 10 min. This supernatant was collected for further analysis.

2.2.3. RESULTS AND DISCUSSION

2.2.3.1. Selection of instrumental parameters for the improvement of size detection limits

Selenium is an element with six naturally occurring isotopes: ^{74}Se , ^{76}Se , ^{77}Se , ^{78}Se , ^{80}Se and ^{82}Se , all of them suffering from spectral interferences in ICPMS, due to atomic or molecular ions from the plasma and/or the matrix. Table 2.2.2 shows the isotopic abundance and the most frequent spectral interferences for each isotope [205]. This problem has been overcome in quadrupole ICPMS by selecting less-interfered isotopes (e.g., ^{82}Se) or using mathematical correction equations, although the use of reaction/collision cells is most widely applied at present [206], allowing the use of the most abundant isotopes ^{80}Se and ^{78}Se [207,208], which are seriously interfered by Ar dimers. Selenium can be measured in collision mode by using He [209], as well as in reaction mode by using H_2 [207,209], CH_4 [210,211] or O_2 [212]. Most recently ICP-MS/MS approaches using O_2 or mixtures O_2/H_2 have been proposed [209].

Table 2.2.2. *Isotopic abundance and spectral interferences for Se isotopes.*

Isotope	Abundance (%)	Interference
^{74}Se	0.89	$^{37}\text{Cl}_2^+$, $^{38}\text{Ar}^{36}\text{Ar}^+$, $^{38}\text{Ar}^{36}\text{S}^+$, $^{40}\text{Ar}^{34}\text{S}^+$, $^{74}\text{Ge}^+$
^{76}Se	9.36	$^{40}\text{Ar}^{36}\text{Ar}^+$, $^{38}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+$, $^{40}\text{Ar}^{36}\text{S}^+$, $^{76}\text{Ge}^+$, $^{39}\text{K}^{37}\text{Cl}^+$
^{77}Se	7.63	$^{40}\text{Ar}^{36}\text{ArH}^+$, $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$, $^{38}\text{Ar}_2\text{H}^+$, $^{41}\text{K}^{36}\text{Ar}^+$, $^{42}\text{Ca}^{35}\text{Cl}^+$
^{78}Se	23.78	$^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+$, $^{78}\text{Kr}^+$, $^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ca}^+$, $^{64}\text{Zn}^{14}\text{N}^+$, $^{44}\text{Ca}^{34}\text{S}^+$
^{80}Se	49.61	$^{40}\text{Ar}_2^+$, $^{79}\text{BrH}^+$, $^{80}\text{Kr}^+$, $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ca}^+$
^{82}Se	8.73	$^{81}\text{BrH}^+$, $^{40}\text{Ar}^{42}\text{Ca}^+$, $^{40}\text{Ar}_2\text{H}_2^+$, $^{82}\text{Kr}^+$, $^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}_2^+$

Measurement of selenium nanoparticles by SP-ICPMS is severely compromised by the attainable size detection limits. Lee et al. [35] estimated a size detection limit greater than 200 nm, considering ^{76}Se and no collision/reaction cell,

although these detection limits can be improved by reducing the background signal or increasing the sensitivity, as it will be further discussed.

The influence of the isotope selected and the use of H₂ as reaction gas on the background level was firstly studied. Considering the two most abundant selenium isotopes, ⁷⁸Se and ⁸⁰Se, apart from the contribution of residual krypton in the argon supply, the main plasma background contributions at masses 78 and 80 arise from argon dimers. Table 2.2.3. summarizes the background signals and the associated noise, expressed as standard deviation, as well as the sensitivity (slope of the calibration curve for dissolved selenium in ultrapure water) and the attainable concentration detection limits for the different selenium isotopes in standard and reaction cell modes.

Table 2.2.3. Background signals, associated noise (expressed as standard deviation of background), sensitivity and attainable concentration detection limits for the different selenium isotopes when measuring with or without reaction cell.

Se	H ₂ cell	Background (cps)	Noise (cps)	Sensitivity (cps L μg ⁻¹)	LD (μg L ⁻¹)
80	No	63700000	2160000	O/R	---
78	No	41300	18800	7700	7.33
80	Yes	90	995	40600	0.074
78	Yes	8	300	17800	0.051

Whereas the direct measurement at the mass 80 is unfeasible, with background signals up to 6.4×10^7 cps, at mass 78 an averaged background of 4.1×10^4 cps was measured. However, when the reaction cell was used (H₂ at 5.00 mL min⁻¹) the background levels decreased down to 8 and 90 cps at masses 78 and 80, respectively. Therefore the use of the reaction cell leads to an important decrease of background signals in both cases, being more pronounced at mass 80. If sensitivities at mass 78 with and without reaction cell are compared, an improvement of more than twice is observed using H₂. On the other hand, sensitivities of 17800 cps L μg⁻¹ and 40600 cps L μg⁻¹ were obtained in ultrapure water for ⁷⁸Se and ⁸⁰Se, respectively, working with reaction cell and measuring a

dissolved selenium multiple-points calibration. Concentration detection limits were lower when reaction cell was used.

Isobaric and matrix/plasma polyatomic interferences, as well as dissolved species of the element measured contribute to the continuous baseline in the typical time scans recorded in single particle mode. The most significant effect of a high baseline level is the loss of capability to identify particles with smaller amounts of the element measured, and hence the increment of the size detection limits [94]. In the case of selenium, this problem can be overcome by selecting a high abundance isotope, in combination with the reduction of the background level by using a collision/reaction cell. On the other hand, the use of microsecond dwell times instead of milliseconds, involves a reduction of the absolute baseline level and hence of the related noise. When working in single particle mode, different data acquisition frequencies can be chosen depending on the features of the instruments. By using dwell times in the millisecond range (3-10 ms), events corresponding to the detection of single particles are detected as pulses, whereas they are detected as transient signals when microsecond dwell times (<100-200 μ s) are selected. On the other hand, the plasma background, along with dissolved species if present, produce a constant signal whose magnitude (expressed in counts) decreases if dwell times are shortened [213], whereas the corresponding noise diminishes according to the square root of the background (for signals below ca. 1000 counts, when shot noise is the main contribution to noise) [64].

Figure 2.2.1. shows the time scans corresponding to ultrapure water when monitoring ^{78}Se and ^{80}Se with and without reaction cells and using different dwell times (5 ms and 100 μ s). Table 2.2.4. shows the average counts baseline measured in ultrapure water with the conditions shown in Figure 2.2.1.

As it can be seen, the background signal is substantially decreased when the reaction cell is used. Moreover, working in the microsecond range [Figure 2.2.2 (d-g)] instead of in the millisecond range [Figure 2.2.2 (a-c)] allows to reduce the contribution of the background. For instance, when working with reaction cell at a dwell time of 5 ms a baseline of 3.4 counts baseline was measured for ^{80}Se . However, when the dwell time was shortened to 100 μ s the intensity of the baseline was close to 0 counts, achieving a value of 0.0092. The reduction in the background signal leads to an improvement in the size detection limits.

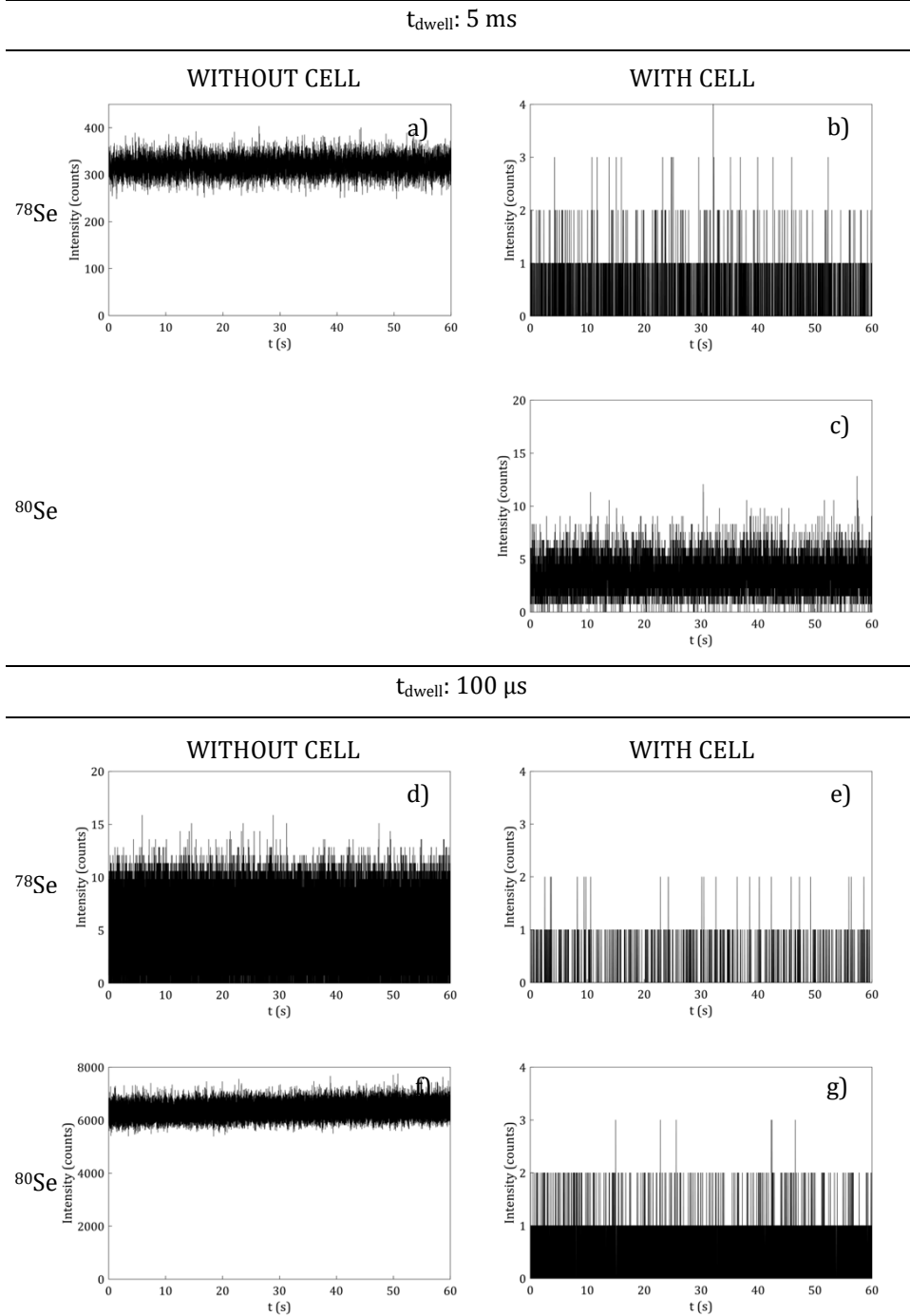


Figure 2.2.1. Time scans of ultrapure water monitoring (a, d) ^{78}Se without reaction cell; (b, e) ^{78}Se with reaction cell; (f) ^{80}Se without reaction cell and (c, g) ^{80}Se with reaction cell. Dwell time: 5 ms (a-c); 100 μs (d-g).

Table 2.2.4. Background signal (counts) for the different selenium isotopes when measuring with or without reaction cell and at different dwell times.

Dwell time	H ₂ cell	Background signal(counts)	
		⁷⁸ Se	⁸⁰ Se
5 ms	No	320	-
	Yes	0.12	3.4
100 μs	No	4.1	6370
	Yes	0.00082	0.0092

2.2.3.2. Size detection limits

The intensity corresponding to the dissolved species or/and the background (μ_B) affects directly the attainable size detection limit (LOD_{size}) through its standard deviation (σ_B). Applying a 3σ criterion for spherical, solid, and pure nanoparticles, the LOD_{size} is given by [36,94]:

$$LOD_{size} = \left(\frac{18 \sigma_B}{\pi \rho X_M K_{ICPMS} K_M} \right)^{\frac{1}{3}} = \left(\frac{18 \sqrt{\mu_B}}{\pi \rho X_M K_{ICPMS} K_M} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (2.2.2)$$

where ρ is the density of the nanoparticle and X_M the mass fraction of the element in the nanoparticle. Apart from the influence of dissolved/background on LOD_{size} , Equation 2.2.2. includes the detection efficiency, which depends on each particular instrument.

Table 2.2.5. summarizes the LOD_{size} calculated for different selenium isotopes and dwell times in ultrapure water. By monitoring the most abundant isotope ⁸⁰Se, working with H₂ as reaction gas and with a dwell time of 100 μs, a size detection limit of 18 nm could be achieved.

Table 2.2.5. Size detection limits for selenium nanoparticles in ultrapure water, nm.

Dwell time	H ₂ cell	⁷⁸ Se, LOD_{size}	⁸⁰ Se, LOD_{size}
5 ms	No	83	-
	Yes	25	24
100 μs	No	43	-
	Yes	24	18

Taking everything into account, monitoring ^{80}Se and working with a reaction cell seems to be the best choice for the detection of selenium nanoparticles by SP-ICPMS.

2.2.3.3. Selenium nanoparticles

Commercial suspensions of selenium nanoparticles of 50 and 100 nm nominal diameters were analyzed in single detection mode. Transient signals with a median width of 800 and 900 μs were observed for the 50-nm and 100-nm suspensions respectively when ^{78}Se was monitored (Table 2.2.6). The width of the signals increased with size. Moreover, this peak width seemed to be affected by the use of a reaction gas, leading to a higher dispersion of the peak widths but keeping the median values constant when the reaction cell was used.

Compared with the Perkin Elmer NexIon 350X instrument, the Agilent 7900 produced transient signals with a width almost double. Thus, although the minimum reading time with the Agilent instrument is 100 μs , about 8-9 measurements can be obtained along each transient signal.

Table 2.2.6. Duration of selenium nanoparticles transient signals, μs (median \pm interquartile range).

SeNPs suspension	Without H ₂ cell	With H ₂ cell
50 nm	800 \pm 200	800 \pm 300
100 nm	900 \pm 300	900 \pm 400

On the other hand, a different response for the dissolved and the nanoparticulate selenium forms was observed. The total content of selenium in the selenium nanoparticles suspensions was determined by direct analysis of the diluted suspensions of nanoparticles, as well as after their acid digestion, calibrating against aqueous standards of selenium in ultrapure water and HNO₃ 2%, respectively. In order to check if the digestion procedure had been complete, the corresponding digested solutions were also measured in single particle mode. No nanoparticle signals were observed, therefore all the selenium present was in its dissolved form. The concentrations determined in ultrapure water for the 50-nm

and 100-nm SeNPs suspensions were $81.0 \pm 3.4 \%$ and $66.1 \pm 7.6 \%$ compared to the concentration determined after acid digestion, respectively (Table 2.2.7.). These results show that ICPMS sensitivity is dependent on the physicochemical form of selenium, but also on the size of the nanoparticles.

The different behaviour observed from dissolved and particulate forms of selenium involves that the use of dissolved selenium standards for calculations of the selenium mass per particle or the size of a selenium particle will produce a negative bias and selenium particles with similar content or size of the targets should be used as standards.

Table 2.2.7. *Determination of selenium concentration of commercial selenium nanoparticles in standard mode, mg L^{-1} (mean \pm standard deviation).*

Sample	50-nm	100-nm
Acid digestion	148.6 ± 5.5	92.11 ± 1.20
Suspensions in water	120.3 ± 2.2	60.85 ± 6.93

2.2.3.4. Detection and characterization of biogenic SeNPs in Se-enriched yeasts

The developed method was applied for the detection and characterization of potential naturally occurring selenium nanoparticles present in selenium enriched yeast.

Yeast samples were subjected to an enzymatic digestion prior to their injection into a size exclusion column for the separation of the seleno-proteins, as explained in Section 2.2.2. After this procedure, the samples were injected into a size exclusion chromatography column coupled to UV-visible and ICPMS (^{78}Se was monitored). The chromatogram obtained is shown in Figure 2.2.2. (a). As it can be observed, a selenium-bearing peak was eluted at 10 min, corresponding to the void volume. Besides, the absorbance at 565 nm, associated to selenium nanoparticles [214,215], was also registered. The UV-visible chromatogram [Figure 2.2.2. (b)], also shown a peak at the void volume, suggesting the presence of selenium species over the separation size range of the column.

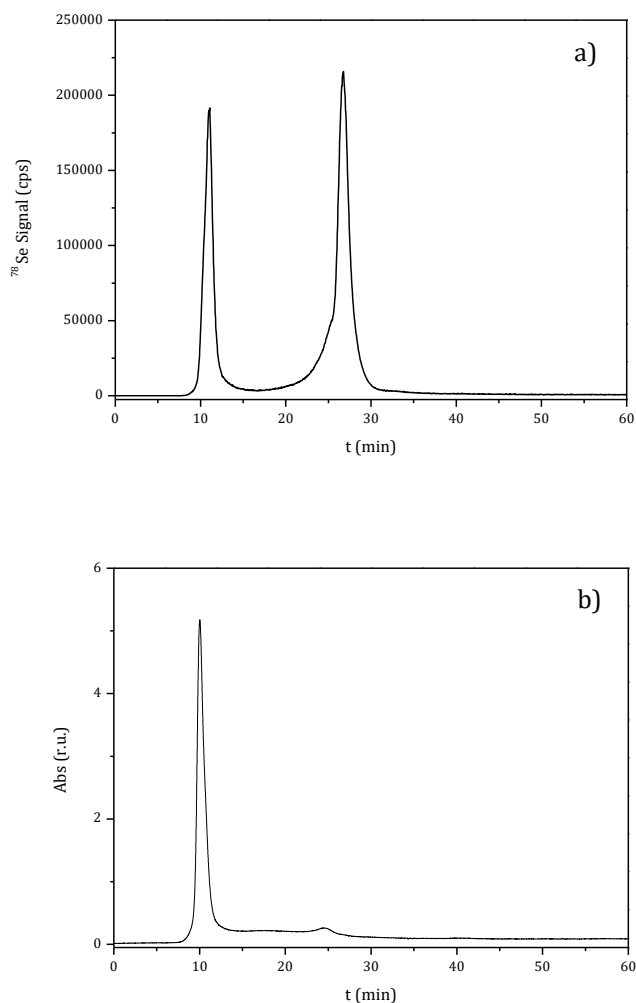


Figure 2.2.2. Chromatograms of a selenium enriched yeast sample after the digestion procedure, obtained by (a) ^{78}Se ICPMS signal; (b) UV-Vis signal recorded at 565 nm. The first peak corresponds to the void volume of the column.

In order to check if the signal observed at the void volume of the size exclusion chromatogram was due to the presence of selenium nanoparticles, the sample of yeast after the digestion procedure and the collected fraction corresponding to the void volume in the chromatogram were analyzed by SP-ICPMS under the optimal conditions previously optimized (monitoring ^{80}Se , with H_2 reaction cell, dwell time: 100 μs). The time scans obtained showed a significant

number of signals above the background related to the presence of selenium-bearing particles in both cases. Figure 2.2.3. shows the corresponding time scans and the signal distribution histograms.

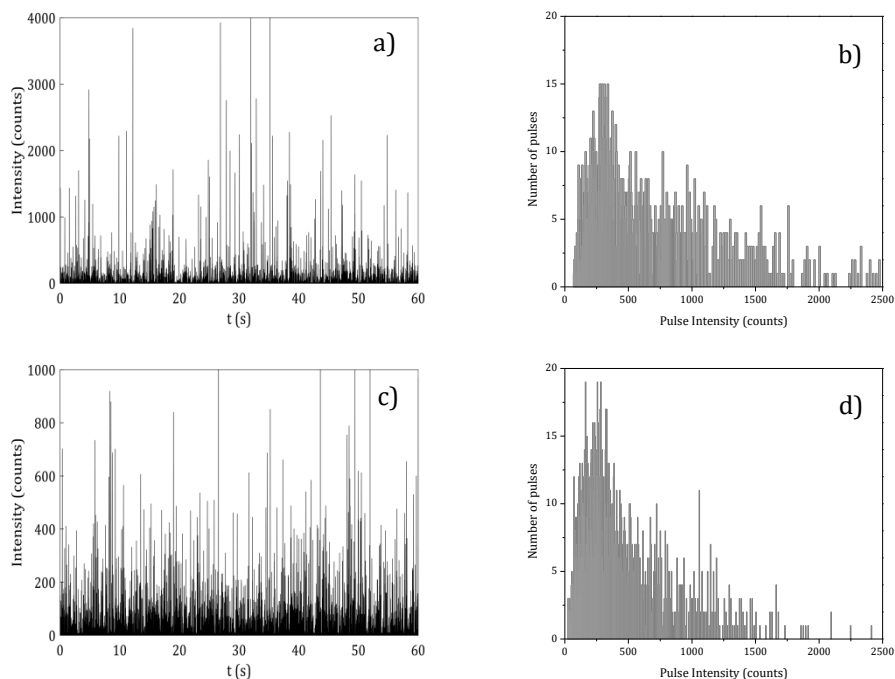


Figure 2.2.3. ^{80}Se time scans and signal distribution histograms corresponding to (a-b) digested sample; (c-d) digested sample post column.

According to single particle theory and in order to get a reliable size distribution from the time scans, additional information about the composition and shape of the particles is required. In order to know the nature of the particles additional techniques like transmission electron microscopy (TEM) and energy dispersive X-ray spectroscopy (X-EDS) were used. TEM images and X-EDS spectra obtained confirmed the presence of spherical particles whose composition was associated to elemental selenium (Figure 2.2.4.). Note that due to the low concentration of SeNPs in the sample, the number of particles detected in the images was too low to obtain a representative histogram.

Once the composition and shape of the particles were obtained, the SP-ICPMS time scans were transformed into size distributions, using the density of bulk elemental selenium (4.79 g cm^{-3}) (Figure 2.2.5). Due to the different behaviour between the size and the physicochemical form of selenium (previously described

in Section 2.2.3.3.) and to the size of particles observed by TEM (around 100 nm), a correction factor of 66 % was applied on the mass of selenium per nanoparticle. Transformation from signal distribution histograms into size distribution histograms are explained in Section 2.2.2. A broad distribution of selenium nanoparticles, from 60 to 200 nm was observed in the case of the digested sample. The size distribution was fitted into a log normal distribution and median diameter calculated, obtaining an average diameter (n=5) of 108 ± 4 nm. On the other hand, a similar size distribution was obtained for the fraction collected from the void volume of the chromatogram, with an average diameter of 97 ± 3 nm. These results are in good agreement with the data from TEM, where nanoparticles around 100 nm were measured and confirmed that a process of biosynthesis of selenium nanoparticles occurs in selenium enriched yeast.

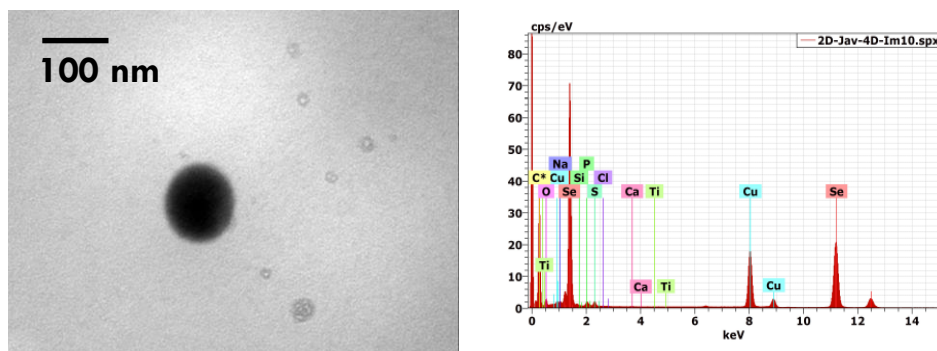


Figure 2.2.4. Transmission electron microscope image and X-EDS spectrum obtained for digested sample.

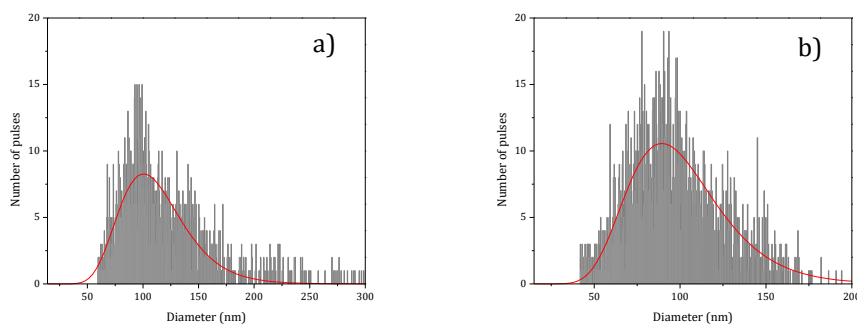


Figure 2.2.5. Size distributions obtained by SP-ICPMS for (a) digested sample; (b) digested sample post column.

2.2.4. CONCLUSIONS

A methodological approach based on the use of SP-ICPMS has been developed in order to detect and characterize selenium nanoparticles in complex samples.

The proper selection of the instrumental parameters has led to a size detection limit of 18 nm. Different sensitivities and behaviours were observed between the dissolved and the nanoparticulate forms of selenium.

In relation with the size characterization of particles, SP-ICPMS just provides information about the mass of element per particle. Thus to obtain information about size, additional information about shape, composition and density must be known to transform the mass into size. For this purpose it is necessary the use of complementary techniques in order to know the nature of the particles in question. Therefore, SP-ICPMS must be used in combination with other characterization techniques to fully explore the capabilities of the technique.

The analysis of natural occurring selenized yeasts by SP-ICPMS confirmed the presence of selenium nanoparticles in the samples. Moreover, the use of SP-ICPMS together with TEM and EDS allowed to estimate their size.

IV. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

La plataforma de métodos analíticos basados en el uso de ICPMS propuesta se ha aplicado a distintos problemas analíticos y distintos tipos de muestras conteniendo nanopartículas de plata y otras especies derivadas de las mismas. Los problemas han incluido: estudios de liberación a partir de superficies recubiertas, *nanocomposites* y micropartículas de arcillas en medios de complejidad creciente (agua ultrapura, cultivos de algas en ensayos de ecotoxicidad, vinos y procesos de digestión *in vitro*), así como al análisis de células humanas procedentes de ensayos de nanotoxicidad. La evaluación de los resultados obtenidos ha permitido extraer las siguientes conclusiones:

- En el caso de estudios de liberación de plata a partir de materiales que contengan nanopartículas (recubrimientos superficiales, *nanocomposites*, arcillas) en medios sencillos (agua ultrapura), la **ultrafiltración** con membranas de diámetros de poro bajos (3 kDa, equivalente a 1-3 nm) es una estrategia cuantitativa, rápida y sencilla para separar nanopartículas de plata de las correspondientes formas iónicas (Ag^+) y otros posibles complejos de plata (I) con ligandos de bajo peso molecular, producto de la oxidación de las nanopartículas, que son cuantificados mediante ICPMS en la fracción ultrafiltrada.

Esta metodología resulta inadecuada en el caso de que en el medio en el que se libera la plata (I) se encuentren presentes ligandos de elevado peso molecular, como es el caso de las sustancias poliméricas extracelulares presentes en cultivos de algas para ensayos de ecotoxicidad o de distintos tipos de macromoléculas presentes en vinos o en procesos digestivos.

- Las prestaciones de la **detección de partículas individuales mediante ICPMS** se encuentran comprometidas por los límites de detección en tamaño que se puedan alcanzar. Estos límites dependen del contenido en especies disueltas del elemento medido y de la instrumentación utilizada. En la primera parte de esta Tesis se ha utilizado un espectrómetro de masas capaz de trabajar con tiempos de lectura del orden de milisegundos y con un rendimiento de detección inferior a los utilizados en la segunda parte, por lo que los límites de detección en el caso

de las nanopartículas de plata han sido del orden de los 24 nm o superiores. Por este motivo, y debido al tamaño que presentaban las nanopartículas en todos los casos estudiados, la detección de partículas individuales mediante ICPMS sólo ha podido ser utilizada como técnica de *screening*, para detectar la presencia de nanopartículas en algunos de los casos estudiados (liberación de nanopartículas a partir de recubrimientos y de *nanocomposites*).

Por otro lado, el análisis de suspensiones que contengan alguna forma de plata asociada a micropartículas, como en el caso de los estudios sobre arcillas, implican la presencia de las micropartículas de tamaño inferior al establecido en los tratamientos de separación previos que pueden interferir en la detección de las posibles nanopartículas liberadas.

- **El fraccionamiento en flujo mediante campos de flujo asimétrico acoplado a ICPMS** permite obtener tanto información cuantitativa como de tamaño (diámetro hidrodinámico)/peso molecular de nanopartículas y complejos macromoleculares de plata (I) (> 5kDa) en función del programa de flujo cruzado aplicado. Con un límite de detección en tamaño para nanopartículas del orden de 5 nm, esta técnica combinada permite complementar a SP-ICPMS, en lo que se refiere a detectar nanopartículas de tamaños por debajo de los límites de detección de ésta.

La incorporación de un detector de absorción UV-visible en línea permite diferenciar nanopartículas de plata de otras especies de plata (I) debido al espectro de absorción característico de las primeras (máximo en torno a 400 nm), siempre y cuando los niveles de concentración de las nanopartículas se encuentre en el rango de los 0,1 mg L⁻¹ o mayores.

La presencia de otras formas de plata particulada, en forma de AgCl o de plata asociada a micropartículas, como en los ensayos con arcillas modificadas con nanopartículas, puede dificultar la interpretación de los fractogramas. Además, la posible formación de nuevas especies por modificaciones en el entorno (fuerza iónica y pH) de las especies de plata en el interior del canal, puede también contribuir a una incorrecta interpretación de las señales obtenidas. El uso de otras técnicas como TEM aplicado a las fracciones eluidas está limitado por la propia dilución de las especies durante el proceso de separación en el canal.

La digestión de matrices biológicas mediante hidróxido de tetrametilamonio en condiciones adecuadas, permite mantener la integridad de las nanopartículas de plata presentes en las muestras, cultivos celulares en el caso estudiado, para su posterior detección y caracterización mediante AF4.

De los estudios y del desarrollo de metodología analítica basada en la detección de partículas individuales mediante ICPMS haciendo uso de instrumentación con velocidades ultrarrápidas de adquisición de datos se extraen las siguientes conclusiones:

- Las concentraciones óptimas de partículas para minimizar tanto los errores sistemáticos por solapamiento de partículas como los errores aleatorios por conteo de las mismas dependen de las condiciones de introducción de muestra y de los tiempos de lectura utilizados. En el caso de utilizar tiempos de lectura en el rango de los microsegundos es posible trabajar con mayores concentraciones, lo cual se traduce en mayores rangos lineales y mejores precisiones, incluso por debajo del 1 %, que utilizando tiempos de lectura en el rango de los milisegundos. Además, estas mejoras son independientes del tiempo de lectura seleccionado en el caso de utilizar tiempos en el rango de los microsegundos.
- Los efectos negativos derivados de la presencia de especies disueltas, así como la contribución de especies poliatómicas, se reducen significativamente al trabajar en el rango de los microsegundos, afectando en menor grado a los límites de detección en tamaño.
- El uso de tiempos de lectura en el rango de los microsegundos, junto con el uso de celdas de colisión/reacción permite trabajar en SP-ICPMS con nanopartículas de elementos como el selenio, cuyos isótopos están sometidos a serias interferencias espectrales, lo cual afecta negativamente a los límites de detección en tamaño que se pueden alcanzar. Así, el uso de tiempos de lectura de 100 μ s, en combinación con una celda de reacción purgada con H₂, han permitido utilizar el isótopo 80 del selenio, alcanzando límites de detección en tamaño de 18 nm para nanopartículas de selenio elemental.

- La metodología desarrollada para la detección de partículas de Se mediante SP-ICPMS ha permitido detectar de forma sencilla la presencia de nanopartículas biogénicas de selenio en levaduras enriquecidas con este elemento, poniendo de manifiesto la importancia de incluir esta especie en los esquemas de especiación de selenio.

La información complementaria proporcionada por la microscopía electrónica de transmisión y la espectrometría de dispersión de energía de rayos X ha permitido conocer la forma y composición de las partículas detectadas, pudiéndose obtener distribuciones en tamaño de las nanopartículas a partir de los datos obtenidos mediante SP-ICPMS.

CONCLUSIONS

The proposed platform of analytical methods based on the use of ICPMS has been applied to different analytical problems and different kind of samples containing silver nanoparticles and other species derived from them. The problems have included: release studies from surface nanocoatings, nanocomposites and clay microparticles in media of increasing complexity (ultrapure water, algae cultures from ecotoxicity tests, wines and *in vitro* digestion processes), as well as the analysis of human cells from nanotoxicity tests. Evaluation of results has allowed to draw the following conclusions:

- In the case of silver release studies from materials containing nanoparticles (surface nanocoatings, nanocomposites, clays) in simple media (ultrapure water), **ultrafiltration** with membranes of low nominal molecular-weight cut-off (3 kDa, equal to 1-3 nm) is a quantitative, fast and simple strategy for separating silver nanoparticles from the corresponding ionic forms (Ag^+) and other possible Ag (I) complexes with low molecular-weight ligands coming from nanoparticle oxidation, which are quantified by ICPMS in the ultrafiltered fraction.

This methodology turns out to be inappropriate if high molecular-weight ligands are present in the medium in which Ag (I) is released, as in the case of extracellular polymeric substances present in algae cultures for ecotoxicity tests or different types of macromolecules present in wine or in digestive processes.

- Analytical performances of **single particle detection by ICPMS** are compromised by the attainable size detection limits. These limits depend on the presence of dissolved species of the element measured and on the instrumentation used.

In the first part of this PhD Thesis a mass spectrometer able to work with dwell times in the millisecond range and with lower detection efficiency than those used in the second part has been employed; that is why size detection limits in the case of silver nanoparticles have been of 24 nm or larger. For this reason and due to the small size of the nanoparticles in all the studied cases, single particle detection by ICPMS has been restricted to be used as a screening

method to detect the presence of nanoparticles in some of the studied cases (release of nanoparticles from surface nanocoatings and nanocomposites).

On the other hand, the analysis of suspensions containing any form of silver associated with microparticles, as in the case of clays, implies the presence of microparticles of smaller size not removed in the previous separation treatments which can interfere in the detection of the possible nanoparticles released.

- **Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation** coupled to ICPMS allows to obtain both quantitative and size information (hydrodynamic diameter)/molecular-weight of nanoparticles and macromolecular silver (I) complexes (> 5 kDa) as a function of the crossflow program applied. With a size detection limit for nanoparticles of about 5 nm, this combined technique allows to complement SP-ICPMS, in what concerns the detection of nanoparticles of sizes below the detection limits of this one.

Coupling an UV-Visible absorption detector online allows to distinguish between silver nanoparticles and other silver (I) species due to the characteristic absorption spectrum of the first ones (maximum around 400 nm), as long as the nanoparticle concentration levels are in the range of 0.1 mg L⁻¹ or greater.

The presence of other forms of particulate silver, as AgCl or silver associated with microparticles, as in the case of clays modified with nanoparticles, can complicate the interpretation of the fractograms. Moreover, the possible formation of new species because of modification in the environment (ionic strength and pH) of the silver species inside the separation channel, can also contribute to an incorrect interpretation of the signals obtained. The use of other techniques such as TEM applied to eluted fractions is limited by the dilution of the species during the separation process inside the channel.

The digestion of biological matrices with tetramethylammonium hydroxide under suitable conditions allows to keep the integrity of the silver nanoparticles present in samples, cell cultures in the studied case, for their subsequent detection and characterization by AF4.

The following conclusions are drawn from the studies and the development of an analytical methodology based of single particle detection by ICPMS, when fast-scanning quadrupole instruments are used:

- Optimal particle number concentration to minimize both systematic and random errors associated to the counting of nanoparticle events depend on the sample introduction conditions and on the dwell time used. In the case of using dwell times in the range of microseconds, it is possible to work with higher concentrations, which means longer linear ranges and better precision, down to 1 % or even better, with respect to the use of millisecond dwell times. Moreover, these improvements are independent of the dwell time selected when working in the microseconds range.
- The negative effects derived from dissolved species, as well as the occurrence of high plasma background levels, are significantly reduced by using dwell times in the microsecond range, dealing to a less affected size detection limit.
- The use of dwell times in the range of microseconds together with the use of collision/reaction cells allows to work in SP-ICPMS with nanoparticles of elements such as selenium, whose isotopes suffer for serious spectral interferences that affect negatively to the attainable size detection limits. Thus, the use of dwell times of 100 μ s, in combination with an H₂ reaction cell, has allowed to use the 80 selenium isotope, reaching size detection limits of 18 nm for elemental selenium nanoparticles.
- The developed methodology for selenium particle detection by SP-ICPMS has made it possible to easily detect the presence of biogenic selenium nanoparticles in selenium-rich yeasts, highlighting the importance of including this species in the speciation schemes of selenium.

The complementary information given by transmission electron microscopy and energy dispersive X-ray spectroscopy has made it possible to know the shape and composition of the detected particles, being able to obtain size nanoparticle distributions from the data obtained by SP-ICPMS.

V. ANEXOS

ANEXO 1. ESTUDIO DE LIBERACIÓN DE PLATA DESDE RECUBRIMIENTOS BACTERICIDAS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO

A1.1. Determinación de la cantidad total de plata y de plata disuelta

La determinación de la plata total y de plata disuelta liberada tras 2 horas, 24 horas y una semana se determinó mediante ICPMS, por análisis directo de la disolución procedente del ensayo o después de someterla a ultrafiltración.

En la Tabla A1.1. se muestran los resultados obtenidos en la cuantificación de las muestras mediante ICPMS en función del tiempo.

Tabla A1.1. Cantidad de plata total y ultrafiltrada liberada a partir de las láminas analizadas. Media \pm desviación estándar ($n = 3$).

Muestra	Fracción	Cantidad de plata liberada		
		μg		
		2 horas	24 horas	1 semana
3-AgAuNP	Total	0,168 \pm 0,013	0,347 \pm 0,016	0,419 \pm 0,011
	UF	0,0467 \pm 0,002	0,0980 \pm 0,003	0,177 \pm 0,007
	% UF. vs. total	27,8 \pm 2,4	28,2 \pm 1,6	42,3 \pm 2,1
4- AgAuNP	Total	0,334 \pm 0,021	0,507 \pm 0,037	0,742 \pm 0,001
	UF	0,0489 \pm 0,004	0,158 \pm 0,002	0,327 \pm 0,001
	% UF. vs. total	14,6 \pm 1,6	31,1 \pm 2,5	44,0 \pm 0,1
5-AgNP-R	Total	1,86 \pm 0,02	4,01 \pm 0,07	5,50 \pm 0,16
	UF	0,513 \pm 0,007	1,96 \pm 0,06	2,99 \pm 0,07
	% UF. vs. total	27,6 \pm 0,5	49,0 \pm 1,7	54,5 \pm 2,0
6-AgNP-R	Total	0,887 \pm 0,018	2,07 \pm 0,02	3,52 \pm 0,06
	UF	0,411 \pm 0,012	1,02 \pm 0,02	1,48 \pm 0,09
	% UF. vs. total	46,3 \pm 1,7	49,3 \pm 1,3	42,1 \pm 2,8
7-AgNP+DLC-R	Total	5,15 \pm 0,05	19,0 \pm 0,7	24,5 \pm 0,4

	UF	3,97 ± 0,07	13,9 ± 0,1	20,4 ± 0,5
	% UF. vs. total	77,0 ± 1,6	72,8 ± 2,6	83,4 ± 2,6
8-AgNP+DLC-R	Total	4,70 ± 0,17	16,2 ± 0,4	21,6 ± 0,5
	UF	3,73 ± 0,05	11,4 ± 0,2	18,3 ± 0,4
	% UF. vs. total	79,4 ± 3,1	70,4 ± 2,0	85,1 ± 2,5
	Total	36,2 ± 0,6	30,2 ± 0,8	247 ± 4
9-AgNP+DLC-MS	UF	8,62 ± 0,23	9,18 ± 0,41	13,7 ± 0,2
	% UF. vs. total	23,8 ± 0,8	37,0 ± 16,7	5,53 ± 0,12
	Total	32,0 ± 0,7	19,8 ± 2,6	74,8 ± 2,2
	UF	6,42 ± 0,10	5,69 ± 0,14	3,96 ± 0,10
10-AgNP+DLC-MS	% UF. vs. total	20,0 ± 0,5	28,8 ± 3,9	5,29 ± 0,20
	Total	1,21 ± 0,02	1,05 ± 0,05	1,10 ± 0,06
	UF	0,746 ± 0,014	0,613 ± 0,013	0,682 ± 0,018
	% UF. vs. total	61,9 ± 1,6	58,4 ± 3,0	62,2 ± 3,8
11-AgAuNP+DLC	Total	0,490 ± 0,010	0,587 ± 0,026	0,893 ± 0,027
	UF	0,274 ± 0,010	0,351 ± 0,008	0,513 ± 0,008
	% UF. vs. total	55,8 ± 2,4	59,9 ± 3,0	57,4 ± 1,9
	Total			
12-AgAuNP+DLC	UF			
	% UF. vs. total			
	Total			
	UF			

A1.2. Detección de nanopartículas de plata mediante SP-ICPMS

Para detectar la presencia de nanopartículas mediante SP-ICPMS, se introdujeron las disoluciones liberadas en el sistema ICPMS, previa dilución con agua ultrapura antes del análisis.

Las disoluciones estudiadas se correspondieron con: 5-AgNP-R diluida 1:1000 y 11-AgAuNP+DLC diluida 1:100. Estos ensayos en SP-ICPMS se hicieron en las muestras que habían estado en agitación durante 24 horas.

En la Figura A1.1. se muestran los barridos de tiempo, así como los histogramas de intensidad correspondientes para estos casos. En los histogramas

de intensidad se muestra una ampliación de la zona baja del mismo para poder distinguir los eventos de nanopartículas de la distribución debida a la señal de plata (I).

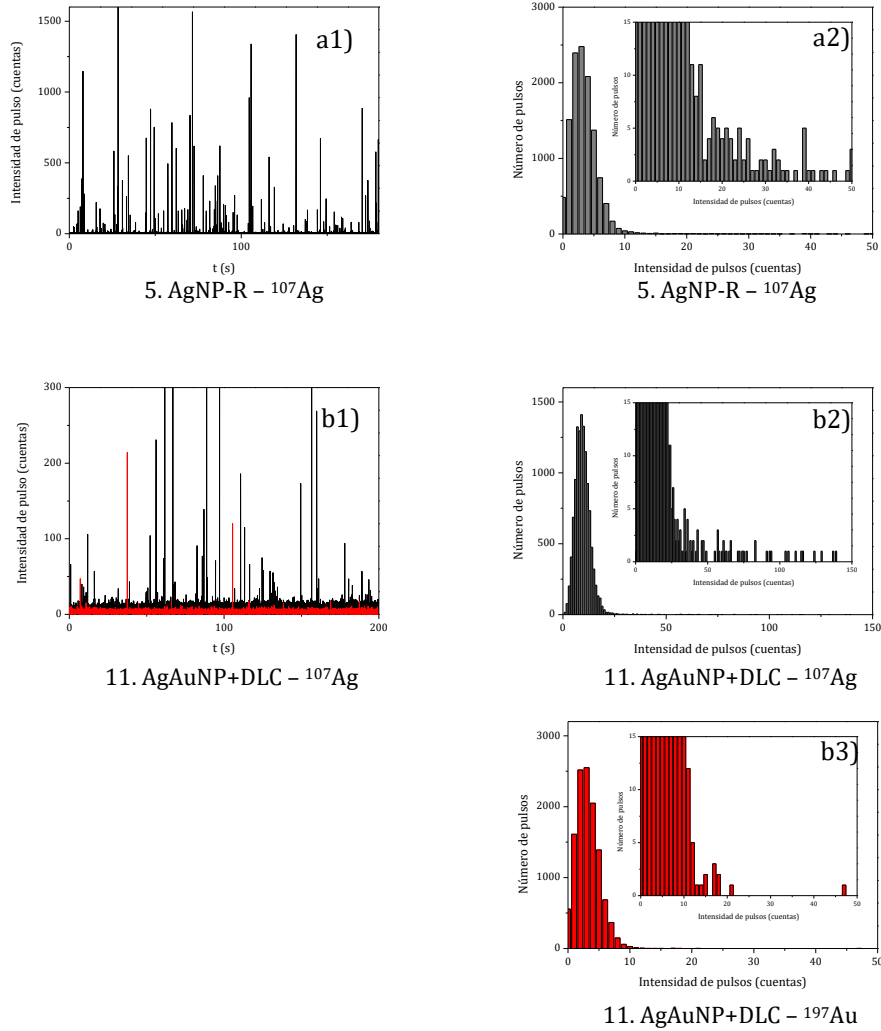


Figura A1.1. Barridos de tiempo (a1, b1) e histogramas de intensidad (a2, b2, b3) correspondientes para las disoluciones a) AgNP-R; b) AgAuNP+DLC liberadas tras 24 horas. Monitorización en todos los casos del isótopo ^{107}Ag (negro) y también del isótopo ^{197}Au (rojo) para las muestras que contienen oro (b).

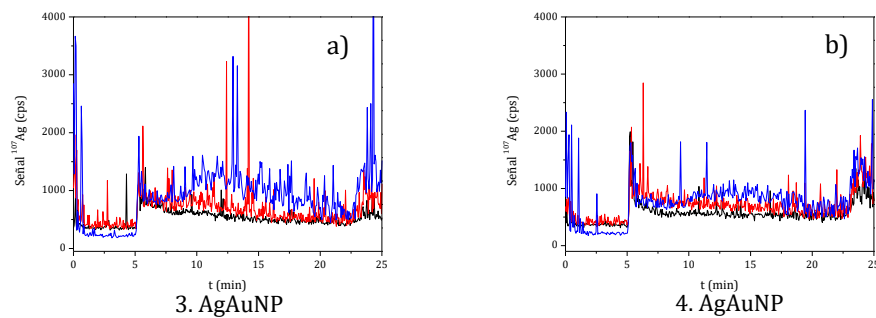
En la Figura A1.1. se observa que las disoluciones liberadas contienen tanto plata (I) como nanopartículas de distintos tamaños. Aunque el número total de eventos encontrados permitió confirmar la presencia de nanopartículas, la distribución de nanopartículas no está bien resuelta de la distribución correspondiente a la plata (I), lo que significa que puede haber nanopartículas por debajo del límite de detección.

Para la muestra AgAuNP+DLC no sólo se monitorizó la plata sino también el oro. En este caso se muestran señales distintas para estos dos elementos. La señal de oro podría estar relacionada con la presencia de nanopartículas extremadamente pequeñas.

A1.3. Detección y caracterización de nanopartículas de plata liberadas en la disolución mediante AF4-ICPMS

Las muestras fueron inyectadas directamente en el sistema AF4-ICPMS para la detección y caracterización de las posibles nanopartículas de plata liberadas. El programa de separación aplicado se corresponde con el recogido en la Tabla 1.1.1.

En las Figuras A1.2. – A1.6. se muestran los fractogramas correspondientes a las disoluciones liberadas por estas muestras con el tiempo. En las muestras correspondientes a AgAuNP (3, 4) (1 semana) y AgAuNP+DLC (11, 12) (2 horas, 24 horas y una semana) se monitorizó no sólo la señal ICPMS de plata sino también la de oro.



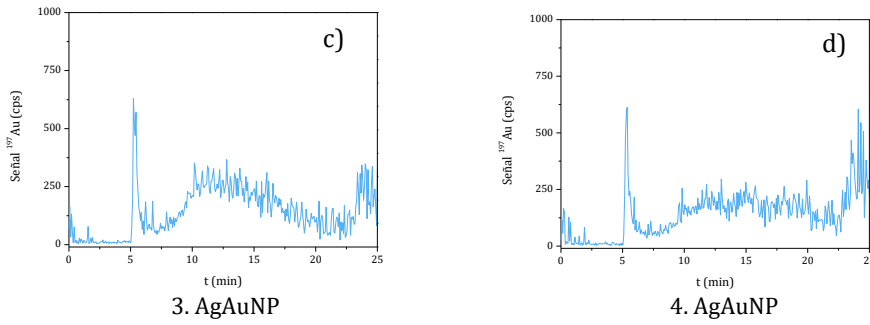


Figura A1.2. Fractograma de las disoluciones liberadas por las muestras AgAuNP (3 y 4). (a) y (b) Señal ¹⁰⁷Ag: negro para 2 horas, rojo para 24 horas y azul para una semana. (c) y (d) Señal ¹⁹⁷Au: azul claro para una semana.

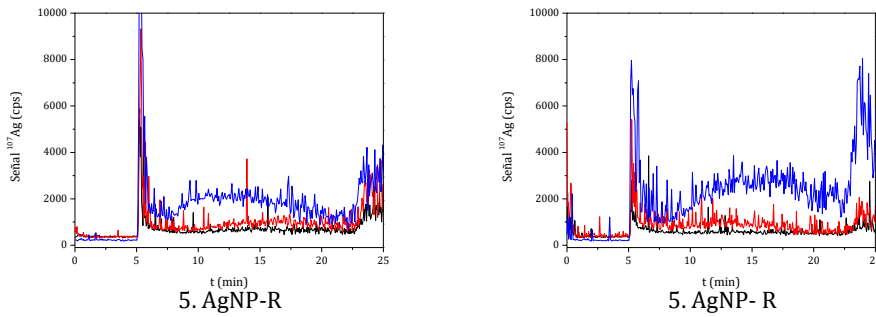


Figura A1.3. Fractograma de las disoluciones liberadas por las muestras AgNP-R (5 y 6). Señal ¹⁰⁷Ag: negro para 2 horas, rojo para 24 horas y azul para una semana.

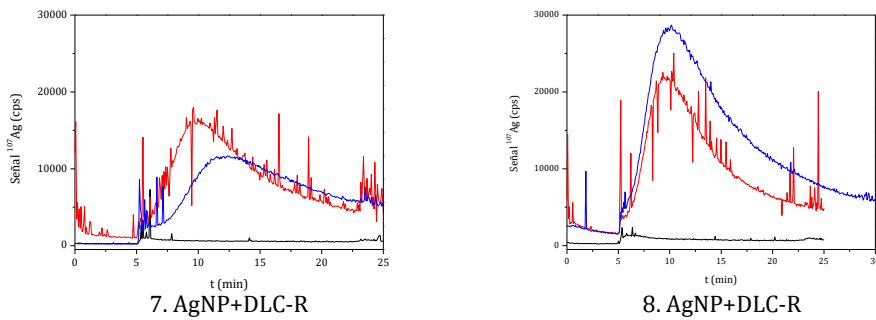


Figura A1.4. Fractograma de las disoluciones liberadas por las muestras AgNP+DLC-R (7 y 8). Señal ¹⁰⁷Ag: negro para 2 horas, rojo para 24 horas y azul para una semana.

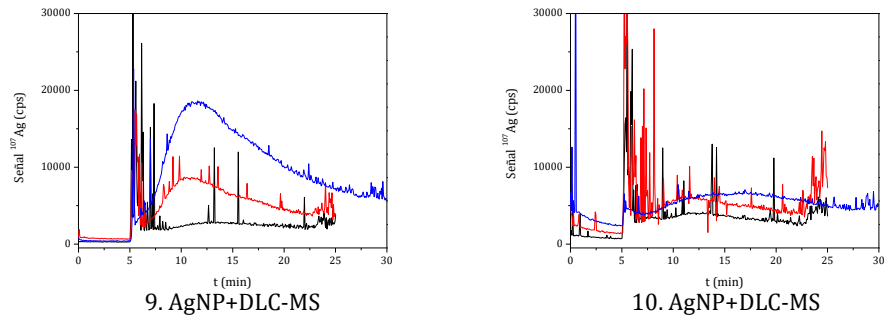


Figura A1.5. Fractograma de las disoluciones liberadas por las muestras AgNP+DLC-MS (9 y 10). Señal ^{107}Ag : negro para 2 horas, rojo para 24 horas y azul para una semana.

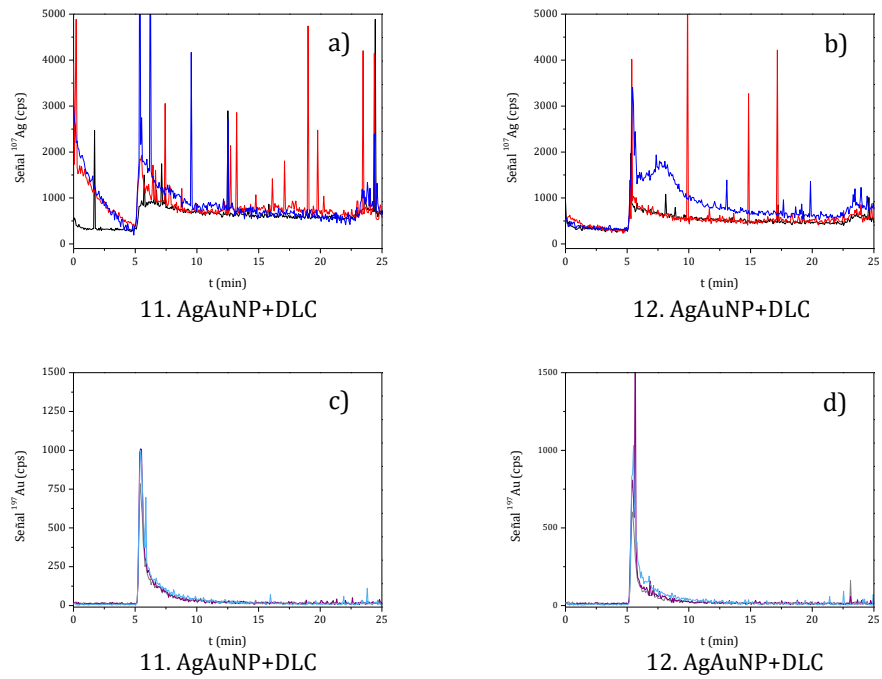


Figura A1.6. Fractograma de las disoluciones liberadas por las muestras AgAuNP+DLC (11 y 12). (a) y (b) Señal ^{107}Ag : negro para 2 horas, rojo para 24 horas y azul para una semana. (c) y (d) Señal ^{197}Au : gris para 2 horas, morado para 24 horas y azul claro para una semana.

En la Tabla A1.2. se muestra la distribución de tamaños encontrados en las muestras. Algunas de las inyecciones no permitieron realizar una estimación de distribución en tamaño.

Tabla A1.2. *Distribución de tamaños estimados mediante AF4-ICPMS, en nm.*

	2 horas	24 horas	1 semana
AgAuNP (3, 4)	-	-	40
AgNP- R (5, 6)	-	-	40-90
AgNP+DLC-R (7, 8)	-	20	20-30
AgNP+DLC-MS (9, 10)	-	25	25
AgAuNP+DLC (11, 12)	-	-	10

Las nanopartículas medidas mostraron una distribución de tamaños diferentes de una muestra a otra: AgNP-R (5, 6) \geq AgAuNP (3, 4) > AgNP+DLC-R (7, 8) = AgNP+DLC-MS (9, 10) > AgAuNP+DLC (11, 12).

En el fractograma de la disolución liberada por la muestra AgAuNP (3, 4) (Figura A1.2.) al cabo de una semana, se observa una señal de oro que eluye a los mismos tiempos de retención que las nanopartículas de plata. Estos resultados concuerdan con los obtenidos anteriormente mediante SP-ICPMS, donde los barridos de tiempo y los histogramas de intensidad (Figura 1.1.3.) eran muy similares para ambos elementos.

Las muestras AgAuNP+DLC (11, 12) muestran en todos los casos (2 horas, 24 horas y una semana) una señal de oro al principio de los fractogramas que se eluye con el volumen muerto. Esta señal podría estar relacionada con una liberación del recubrimiento (especies menores de 5 kDa) o a nanopartículas extremadamente pequeñas (~ 2 nm) que se situarían por debajo de los límites de detección de la técnica. Estos resultados estarían de acuerdo con los obtenidos anteriormente a través de SP-ICPMS.

La concentración de plata separada a través de AF4, relacionada con nanopartículas de plata se cuantificó de manera online a través del ICPMS tal y como queda recogido en el Apartado 1.1.2. En la Tabla A1.3. se muestran las cuantificaciones obtenidas.

Tabla A1.3. Cantidad total de plata cuantificada mediante AF4-ICPMS, en μg .

	2 horas	24 horas	1 semana
3-AgAuNP	0,187	0,269	0,332
4-AgAuNP	0,205	0,298	0,277
5-AgNP-R	0,338	0,543	0,760
6- AgNP-R	0,245	0,469	1,30
7-AgNP+DLC-R	0,395	6,95	3,68
8-AgNP+DLC-R	0,567	8,06	7,74
9-AgNP+DLC-MS	2,70	4,42	5,71
10- AgNP+DLC-MS	3,23	4,11	1,69
11-AgAuNP+DLC	0,313	0,344	0,283
12-AgAuNP+DLC	0,208	0,235	0,245

En la Tabla A1.4. se resumen todas las cuantificaciones llevadas a cabo: las de AF4 (correspondientes a nanopartículas) junto con las de los ultrafiltrados (correspondientes a plata (I)) y la cantidad de plata total liberada. Asimismo, se muestra el porcentaje de plata justificado al sumar las cuantificaciones de AF4 y ultrafiltrados respecto a la cantidad total de plata. Valores cercanos al 100 % son aconsejables.

Tabla A1.4. Cantidad de plata cuantificada, en μg , y porcentaje de plata justificado.

		2 horas	24 horas	1 semana
AgAuNP (3, 4)	AF4	0,196 \pm 0,013	0,284 \pm 0,021	0,305 \pm 0,039
	UF	0,048 \pm 0,002	0,128 \pm 0,042	0,252 \pm 0,106
	Suma	0,244 \pm 0,014	0,412 \pm 0,063	0,557 \pm 0,067
	Total	0,251 \pm 0,117	0,427 \pm 0,113	0,581 \pm 0,228
	Justif. (%)	107 \pm 45	97,9 \pm 11,2	101 \pm 28,3
AgNP-R (5, 6)	AF4	0,292 \pm 0,066	0,506 \pm 0,052	1,03 \pm 0,38
	UF	0,462 \pm 0,072	1,49 \pm 0,665	2,23 \pm 1,07
	Suma	0,754 \pm 0,138	2,00 \pm 0,717	3,27 \pm 0,69
	Total	1,37 \pm 0,69	3,04 \pm 1,37	4,51 \pm 1,40
	Justif. (%)	59,9 \pm 19,9	67,2 \pm 6,7	73,6 \pm 7,6
AgNP+DLC-R	AF4	0,481 \pm 0,122	7,51 \pm 0,79	5,71 \pm 2,88

Anexo 1. Estudio de liberación de plata desde recubrimientos bactericidas en función del tiempo

(7, 8)	UF	3,85 ± 0,17	12,7 ± 1,77	19,3 ± 1,49
	Suma	4,33 ± 0,05	20,2 ± 1,0	25,1 ± 1,4
	Total	4,94 ± 0,32	17,6 ± 2,0	23,1 ± 2,1
	Justif. (%)	88,1 ± 4,7	115 ± 7	109 ± 16
AgNP+DLC-MS (10)*	AF4	2,97 ± 0,38	4,27 ± 0,22	1,69
	UF	7,52 ± 1,56	7,43 ± 2,47	3,96 ± 0,10
	Suma	10,5 ± 1,2	11,7 ± 2,7	5,65
	Total	34,1 ± 3,0	25,0 ± 7,4	74,8 ± 2,2
	Justif. (%)	30,7 ± 0,8	47,3 ± 3,2	7,55
AgAuNP+DLC (11, 12)	AF4	0,261 ± 0,074	0,290 ± 0,077	0,264 ± 0,027
	UF	0,510 ± 0,334	0,482 ± 0,185	0,598 ± 0,120
	Suma	0,771 ± 0,408	0,772 ± 0,262	0,862 ± 0,146
	Total	0,850 ± 0,509	0,819 ± 0,327	0,997 ± 0,146
	Justif. (%)	92,9 ± 7,7	95,5 ± 6,1	86,3 ± 2,0

- No se usan los valores correspondientes a la muestra Ag DLC MS (9).

ANEXO 2. LIBERACIÓN DE PLATA A PARTIR DE ARCILLAS RECUBIERTAS CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA UTILIZADAS COMO ADITIVOS EN ALIMENTACIÓN ANIMAL

A2.1. Determinación de plata total en tejidos de músculo e hígado de cerdos tratados con caolín-Ag y sepiolita-Ag

Los resultados individuales procedentes de los análisis de las distintas muestras mediante ICPMS quedan recogidos en la Tabla A2.1.

Tabla A2.1. *Contenidos de Ag total en músculo e hígado de cerdos, $\mu\text{g g}^{-1}$.*

SACRIFICIO 1					
		MÚSCULO		HÍGADO	
		$\bar{x} \pm s$	% RSD	$\bar{x} \pm s$	% RSD
SEPIOLITA-Ag	CUADRA 1	0,038 ± 0,001	2,63	5,146 ± 0,119	2,31
	CUADRA 2	0,027 ± 0,002	9,00	2,310 ± 0,028	1,20
	CUADRA 3	0,174 ± 0,002	1,40	2,166 ± 0,026	1,20
	CUADRA 4	0,021 ± 0,001	4,50	3,810 ± 0,065	1,70
	CUADRA 5	0,012 ± 0,002	13,40	2,021 ± 0,018	0,90
	CUADRA 6	0,007 ± 0,001	9,60	5,707 ± 0,025	0,40
CAOLÍN-Ag	CUADRA 7	0,052 ± 0,001	1,30	5,137 ± 0,032	0,63
	CUADRA 8	0,054 ± 0,002	2,80	5,082 ± 0,070	1,40
	CUADRA 9	0,345 ± 0,010	3,00	2,929 ± 0,050	1,70
	CUADRA 10	0,006 ± 0,001	10,50	5,033 ± 0,041	0,80
	CUADRA 11	< 0,009		6,987 ± 0,090	1,30
	CUADRA 12	0,011 ± 0,001	7,40	3,509 ± 0,022	0,60
CONTROL	CUADRA 13	0,060 ± 0,001	1,80	0,041 ± 0,002	4,88
	CUADRA 14	0,022 ± 0,002	8,00	<0,009	
	CUADRA 15	0,025 ± 0,001	3,70	<0,009	
	CUADRA 16	0,014 ± 0,001	7,30	<0,009	
	CUADRA 17	<0,009		<0,009	
	CUADRA 18	0,026 ± 0,001	3,80	<0,009	

SACRIFICIO 2					
		MÚSCULO		HÍGADO	
		$\bar{x} \pm s$	% RSD	$\bar{x} \pm s$	% RSD
SEPIOLITA-Ag	CUADRA 1	<0,009		2,345 ± 0,104	4,43
	CUADRA 2	<0,009		1,901 ± 0,080	4,20
	CUADRA 3	<0,009		2,536 ± 0,074	2,90
	CUADRA 4	<0,009		5,137 ± 0,210	4,090
	CUADRA 5	<0,009		2,793 ± 0,032	1,10
	CUADRA 6	<0,009		1,369 ± 0,016	1,10
CAOLÍN-Ag	CUADRA 7	0,010 ± 0,002	23,10	8,269 ± 0,155	1,87
	CUADRA 8	<0,009		3,978 ± 0,100	2,50
	CUADRA 9	<0,009		3,472 ± 0,062	1,80
	CUADRA 10	<0,009		3,610 ± 0,233	6,40
	CUADRA 11	<0,009		1,538 ± 0,073	4,80
	CUADRA 12	<0,009		1,390 ± 0,044	3,20
CONTROL	CUADRA 13	<0,009		<0,009	
	CUADRA 14	<0,009		<0,009	
	CUADRA 15	0,202 ± 0,014	6,90	<0,009	
	CUADRA 16	<0,009		<0,009	
	CUADRA 17	<0,009		<0,009	
	CUADRA 18	0,011 ± 0,002	15,40	<0,009	

ANEXO 3. DETECCIÓN DE PARTÍCULAS INDIVIDUALES MEDIANTE ICPMS: TIEMPOS DE LECTURA DE MICROSEGUNDOS VS. MILISEGUNDOS

A3.1. Hoja de cálculo

A continuación se muestran las hojas de cálculos desarrolladas para el cálculo del rendimiento de nebulización, así como de la concentración óptima en número. Estas hojas se encuentran disponibles de manera online.

Figura A3.1. Hojas de cálculo

SINGLE PARTICLE ICP-MS						
Calculation of the nebulization efficiency						
Particle frequency method						
<i>Pace et al. Anal. Chem. 83, 9361-9 (2011). doi:10.1021/ac201952t</i>						
		units	replicate 1	replicate 2	replicate 3	
particle diameter	d_p	nm	56	56	56	✓ (1)
particle density	ρ	g mL ⁻¹	19,3	19,3	19,3	✓ (2)
mass concentration	C_{mass}	ng L ⁻¹	440	440	440	✓ (3)
particle number concentration	C_p	L ⁻¹	2,48E+08	2,48E+08	2,48E+08	
sample flow rate	Q_{sam}	mL min ⁻¹	0,95	0,95	0,95	✓ (4)
total acquisition time	t_i	s	60	60	60	✓ (5)
number of pulses			6012	6180	6103	✓ (6)
pulses per minute		min ⁻¹	6012	6180	6103	
	η_{neb}		0,0255	0,0262	0,0259	
			mean	s	rsd	
nebulization efficiency	η_{neb}		0,0259	0,0004	1,38%	

1. Input particle diameter (e.g. 60 nm)
2. Input particle density (Au: 19.3 g mL⁻¹; Ag: 10.49 g mL⁻¹)
3. Input element mass concentration
4. Input sample flow rate (e.g. 1.00 mL min⁻¹)
5. Input total acquisition time
6. Input total number of pulses recorded during the acquisition time

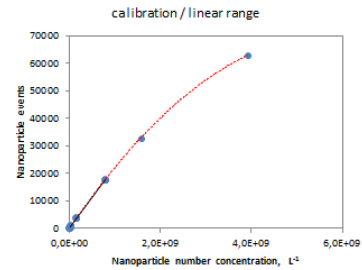
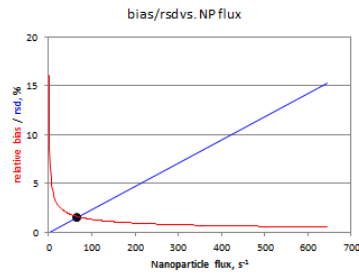
SINGLE PARTICLE ICP-MS
Calculation of the optimal number concentration

sample flow rate	Q_{sam}	mL min ⁻¹	0,95	(1)
nebulization efficiency	η_{neb}		0,026	(2)
dwelt time or peak width	t_{dwell} or t_{peak}	s	0,00050	(3)
total acquisition time	t_i	s	60	(4)
particle flux reaching plasm	q_p	s ⁻¹	64,37	
events per minute		min ⁻¹	3862	
optimal number concentrat	C_p	L ⁻¹	1,56E+08	
expected events per minute		min ⁻¹	3862	
total expected events			3862	
rsd		%	1,61	
bias (22NP events)		%	1,58	

nanoparticle			Au	
particle diameter	d_p	nm	60	(5)
particle density	ρ	g mL ⁻¹	19,3	(6)
mass fraction	X_{Au}		1	(7)

optimal mass concentrat: C_{mass} ng L⁻¹ 341

1. Input sample flow rate (e.g. 1.00 mL min⁻¹)
2. Input nebulization efficiency (e.g. 0.05)
3. Input dwell time when working at milliseconds (e.g. 0.005 s)
 Input peak width when working at microseconds (e.g. 0.0005 s)
4. Input total acquisition time
5. Input particle diameter (e.g. 60 nm)
6. Input particle density (Au: 19.3 g mL⁻¹; Ag: 10.49 g mL⁻¹;
 Cu: 8.96 g mL⁻¹; CeO₂: 7.215 g mL⁻¹; CuO: 6.315 g mL⁻¹; SiO₂: 2.195 g mL⁻¹)
7. Input mass fraction (metallic NPs: 1; CeO₂: 0.8141; CuO: 0.7989; SiO₂: 0.4674)



ANEXO 4. PUBLICACIONES

El trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

- E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, F. Laborda, I. Abad-Álvarez, C. Bladé, L. Arola, J.R. Castillo, Detection and characterization of silver nanoparticles and dissolved species of silver in culture medium and cells by AsFIFFF-UV-Vis-ICPMS: application to nanotoxicity tests, *Analyst*. 139 (2014) 914–22.
- I. Abad-Álvarez, E. Peña-Vázquez, E. Bolea, P. Bermejo-Barrera, J.R. Castillo, F. Laborda, Evaluation of number concentration quantification by single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry: microsecond vs. millisecond dwell times, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 5089–5097.
- I. Abad-Álvarez, E.P. Vázquez, E. Bolea, P. Bermejo-Barrera, F. Laborda, A Comparison of Microsecond vs . Millisecond Dwell Times on Particle Number Concentration Measurements by Single Particle ICP-MS, *Tech. Note Perkin.* (2016) 1–5.
- I. Abad-Álvarez, E. Bolea, F. Laborda, J.R. Castillo, An ICP-MS-based platform for release studies on silver-based nanomaterials, *J. Anal. At. Spectrom.* (2017).

Cite this: *Analyst*, 2014, 139, 914

Detection and characterization of silver nanoparticles and dissolved species of silver in culture medium and cells by AsFIFFF-UV-Vis-ICPMS: application to nanotoxicity tests†

E. Bolea,^{*a} J. Jiménez-Lamana,^a F. Laborda,^a I. Abad-Álvarez,^a C. Bladé,^b L. Arola^b and J. R. Castillo^a

A methodology based on Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation (AsFIFFF) coupled with UV-Vis absorption spectrometry and ICP mass spectrometry (ICPMS) has been developed and applied to the study of silver nanoparticles (AgNPs) and dissolved species of silver in culture media and cells used in cytotoxicity tests. The effect of a nano-silver based product (protein stabilized silver nanoparticles ca. 15 nm average diameter) on human hepatoma (HepG2) cell viability has been studied. UV-Vis absorption spectrometry provided information about the nature (organic vs. nanoparticle) of the eluted species, whereas the silver was monitored by ICPMS. A shift towards larger hydrodynamic diameters was observed in the AgNPs after a 24 hour incubation period in the culture medium, which suggests a "protein corona" effect. Silver(I) associated with proteins present in the culture medium has also been detected, as a consequence of the oxidation process experimented by the AgNPs. However, the Ag(I) released into the culture medium did not justify the toxicity levels observed. AgNPs associated with the cultured HepG2 cells were also identified by AsFIFFF, after applying a solubilisation process based on the use of tetramethylammonium hydroxide (TMAH) and Triton X-100. These results have been confirmed by transmission electronic microscopy (TEM) analysis of the fractions collected from the AsFIFFF. The effect of AgNPs on HepG2 cells has been compared to that caused by silver(I) as AgNO₃ under the same conditions. The determination of the total content of silver in the cells confirms that a much larger mass of silver as AgNPs with respect to AgNO₃ (16 to 1) is needed to observe a similar toxicity.

Received 29th July 2013
Accepted 4th October 2013

DOI: 10.1039/c3an01443f

www.rsc.org/analyst

Introduction

Nanotechnology has undergone a rapid growth in the last decades. As new nanomaterials are developed and commercialized, concerns about their safe use have been raised by regulators, workers and consumers. To address these concerns nanotoxicology deals with the study of the toxicity of these engineered nanomaterials (ENMs).

The study of the hazards of engineered nanomaterials is mainly done by applying standard toxicity tests used for bulk forms of the same materials. However, ENMs may possess new properties, mainly linked to their size, but also to other physical and chemical parameters of the nanomaterials. Furthermore,

these properties can be altered by the medium used to carry on the toxicity tests.

Whereas it is recognized that standard toxicity tests may be applicable to nanomaterials, special attention must be given to the characterization of the nanomaterials in order to facilitate a correct interpretation of the toxicological results, as well as enabling researchers to reproduce data or explain discordant results.¹ The recommended minimum physical and chemical parameters for characterizing nanomaterials in nanotoxicological studies should include:² particle size/size distribution, agglomeration/aggregation state, shape, overall composition, surface composition, purity, surface area, surface chemistry and surface charge. In addition, some overarching considerations should be taken into account such as the stability, including the material release through dissolution.³

These considerations are especially important for *in vitro* systems because nanoparticles can exhibit strong interactions with culture media. In the case of metallic nanoparticles, their modification in *in vitro* assays depends on the pH, the ionic strength, the thermodynamic feasibility, the

^aGroup of Analytical Spectroscopy and Sensors (GEAS), Institute of Environmental Sciences (IUCA), University of Zaragoza, Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza, Spain. E-mail: edbolea@unizar.es; Fax: +34 976761292; Tel: +34 876553504

^bGroup of Nutrigenomics, Department of Biochemistry and Biotechnology, Universitat Rovira I Virgili, Marcel·lí Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c3an01443f

concentration of the species and also the redox conditions of the biological media.⁴

Although a large number of analytical techniques have been used to characterize and determine the ENMs themselves, only a few are applicable to the analysis of more complex samples.⁵ A wide discussion on the advantages or the drawbacks of each technique can be found in the bibliography.^{6,7}

The *in vitro* cytotoxicity of silver nanoparticles (AgNPs) has been studied on different cell lines.^{8–12} Most of these studies include a nanoparticle size characterization once they have been dispersed in a buffer solution^{9,11} or in the culture medium^{10,12} used. Dynamic light scattering (DLS) and scanning (SEM) or transmission electron microscopy (TEM) are commonly used for this purpose. The formation of agglomerates can be followed by DLS measurement of the hydrodynamic sizes of the particles in these complex media. The limitations of this technique have been reviewed in the literature,^{6,13} and are related to the interpretation, especially for polydisperse systems, given the strong particle size dependence of the scattering intensity. On the other hand, SEM and TEM analyses allow the study of shape changes in the nanoparticles together with the size distribution, although an accurate quantitative measurement requires counting and measuring a high number of particles,⁶ which can be time consuming.

The cellular uptake of nanoparticles has also been examined in a number of studies.^{9,11,12,14} Two different microscopy techniques, confocal laser scanning microscopy^{9,14} and TEM,^{11,12} have been used for such purposes. The first technique measures the reflectance signal from silver nanoparticles or the fluorescence signal from labeled nanoparticles¹⁴ using a laser as an excitation source.⁹ Obtaining TEM images of cells requires a careful sample preparation that includes the dehydration of the cells, embedding in a resin and cutting into ultra-thin sections (in the range of 80 nm).¹² However, the study of other forms produced by the metal released from metallic nanoparticles remains an unsolved problem by using these imaging techniques.

AsFIFFF is a chromatography-like size separation technique that separates species according to their diffusion coefficient in a thin open channel.¹⁵ The separation principle relies on a combination of a crossflow perpendicular to the length of the separation channel and the longitudinal carrier flow. Although this technique has been applied to a wide range of ENMs, such as SiO₂, TiO₂, Au, Ag or carbon nanotubes,^{16,17} its use for the characterization or detection of ENPs in the complex matrix is scarce. Römer *et al.*¹⁸ could not characterize AgNPs in exposure media for aquatic toxicity tests by FFF due to aggregation and polydispersity of the sample. Separation of gold NPs in livers was also attempted by Schmidt *et al.*,¹⁹ but separation by AsFIFFF was not possible due to the association of NPs with undissolved remains of alkali-treated liver tissues.

The aim of the present work was to develop an analytical methodology for the characterization and identification of silver nanoparticles and silver dissolved species in the culture medium used in cytotoxicity tests, based on the use of AsFIFFF coupled to UV-Vis and ICPMS detectors. Additionally, the identification of silver nanoparticles associated with cells has been carried out by AsFIFFF after solubilization of the cells with tetramethylammonium hydroxide.

Experimental section

Chemicals

Different carriers were used for AsFIFFF separations. Those containing sodium dodecyl sulfate (SDS) and NH₄NO₃ were prepared by dissolving the corresponding mass of SDS (Merck, Darmstadt, Germany) or ammonium nitrate (Merck) in ultrapure water obtained from a Milli-Q Advantage system (Millipore, Bedford, MA, USA). Diluted solutions of potassium hydroxide (reagent grade, Scharlab, Barcelona, Spain) and nitric acid (65%, Merck) were used to adjust the mobile phase pH. Nylon 0.2 µm filters (Millipore, USA) were used for mobile phase filtration. A 25% v/v aqueous solution of electronic grade tetramethylammonium hydroxide (TMAH) was obtained from Alfa Aesar GmbH & Co KG (Karlsruhe, Germany). A series of suspensions of AgNPs of different diameters [10 nm (PlasmaChem, Berlin, Germany) 20 ± 5, 40 ± 5, 60 ± 5, and 80 ± 7 nm (BBInternational, Cardiff, UK)] were used for AsFIFFF size calibration. A series of proteins of known molecular weight (MW) (Myoglobin from horse heart, 90% (Sigma, Buch, Switzerland)), superoxide dismutase from bovine erythrocytes (Sigma) and albumin from bovine serum 98% (Sigma) were also used for molecular mass calibration of the channel. Diluted suspensions of AgNPs (10 mg L⁻¹) and proteins (500 mg L⁻¹) were prepared by further dilution of the commercial standards with the corresponding mobile phase.

Cell culture

HepG2 cells, a human hepatocarcinoma cell line (ATCC, LGC Promochen, HB8065, Salisbury, UK), were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Lonza, Barcelona, Spain) supplemented with (in parenthesis final concentration): nonessential amino acids (NEAA) (Sigma) (0.1 mM), penicillin (100 U mL⁻¹) and streptomycin (Lonza) (100 µg mL⁻¹), glutamine (Lonza) (2 mM), fetal bovine serum (FBS) (Lonza) (10%) and 4-(2)-hydroxyethylpiperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) (Sigma) (25 mM) in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37 °C.

Silver nanoparticles

Collargol (CAS registry number 9007-35-6) is described in pharmacopeias as a strong antiseptic. It was provided by the manufacturer (Laboratorios Argenol S.L., Spain) as a granulated powder and it consists of silver nanoparticles in a protein (casein) matrix (silver content of the batch used: 68 ± 1%; average diameter *ca.* 15 nm). In most of the applications described, it is used in solution. Fifty milligrams of this product was suspended in 50 mL of ultrapure water. Diluted suspensions were prepared by further dilution with the corresponding medium. This product has been characterized by our group in a previous publication.²⁰ A summary of the most important parameters can be found in the ESI.†

Asymmetrical flow field-flow fractionation

The AsFIFFF system used was an AF2000 (Postnova Analytics, Landsberg, Germany). The trapezoidal channel was 27.5 cm in

length and from 2 to 0.5 cm in width, and the spacer used for all the measurements was 350 μm thick. An ultrafiltration membrane of polyether sulfone (PES) [cutoff 1 kDa; Postnova Analytics] was used as the accumulation wall.

Two different mobile phase compositions were used along this work. A 0.01% (m/v) SDS solution prepared in ultrapure water adjusted to pH 8.0 was used as the optimal carrier for separation and size characterization of silver nanoparticles in culture media and cells, whereas a 0.01 M NH_4NO_3 solution at pH 7.4 was used for the identification of other dissolved forms of silver found in the culture media. The mobile phase was degassed prior to use by an online vacuum degasser. The crossflow programs used were optimized in order to obtain a proper separation of the species eluted with the maximum recovery. Table 1 summarizes the optimal programs found for the three situations described: size characterization of AgNPs in culture medium (program A), size characterization of AgNPs in solubilized cells (program C) and identification of dissolved forms of silver(i) in culture medium (program B). A sample loop of 20 μL was used throughout the entire experimental study, unless otherwise stated. No overloading effects were observed in the range of sample masses injected along the study.

The eluent was directed from the channel through an UV-Vis diode-array detector (Shimadzu) recording the absorbance signal in the range from 200 to 650 nm and to the ICPMS spectrometer (Perkin Elmer model ELAN DRC-e), used as a silver specific detector.

Size characterization of silver nanoparticles and identification of proteins associated with silver

Size characterization of silver nanoparticles was done by calibrating the AsFIFFF system *versus* AgNP size standards ranging

Table 1 A summary of the AsFIFFF crossflow programs

Program step	Time, s		Crossflow, mL min^{-1}
Program A			
Injection/focusing	300	Injection flow, 0.2 mL min^{-1}	1
Separation	1800	Constant	0.325
	300	Linear decay	0.325 to 0
	300	Constant	0
Program B			
Injection/focusing	300	Injection flow, 0.2 mL min^{-1}	4
Separation	1800	Constant	3
	90	Exponential decay, $e^{0.1}$	3 to 0
	300	Constant	0
Program C			
Injection/focusing	300	Injection flow, 0.2 mL min^{-1}	4
Separation	300	Constant	2.5
	1200	Linear decay	2.5 to 0
	300	Constant	0

from 10 to 80 nm running programs A and C. The molecular mass of the proteins found in the culture media was assigned by the calibration of the channel with a set of proteins (myoglobin (17 kDa), superoxide dismutase (32.5 kDa), and bovine serum albumin (66.5 kDa and its dimer)) running program B. Details can be found in the ESI.†

Recovery calculations were made using three injections of standard or sample without applying any crossflow in the AsFIFFF channel (no injection step was applied either). Then, injections applying some of the injection or crossflow programmes were carried out. Afterwards peak areas were calculated from the signal areas with the recoveries being expressed as

$$R = \frac{S}{S_0} \times 100 \quad (1)$$

where S is the signal area obtained when a crossflow is applied and S_0 is the signal area obtained with no crossflow. Recoveries were calculated from the absorbance signal at 405 nm and ^{107}Ag ICPMS signals.

Effect of silver nanoparticles and Ag(i) on HepG2 cells viability

The cell viability was quantitatively measured by the Neutral Red Uptake Cytotoxicity Test, according to the International Standard Methods for Biological Evaluation of Medical Devices.²¹

HepG2 cells were treated in the absence (control cells) or in the presence of increasing doses of silver nanoparticles (3.4, 6.8, 10.2, 13.6, 17.0, 20.4, 23.8, 27.2, 30.6, 34.0, 51.0 and 68.0 mg Ag per L) or Ag(i) (0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4 and 5 mg AgNO_3 per L) to obtain a dose-dependent cellular toxicity. Silver nanoparticles containing the product or AgNO_3 were dissolved in MilliQ water (1 g L^{-1} and 100 mg L^{-1} respectively) and an adequate volume was added to the culture medium. A 500 000 cells per mL suspension was prepared and plated in a 96-well plate (100 μL per well). The cell viability was measured by red phenol uptake after 24 hours of treatment. The red phenol uptake was measured at 540 nm in a plate photometer Elisa (Anthos Zenyth 200 st, Biochrom, Cambridge, UK). For every concentration of silver nanoparticles or AgNO_3 tested, two or three independent experiments were done, with six replicates each.

Determination of silver in culture medium and cells

The content of silver in the culture medium was quantified by ICP-MS directly. Cells were analyzed once the culture medium was completely removed from the plates. The content of Ag in the cells was determined by ICP-MS following acid digestion, by the addition of 10 mL of HNO_3 (70%, JT Baker, Holland) and HCl (38%, JT Baker) 1 : 3. Alternatively, the cells were subjected to alkaline solubilization. 4 mL of TMAH and 1 mL of Triton X-100 (0.25%, Sigma) were added to the plates and rotated mechanically at room temperature for 4 h. 2 mL of this solution were diluted up to 8 mL with Triton X-100 (0.05% (v/v)) so that the TMAH final concentration was 5% (v/v). The alkaline extracts were analyzed by AsFIFFF ICPMS using program C.

Transmission electron microscopy (TEM) measurements

Grids were prepared on a Cu mesh 400 holey carbon film. About 10 μL of each sample measured was dropped on the grid and left to dry completely five times. Images were obtained from a JEOL-2000 FXII (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) and recorded using a CCD GATAN camera.

Results and discussion

Characterization of silver nanoparticles in culture medium: stability of the nanoparticles

One of the most important effects produced by culture media on silver nanoparticles is the change on their aggregation state,¹⁹ due to their high ionic strength. Silver nanoparticles were characterized in the culture medium by AsFFFF-UV-Vis-ICPMS. Separation conditions are summarized in Table 1, program A. This program was optimized for the separation of silver nanoparticles in the range of 10 to 100 nm as described in a previous publication.²⁰ Fig. 1 shows the fractogram of the silver nanoparticles in the culture medium after its addition immediately before the measurement. The first peak at 380 s, not resolved from the void peak, corresponds to all the dissolved silver species not retained by the crossflow applied (mainly Ag(I)-protein complexes, as discussed in a following section). The second peak corresponds to the silver nanoparticles with an average size of 17 nm (the value at the maximum of the peak and using the calibration described in eqn S1†). This value shows a good correlation with the size observed for the same nanoparticles in ultrapure water, which suggests that no immediate effect is produced by the culture medium on the aggregation state of the nanoparticles. The use of casein to produce the silver nanoparticles may explain this stability as observed by Ashraf *et al.*⁹ These authors have described the protein-mediated synthesis of AgNPs with casein, which produced NPs that can withstand high salt concentration (up to 0.5 M).

Since cell viability assays are carried out after 24 hours of treatment, silver nanoparticles were added to culture medium

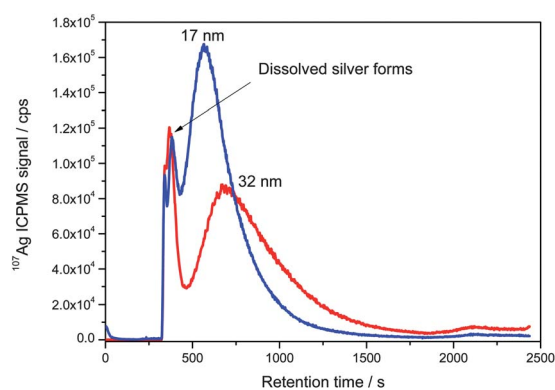


Fig. 1 ^{107}Ag fractogram of AgNPs in culture medium added immediately before the analysis (blue line); added to culture medium and incubated for 24 hours in the absence of cells (red line). Silver concentration: 10.2 mg Ag per L (as AgNPs). Crossflow program A.

and incubated under the same conditions as in cell viability assays for 24 hours in the absence of cells. Fig. 1 shows the fractogram of this medium after the treatment. A clear displacement to longer times is observed, which corresponds to 32 nm at the maximum of the peak using the calibration curve (eqn S1†). This result suggests that silver nanoparticles aggregate to some extent or alternatively, they are covered by other species that increase their size. Maiorano *et al.*²² also observed a size increase on gold nanoparticles of different sizes in the same cell culture medium (DMEM), concluding that the effect observed could be ascribed to protein corona formation around the metallic NPs, since no evidence of aggregation was found by DLS or TEM. In the present study, the UV-Vis spectrum showed no differences at the absorbance maximum wavelength between the nanoparticles present in the culture medium after and before the incubation time (Fig. S1 in the ESI†). Considering the dependence between the nanoparticle size and the UV-Vis spectrum through the surface plasmon resonance band, these results suggest that no aggregation process is produced. With respect to the protein corona effect, although there is no direct evidence, there is a significant difference in the behaviour of the two types of AgNPs with respect to the recoveries inside the channel. Thus AgNPs were eluted in a large percentage, higher than 80%, when they were added immediately before the injection (blue line), whereas they showed a recovery lower than 55% when analyzed after the 24 h incubation period (red line). A protein corona formation would justify this difference given that low recoveries have been observed for proteins under these separation conditions (low ionic strength mobile phase composition).

Characterization of dissolved silver forms in culture medium: oxidation of silver nanoparticles

From the experiments described in the previous section, it was deduced that silver was also present in the culture medium as dissolved silver forms, given the magnitude of the first peak (not resolved from the void peak) obtained in the fractograms shown in Fig. 1. Given the toxicity shown by silver(I) and described in the literature,²³ it is important to distinguish between the toxicity induced by silver(I) and that induced by AgNPs. Some authors have developed different strategies in order to avoid the influence of silver ions released from AgNPs in toxicity assessments (such as the addition of cysteine to AgNP solution to bind silver ions²⁴ or the treatment with ion exchange resins²³). Zook *et al.* used the local resonance plasmon effect shown by AgNPs to study the dissolution rate in DMEM culture medium.²⁵ In this work, the Ag(I) content in the original product was determined by ultrafiltration as described in the ESI,† being less than 0.5% (w/w product). This content does not justify the signals observed in Fig. 1, so the oxidation of the AgNPs during the cytotoxicity assay has to be considered. The complexity of the culture medium justifies the development of a method to identify and characterize the dissolved silver forms.

According to the composition of the culture medium described in the Experimental section, both cysteine and proteins in the fetal bovine serum have high affinity to silver,

because of the thiol groups in their structure. Silver thiol binding is very favorable, and above 0.2 mM thiol (cysteine concentration is 0.5 mM in DMEM medium), the silver soluble fraction is dominated by Ag(I)-thiol complexes.²⁶ The optimum separation conditions for the characterization of proteins in culture medium were studied by the evaluation of both recovery and resolution of monomers and dimers of bovine serum albumin (BSA) (66.5 kDa and 133 kDa). The mobile phase composition and crossflow program were studied in detail.

The mobile phase composition affects the recovery of the proteins eluted. The use of the same mobile phase as in the separation of nanoparticles (0.05% SDS and pH 8.0) was not possible since no signal was obtained.

The ionic strength has a large impact on the protein behavior inside the channel.²⁷ Typical ionic strengths are in the range of 10–200 mM. In this work, two different concentrations (10 and 100 mM) were tested. Both NH₄Cl and NH₄NO₃ were used, although no significant differences on recoveries were observed (75–85% for 10 mM). Although NH₄NO₃ gave higher backgrounds at low wavelengths in the UV-Vis signal, it is a better option when coupling to ICP-MS.²⁸ A pH of 7.4 was chosen for all the experiments, similar to the pH value found in the culture medium. The best results were obtained with a 10 mM NH₄NO₃ mobile phase and so this was used as optimal for protein species characterization.

Crossflows in the range of 2–5 mL min⁻¹ are recommended for proteins.²⁹ For a mixture of proteins with a relatively wide range of molecular masses, a 3 mL min⁻¹ constant crossflow was chosen (program B). Molecular mass calibration of the channel was made according to the procedure described in the Experimental section.

Fig. 2 shows the fractogram of silver when the culture medium incubated for 24 h with AgNPs is injected using program B. Two different populations can be seen. The first one (inset), which corresponds to two peaks at 19 kDa and 53 kDa, as well as a shoulder at 113 kDa, shows a UV-Vis spectrum with a maximum at 280 nm. These results suggest that silver(I) is

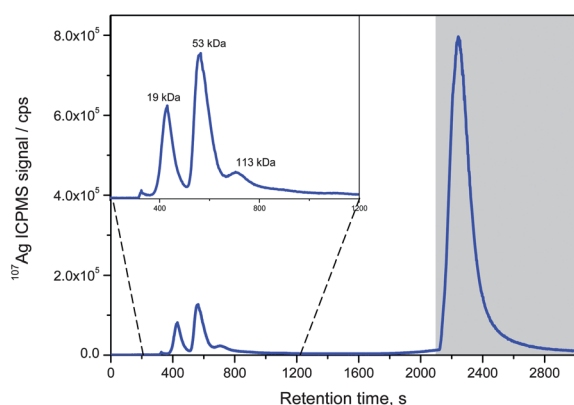


Fig. 2 ¹⁰⁷Ag fractogram of a culture medium incubated with AgNPs for 24 h in the absence of cells. Silver concentration: 10.2 mg Ag per L (as AgNPs). Crossflow program B. Molecular weights shown in the inset correspond to calibration vs. proteins as described in the Experimental section (eqn S2†). Grey area: no crossflow applied.

associated with proteins present in the culture medium. By comparison with the protein composition of the culture medium (see ESI†), it can be stated that the peak at 53 kDa corresponds to α -1-antitrypsin (54 kDa) although a fraction of silver associated with albumin (66.5 kDa) is also possible given the resolution attained. The shoulder at 113 kDa likely corresponds to silver associated with both transferrin (79.5 kDa) and immunoglobulin (150 kDa). The identification of the peak at 19 kDa is problematic since it does not correspond to any of the proteins in FBS at relevant concentration.

The last peak in Fig. 2 is eluted when no crossflow is applied and shows a typical surface plasmon resonance band in the UV-Vis spectrum at 405 nm. This peak corresponds to the silver nanoparticles remaining in the culture medium.

Evolution of silver associated with proteins as a function of time and in the presence of cells

The presence of silver(I) associated with proteins implies an oxidation process of the metallic silver NPs during the toxicity assay. The extension of this process was estimated measuring the percentage of silver(I) in the fractograms of the culture medium after the addition of the AgNPs at $t = 0$ h (measured immediately after the addition of the nanoparticles) and $t = 24$ h, which corresponds to the time of exposure in the toxicological assays. The percentage of silver associated with proteins and eluted through the channel with respect to the total silver amount added went from $2 \pm 1\%$ at $t = 0$ h to $11 \pm 1\%$ at $t = 24$ h. These results confirm that the medium itself contributes to the oxidation of silver NPs to some extent.

The same study was carried out but in the presence of cells. This is a much more complex scenario since the cells can interact with AgNPs and with other soluble forms, and they can do it in a different way. In any case, the percentage of silver associated with proteins and eluted through the channel was also quantified with respect to the total amount of silver added. $20 \pm 4\%$ of silver was found associated with proteins. These results suggest that cells themselves also contribute to the oxidation of AgNPs, which leads to an increment of the silver(I) concentration in the culture medium.

Comparison of silver species in culture medium: AgNPs vs. AgNO₃

The effect of silver as Ag(I) on cell viability was also studied. The same procedure as described above was applied in order to identify the silver forms in the culture medium after the cytotoxicity assay. Fig. 3 shows the comparison between ¹⁰⁷Ag fractograms of two culture media from cytotoxicity assays after the addition of silver as AgNO₃ (2.5 mg Ag per L) and AgNPs (10.2 mg Ag per L). Silver shows a similar profile in both media, being associated with proteins present in the culture medium. No significant variation was observed between fractograms monitoring the absorbance signal at 280 nm along the different media injected, showing a good reproducibility in both retention times and absorbance at the peak maximum. Differences observed in silver distribution may be related to the availability of silver along the incubation period. In the case of silver

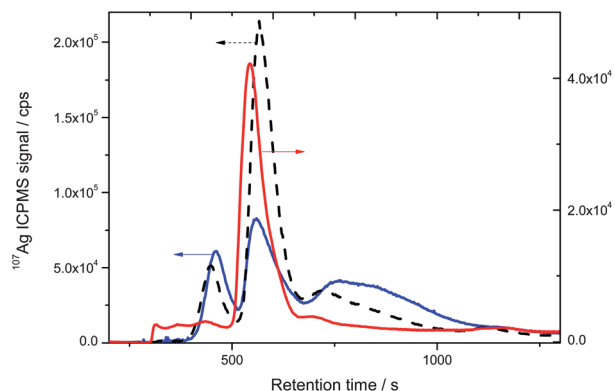


Fig. 3 ^{107}Ag fractograms of culture medium with silver added as AgNO_3 (silver concentration: 2.5 mg L^{-1}) (blue line) and added as AgNPs (silver concentration: 10.2 mg L^{-1}) (dashed line). UV-Vis at 280 nm fractogram of culture medium with cells incubated (red line). Crossflow program B.

nitrate, which shows a more homogeneous profile, all the silver added is available as $\text{Ag}(\text{i})$ and can be immediately bound to proteins. However, when silver is added as silver nanoparticles it is likely that the release of $\text{Ag}(\text{i})$ was gradual, so the proteins with a higher silver content would be those with higher affinity to silver or those in a higher concentration (according to the absorbance at 280 nm).

Cytotoxicity evaluation: relationship with the dissolved species of silver

The cell viability was quantitatively measured by the Neutral Red Uptake Cytotoxicity Test. HepG2 cells were treated in the absence (control cells) or in the presence of increasing doses of silver nanoparticles (from 3.4 to 68 mg Ag per L) or silver nitrate (from 0.064 to 3.2 mg Ag per L) to obtain a dose-dependent cellular toxicity. The effects on cell viability are presented in Fig. 4. In order to compare both results, the total silver concentration is represented in the x -axis. The silver concentration up to 10 mg Ag per L as nanoparticles induced only a reduction of 3–4% on cell viability, whereas a concentration of 1.9 mg Ag per L as AgNO_3 induced a larger effect (around 78%). These effects for silver(i) are in the same concentration range than those published by C. Greulich *et al.*³⁰ in human mesenchymal stem cells (hMSCs), and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). However, K. Kawata *et al.*⁸ did not observe any significant cytotoxicity on HepG2 cells up to 3 mg Ag per L as Ag_2CO_3 under similar conditions. With respect to AgNP effects, it is not possible to establish a comparison with other results, given the grade of variability on the size and coatings of the nanoparticles described in the literature and used in cytotoxicity assays.

The silver forms present in the culture medium were determined at three different concentration levels both for AgNPs and AgNO_3 corresponding to three different toxicity scenarios: no effect (cell viability close to 100%), medium effect (cell viability around 50%) and high effect (cell viability lower than 20%). The concentrations studied were 10.2, 20.4 and 34.0 mg Ag per L as AgNPs and 0.32, 1.3 and 2.5 mg Ag per L as AgNO_3 , respectively.

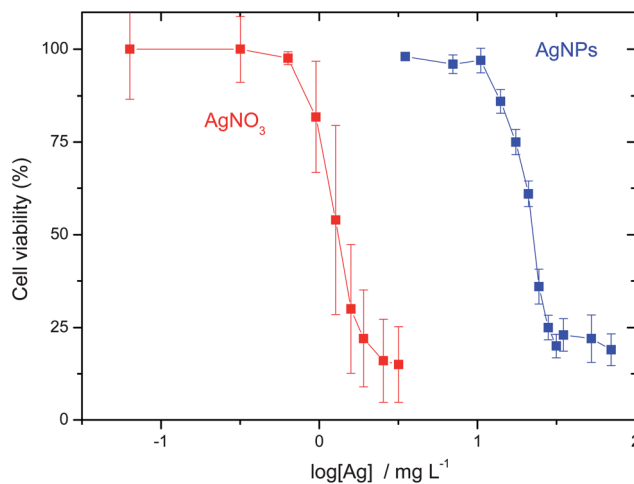


Fig. 4 Effects of silver on HepG2 cell viability as AgNPs and AgNO_3 . Confident bars obtained from two different experiments and six replicates.

In general, the amount of silver that remains in the culture medium is around 60–70% with respect to the total amount added (see Table 2), the rest being in the cells, as discussed in the following section. The ^{107}Ag fractograms of the different culture media are shown in Fig. S2 in the ESI.† The profile of silver associated with proteins showed slight variations compared to the three AgNP concentration levels studied, which suggests that the cell viability is not directly related to the dissolved silver species remaining in the culture medium, even though they can be found in a larger proportion with respect to the AgNO_3 assays (see Table 2). Thus 10.2 mg Ag per L as AgNPs causes no effect on cell viability, whereas 2.5 mg Ag per L as AgNO_3 did, showing both a similar dissolved silver profile (Fig. S2†). A low rate on the release of $\text{Ag}(\text{i})$ from AgNPs during the incubation period would explain this behavior with respect to the silver added as AgNO_3 .

Identification of AgNPs associated with cells

Table 2 shows the amount of silver found associated with cells, determined by following the procedure described in the

Table 2 Concentration of silver associated with cells and culture media for different silver concentration assays (both as AgNO_3 and AgNPs) determined following the procedure described in the Experimental section by acid digestion

[Ag] added mg L^{-1}	[Ag] found in medium ^a mg L^{-1}	[Ag] associated with cells ^a mg L^{-1}	Recovery %	Cell viability %
As AgNO_3				
0.32	0.21 ± 0.01	0.029 ± 0.001	75 ± 3	100 ± 9
1.27	0.75 ± 0.07	0.311 ± 0.001	83 ± 6	54 ± 25
2.54	1.26 ± 0.02	0.676 ± 0.004	76 ± 2	16 ± 11
As AgNPs				
10.2	7.3 ± 0.4	5.7 ± 0.1	127 ± 5	97 ± 3
20.4	16.2 ± 0.8	7.5 ± 0.1	116 ± 10	61 ± 3
34.0	24.4 ± 0.8	10.6 ± 0.1	103 ± 10	23 ± 4

^a Mean $\pm \sigma$ ($n = 3$).

Experimental section. These values are in fairly good agreement with those expected attending to the silver added, the silver found in the culture media and the silver mass balance. Recoveries between 75 and 115%, calculated as $([Ag]_{\text{medium}} + [Ag]_{\text{cells}}) / [Ag]_{\text{added}}$, were obtained in all cases, except for the 10.2 mg Ag per L as AgNP assay, which gave a slightly higher value.

Results from Table 2 reflect a higher tolerance to AgNPs with respect to AgNO₃ in terms of cell viability when comparing the amount of silver associated with cells. Thus $5.7 \pm 0.1 \text{ mg L}^{-1}$ of silver associated with cells causes no effect on cell viability when added as AgNPs, whereas $0.676 \pm 0.004 \text{ mg L}^{-1}$ causes a severe effect when added as AgNO₃. It can be also observed that AgNPs had a slightly higher rate of cellular uptake ($[Ag]_{\text{cells}}/[Ag]_{\text{added}}$) compared with silver in the form of AgNO₃ in all cases, which is in good agreement with the observations made by other authors on HepG2 cells.³¹

It is known that the internalization of NPs can induce stress response, producing reactive oxygen species (ROS), the production of free radicals likely being correlated with cytotoxicity of NPs.¹⁴ Although the mechanisms of cellular nanoparticle uptake are not fully understood at present,³² different cytotoxicity studies carried out on HepG2 cell lines have shown the presence of AgNPs inside the cells using TEM, confocal microscopy¹⁴ and dark-field microscopy.^{12,23} In order to confirm the presence of silver as AgNPs associated with the cells, an alternative procedure based on the solubilization of the cells was optimized. TMAH has been used for sample solubilization of biological materials for the determination of trace elements by different atomic spectrometry techniques.³³ This reagent causes the hydrolytic scission and methylation of ester, amide, and some ether bonds and is able to break disulfide chemical bonds in proteins.³⁴

Cells from two different assays, both AgNPs (20.4 mg Ag per L) and AgNO₃ (2.5 mg Ag per L), were analyzed following the procedure described in the Experimental section. The results are summarized in Table S2 in the ESI.† The comparison with the results obtained by the acidic digestion (a *t* test at 95% confident level was applied) confirms that complete solubilization of silver was achieved with the TMAH treatment. The identification of AgNPs following an acidic digestion of the samples is not possible due to the oxidation of the NPs to Ag(i). Because the TMAH treatment also led to the complete oxidation of AgNPs after 24 h of digestion, shorter times were used in order to ensure the integrity of AgNPs in the solubilization medium. The AgNP fractograms at different digestion times were collected and shown in Fig. S3.† Four hours was chosen as a compromise between the complete solubilization of the sample and losses by dissolution of the AgNPs.

Fig. 5 shows the fractograms obtained after the injection of a solubilized cell sample exposed to 20.4 mg Ag per L (as AgNPs). The ¹⁰⁷Ag signal shows a large peak at 7 min, and two small peaks at 11 and 17 min (see Fig. 5b). Also a small amount of silver is eluted at the end of the program, when no crossflow is applied. The calibration of the channel *versus* AgNP size standards showed that those species eluted before 10 min are smaller than 10 nm, whereas those eluted between 10 and 30 min are in the 10–40 nm range. Larger species (>40 nm) are

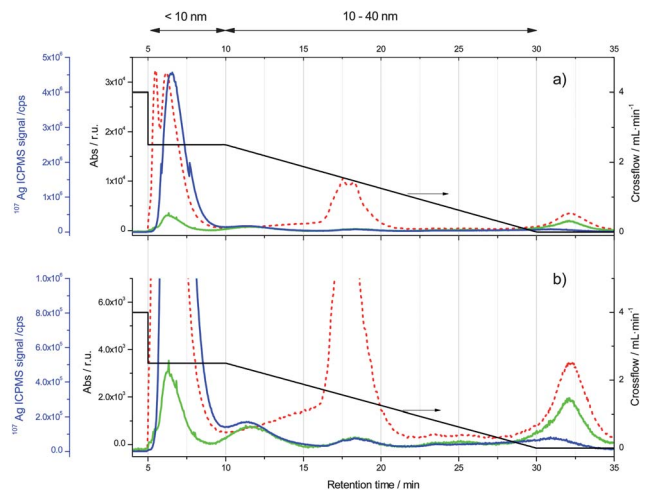


Fig. 5 (a) ¹⁰⁷Ag fractogram (blue line), absorbance at 254 nm (dotted line) and 405 nm (green line) of cells solubilised in TMAH after being exposed to a 20.4 mg Ag per L (as AgNPs) dose. (b) Magnification of fractograms in (a). Crossflow program C (black line). Sizes correspond to calibration vs. AgNP standards as described in the Experimental section.

eluted at longer times. A UV-Vis fractogram at 405 nm follows a similar profile than silver except for the peak at 7 min, which is smaller. If a direct correspondence between absorbance at 405 nm and AgNPs is assumed, it can be stated that the peak at 11 min is attributed to silver in the form of nanoparticles. The relatively large absorbance signal at 254 nm in the 7 and 17 min peaks suggests a more complex nature of the species eluted.

Fractions at the exit of the channel were collected at these times and analyzed by TEM. Images are shown in Fig. 6. The original sample was also observed by TEM (Fig. 6a), which showed nanoparticles within a wide range of nanoparticle sizes, from diameters of 35–40 nm down to 3–4 nm. These smaller nanoparticles should elute at times shorter than 10 min, however images from the fraction collected at 7 min show the presence of some AgNPs in the range of 5–10 nm sizes (Fig. 6b) but not smaller. The large dilution inside the channel and the lower size resolution of the TEM used, close to 2–3 nm, may justify the absence of these small nanoparticles in the images obtained. In any case, the size of these nanoparticles is smaller than the original size (*ca.* 15 nm), which implies a dissolution process. The effect of the solubilisation with TMAH on the AgNP size was studied by the addition of AgNPs to the solubilisation medium. The analysis of the medium by AsFIFFF-UV-Vis after 4 hours revealed a decrease on the AgNP signal but not a significant change on the size distribution with respect to the original AgNPs, as shown in Fig. S3 in the ESI.†

These results suggest an intracellular dissolution (oxidation) of the AgNPs, justifying the presence of these small AgNPs in the cells.

Images from the fraction collected at 11 min (Fig. 6c) show nanoparticles of sizes around 15 nm, which is the same size as the original AgNPs. Even though a scarce amount of nanoparticles is observed, these results are in good agreement with the information obtained by the fractograms, given the high absorbance at 405 nm associated with this peak. The last

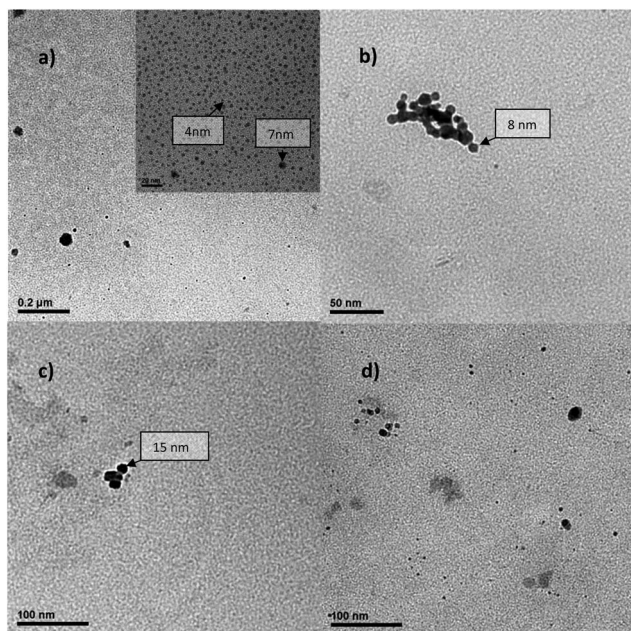


Fig. 6 TEM images from cells solubilised in TMAH after being exposed to a 20.4 mg Ag per L (as AgNPs) dose: (a) the sample without separation 15 000 \times and 100 000 \times (inset). The sample collected from the AsFIFFF system at (b) 7 min 60 000 \times , (c) 11 min 40 000 \times and (d) 17 min 40 000 \times .

fraction collected corresponds to the peak eluted at 17 min. Images show several nanoparticles of different sizes, most of them smaller than 10 nm. The longer retention times observed with respect to those expected according to their size would be justified by their association with residues from the cells (large absorbance peak at 254 nm).

Summarizing, three different silver fractions have been detected in the cells after their solubilisation in TMAH. A fraction composed of silver(I) associated with macromolecules, which coelutes with AgNPs of small size at 7 min. A second fraction of AgNPs of the same size as the originals, eluted at 11 min and a third fraction, which corresponds to AgNPs associated with amorphous residues of the cells.

Conclusions

A methodology based on AsFIFFF with UV-Vis detection and coupled with ICPMS has been applied to the detection and characterization of AgNPs in cytotoxicity tests with human cell lines. Complex culture media used in these assays induce different processes on AgNPs that can modify their nature, altering the possible mechanisms of toxicity. In this work, no agglomeration of NPs was observed in the culture medium, probably due to the casein stabilized nature of the AgNPs used along this work. On the other hand, an increment in the size distribution was observed, which can be associated with a "protein corona" effect. The presence of silver(I) in the culture medium after 24 hours of incubation has been also confirmed. Silver(I) is released from AgNPs and it is associated with the proteins present in the culture medium, a process that is accelerated by the presence of the cells.

The detection of AgNPs associated with the cells has also been confirmed. The solubilisation of cells with TMAH has been successfully carried out. The combination of the surface plasmon resonance band shown by the AgNPs, together with the silver ICP-MS signal, has allowed the identification of the silver nanoparticles in the solubilised medium. The higher silver concentrations found in the cells treated with AgNPs with respect to those exposed to silver as AgNO₃, together with the higher uptake rate at the same toxicity levels, suggest a different mechanism of interaction, being less toxic in the case of AgNPs.

The capability of detecting Ag(I) forms in the culture media can contribute to distinguish whether NPs have toxicities different from those of Ag(I) and determine whether the release of Ag(I) can overstate the toxicity observed from AgNPs in other systems. The identification of AgNPs associated with cells can also help to better understand the mechanisms of toxicity of the NPs. Future studies will focus on obtaining quantitative information of both AgNPs and silver dissolved species in these complex systems.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness; project CTQ2012-38091-C02-01 and project CTP P06/10. The authors also thank Laboratorios Argenol S.L. for providing the Collargol samples. The authors would like to acknowledge the use of Servicio General de Apoyo a la Investigación-SAI, Universidad de Zaragoza.

Notes and references

- 1 D. R. Boverhof and R. M. David, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **396**, 953–961.
- 2 J. W. Card and B. A. Magnuson, *J. Food Sci.*, 2009, **74**, vi–vii.
- 3 V. Stone, B. Nowack, A. Baun, N. Van Den Brink, F. von der Kammer, M. Dusinska, R. Handy, S. Hankin, M. Hasselov, E. Joner and others, *Sci. Total Environ.*, 2010, **408**, 1745–1754.
- 4 M. Auffan, J. Rose, M. R. Wiesner and J.-Y. Bottero, *Environ. Pollut.*, 2009, **157**, 1127–1133.
- 5 C. Blasco and Y. Picó, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2011, **30**, 84–99.
- 6 M. Hassellöv, J. W. Readman, J. F. Ranville and K. Tiede, *Ecotoxicology*, 2008, **17**, 344–361.
- 7 K. Tiede, A. Boxall, S. Tear, J. Lewis, H. David and M. Hasselov, *Food Addit. Contam., Part A*, 2008, **25**, 795–821.
- 8 K. Kawata, M. Osawa and S. Okabe, *Environ. Sci. Technol.*, 2009, **43**, 6046–6051.
- 9 S. Ashraf, A. Z. Abbasi, C. Pfeiffer, S. Z. Hussain, Z. M. Khalid, P. R. Gil, W. J. Parak and I. Hussain, *Colloids Surf., B*, 2013, **102**, 511–518.
- 10 S. G. Mukherjee, N. O'Claonadh, A. Casey and G. Chambers, *Toxicol. In Vitro*, 2012, **26**, 238–251.
- 11 L. Wei, J. Tang, Z. Zhang, Y. Chen, G. Zhou and T. Xi, *Biomed. Mater.*, 2010, **5**, 044103.
- 12 A. Lankoff, W. J. Sandberg, A. Wegierek-Ciuk, H. Lisowska, M. Refsnes, B. Sartowska, P. E. Schwarze, S. Meczynska-Wielgosz, M. Wojewodzka and M. Kruszewski, *Toxicol. Lett.*, 2012, **208**, 197–213.

- 13 L. Calzolari, D. Gilliland and F. Rossi, *Food Addit. Contam., Part A*, 2012, **29**, 1183–1193.
- 14 R. P. Singh and P. Ramarao, *Toxicol. Lett.*, 2012, **213**, 249–259.
- 15 J. C. Giddings, *Science*, 1993, **260**, 1456–1465.
- 16 J. Bednar, R. Poda, D. M. Mitrano, J. Kennedy, E. P. Gray, J. F. Ranville, C. Hayes, F. H. Crocker and J. Steevens, *Talanta*, 2013, **104**, 140–148.
- 17 M. Baalousha, B. Stolpe and J. R. Lead, *J. Chromatogr., A*, 2011, **1218**, 4078–4103.
- 18 I. Römer, T. White, M. Baalousha, K. Chipman, M. R. Viant and J. R. Lead, *J. Chromatogr., A*, 2011, **1218**, 4226–4233.
- 19 B. Schmidt, K. Loeschner, N. Hadrup, A. Mortensen, J. J. Sloth, C. B. Koch and E. H. Larsen, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 2461–2468.
- 20 E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, F. Laborda and J. R. Castillo, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **401**, 2723–2732.
- 21 *International Standard ISO 10993-5, Biological evaluation of medical devices*.
- 22 G. Maiorano, S. Sabella, B. Sorce, V. Brunetti, M. A. Malvindi, R. Cingolani and P. P. Pompa, *ACS Nano*, 2010, **4**, 7481–7491.
- 23 S. Kim, J. E. Choi, J. Choi, K.-H. Chung, K. Park, J. Yi and D.-Y. Ryu, *Toxicol. In Vitro*, 2009, **23**, 1076–1084.
- 24 E. Navarro, F. Piccapietra, B. Wagner, F. Marconi, R. Kaegi, N. Odzak, L. Sigg and R. Behra, *Environ. Sci. Technol.*, 2008, **42**, 8959–8964.
- 25 J. M. Zook, S. E. Long, D. Cleveland, C. L. Geronimo and R. I. MacCuspie, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **401**, 1993–2002.
- 26 J. Liu, D. Sonshine, S. Shervani and R. H. Hurt, *ACS Nano*, 2010, **4**, 6903–6913.
- 27 S. Schachermeier, J. Ashby, M. Kwon and W. Zhong, *J. Chromatogr., A*, 2012, **1264**, 72–79.
- 28 F. Laborda, J. Medrano and J. R. Castillo, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2004, **59**, 857–870.
- 29 M. Schimpf, K. Caldwell and J. C. Giddings, *Field-Flow Fractionation Handbook*, Wiley, Weinheim, 2000, pp. 435–453.
- 30 C. Greulich, D. Braun, A. Peetsch, J. Diendorf, B. Siebers, M. Epple and M. Koeller, *RSC Adv.*, 2012, **2**, 6981–6987.
- 31 R. Y. Prasad, J. K. McGee, M. G. Killius, D. Ackerman, C. F. Blackman, D. M. DeMarini and S. O. Simmons, *Toxicol. In Vitro*, 2013, **27**, 2013–2021.
- 32 C. Greulich, J. Diendorf, T. Simon, G. Eggeler, M. Epple and M. Koller, *Acta Biomater.*, 2011, **7**, 347–354.
- 33 B. L. Batista, D. Grotto, J. L. Rodrigues, V. C. D. O. Souza and F. Barbosa, *Anal. Chim. Acta*, 2009, **646**, 23–29.
- 34 J. Nóbrega, M. C. Santos, R. de Sousa, S. Cadore, R. M. Barnes and M. Tatro, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2006, **61**, 465–495.

Evaluation of number concentration quantification by single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry: microsecond vs. millisecond dwell times

Isabel Abad-Álvarez^{1,2} · Elena Peña-Vázquez² · Eduardo Bolea¹ · Pilar Bermejo-Barrera² · Juan R. Castillo¹ · Francisco Laborda¹

Received: 30 November 2015 / Revised: 17 March 2016 / Accepted: 22 March 2016 / Published online: 16 April 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract The quality of the quantitative information in single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS) depends directly on the number concentration of the nanoparticles in the sample analyzed, which is proportional to the flux of nanoparticles through the plasma. Particle number concentrations must be selected in accordance with the data acquisition frequency, to control the precision from counting statistics and the bias, which is produced by the occurrence of multiple-particle events recorded as single-particle events. With quadrupole mass spectrometers, the frequency of data acquisition is directly controlled by the dwell time. The effect of dwell times from milli- to microseconds (10 ms, 5 ms, 100 μ s, and 50 μ s) on the quality of the quantitative data has been studied. Working with dwell times in the millisecond range, precision figures about 5 % were achieved, whereas using microsecond dwell times, the suitable fluxes of nanoparticles are higher and precision was reduced down to 1 %; this was independent of the dwell time selected.

Moreover, due to the lower occurrence of multiple-nanoparticle events, linear ranges are wider when dwell times equal to or shorter than 100 μ s are used. A calculation tool is provided to determine the optimal concentration for any instrument or experimental conditions selected. On the other hand, the use of dwell times in the microsecond range reduces significantly the contribution of the background and/or the presence of dissolved species, in comparison with the use of millisecond dwell times. Although the use of dwell times equal to or shorter than 100 μ s offers improved performance working in single-particle mode, the use of conventional dwell times (3–10 ms) should not be discarded, once their limitations are known.

Keywords Single particle · SP-ICP-MS · Nanoparticle · Quantification · Number concentration

Introduction

Although Degueldre et al. [1] demonstrated in the early 2000s the feasibility of single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS) for the analysis of colloidal and microparticle suspensions, it has been its application to the analysis of engineered nanoparticles (ENPs) since 2010 that has led to the progressive consolidation of this methodology [2–4]. The success of SP-ICP-MS lies on two main facts: first, analysis can be performed with any commercial ICP-MS instrument; second, different types of information can be obtained in a fairly easy way. By processing data properly, the following information related to one or more specific elements can be obtained [5]: (i) the presence of one or more elements in particulate and/or dissolved forms; (ii) the element mass content per particle; (iii) the size of the particles if additional information about their composition, shape, and density is

Published in the topical collection *Single-particle-ICP-MS Advances* with guest editors Antonio R. Montoro Bustos and Michael R. Winchester.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00216-016-9515-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Francisco Laborda
flaborda@unizar.es

¹ Group of Analytical Spectroscopy and Sensors (GEAS), Institute of Environmental Sciences (IUCA), University of Zaragoza, Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza, Spain

² Group of Trace Elements, Spectroscopy and Speciation (GETEE), Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, University of Santiago de Compostela, Avda. Das Ciencias, s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain

available; (iv) the particle number concentration; (v) the mass per particle and the size number distributions; and (vi) the element mass concentration both of dissolved and particulate forms.

The key issue behind SP-ICP-MS consists in measuring a particle suspension at sufficiently low number concentration by acquiring data at a frequency sufficiently high. Under such conditions, discrete particle events are recorded over a continuous baseline, whose origin is the background or the presence of dissolved species. Then, the number of particle events is proportional to the particle number concentration in the suspension, whereas the intensity of each event is proportional to the mass of element per particle. Particle number concentrations must be selected in accordance with the data acquisition frequency, to record events corresponding to just one particle, avoiding the occurrence of events due to two or more particles if working at too high number concentrations. With quadrupole mass spectrometers, the frequency of data acquisition is directly controlled by the dwell time, the time spent acquiring data at a specific mass, and the settling time, the time spent for stabilization of the quadrupole once it has changed from one mass to another. Indirectly, the transmission and storage of data from the instrument to the computer can also limit the feasible acquisition frequencies [3]. Initially, dwell times were limited to the millisecond range, allowing the monitoring of just one element/isotope per particle. Under such conditions, dwell times between 3 and 10 ms and number concentrations below 10^8 L^{-1} are recommended [5], and particle events are recorded as individual pulses (pulse particle events). Dwell times in the low millisecond range (e.g., 1 ms) must be avoided to prevent partially recorded pulses. Once the data have been acquired, they can be processed by using in-house programmed spreadsheets, although a calculation tool is also freely available [6].

More recently, dwell times in the range of microseconds are becoming common practice [7, 8]. Because the duration of each particle event in the detector is about 300–500 μs [7, 9], when dwell times equal to or below 100 μs are used, particle events can be recorded as transient signals instead of as pulses (transient particle events). Moreover, up to two elements/isotopes can be monitored in the same particle [8]. On the other hand, manufacturers are implementing modules for single-particle data acquisition and processing in their respective ICP-MS software, making easier the analysis of particles by SP-ICP-MS to unskilled users.

Therefore, in view of the rapid evolution that SP-ICP-MS has undergone, the aim of this work is to evaluate the performance of SP-ICP-MS when using microsecond dwell times in comparison to the work at milliseconds and the requirement of selecting the appropriate number concentrations, depending on the instrument, the operating conditions applied, and the presence of dissolved species, to obtain quantitative information of the best quality.

Experimental

Instrumentation

A Perkin Elmer NexION® 350X Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (ICP-MS) (Shelton, USA) was used throughout. The sample introduction system consisted of a concentric PFA PTFE nebulizer and a quartz cyclonic spray chamber. Default instrumental and data acquisition parameters are listed in Table 1. Settling time during data acquisition was eliminated.

Standards

Diluted suspensions of gold and silver nanoparticles were prepared from commercially available suspensions. A reference gold nanoparticle suspension of 60-nm nominal diameter was obtained from NIST (RM 8013). Suspensions of monodisperse citrate-stabilized silver nanoparticles of nominal diameters 40 ± 4 , 60 ± 4 and 100 ± 8 nm were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland). Number concentrations were calculated from nominal diameters and silver concentrations determined by ICP-MS (17.9 and 19.0 mg L^{-1} for 60- and 100-nm suspensions, respectively). Contribution of dissolved silver was determined by SP-ICP-MS and considered for calculations (0.5 and 0.4 % for 60- and 100-nm suspensions, respectively). Dilutions were prepared in ultrapure water (MilliQ, Millipore Corporation, MA, USA) by accurately weighing (± 0.1 mg) aliquots of the stock suspensions after 1 min sonication. After dilution and before each analysis, the suspensions were bath sonicated for 1 min. Longer sonication times were not used to avoid excessive heating of the suspensions.

Aqueous silver solutions were prepared from a standard stock solution of 1001 mg L^{-1} (Merck, Darmstadt,

Table 1 Default instrumental and data acquisition parameters for single-particle ICP-MS

Instrumental parameters	
RF power	1600 W
Argon gas flow rate	
Plasma	18 L min^{-1}
Auxiliary	1.2 L min^{-1}
Nebulizer	0.97 L min^{-1}
Sample uptake rate	0.95 mL min^{-1}
Data acquisition parameters	
Dwell time	10 ms, 5 ms, 100 μs , 50 μs
Readings per replicate	6,000, 12,000, 600,000, 1,000,000
Settling time	–
Total acquisition time	60, 300, 600 s
Isotopes monitored	^{107}Ag , ^{197}Au

Germany) by dilution in ultrapure water. Aqueous gold solutions were prepared from a standard stock solution of 1000 mg L^{-1} (Panreac, Barcelona, Spain) by dilution in 5 % (v/v) hydrochloric acid (Baker Instra-Analyzed, J.T. Baker, Holland).

Data processing

Using millisecond dwell times, the processing of the intensity data involves discriminating data corresponding to nanoparticle events (recorded as individual pulses) from those of the baseline, which include the contribution of background and/or dissolved species [3]. Different algorithms have been proposed to achieve it [10–12]. Using microseconds, nanoparticle events are recorded as transient signals and intensity data is processed in a similar way than a chromatogram. Once each transient signal has been identified over the continuous baseline, data points corresponding to the transient signal are summed, being converted into an individual nanoparticle event.

Syngistix™ Nano Application Module, as well as in-house developed programs based on MatLab (MathWorks, Natick, USA) and Excel (Microsoft, Redmond, USA) spreadsheets were used for data processing. OriginPro 8 data analysis software (OriginLab Corporation, Northampton, USA) was also used.

Nebulization efficiency was calculated according to the particle frequency method developed by Pace et al. [4]. Optimal number concentrations were calculated following the approach developed by Laborda et al. [11] for SP-ICP-MS working at millisecond dwell times. Both optimal number concentration and nebulization efficiency calculations are implemented in the spreadsheet included in the [Electronic Supplementary Material \(ESM\)](#).

Results and discussion

Millisecond vs. microsecond dwell times: recording of signals

When a sufficiently diluted suspension of nanoparticles is introduced into the plasma, each nanoparticle produces an individual pack of ions. Under the conditions used along this work, these packs of ions resulted in transient signals with a median width of $450 \mu\text{s}$ for 60-nm Ag and Au NPs, measured with a dwell time of $50 \mu\text{s}$. The width of the signals increased with size, for Ag NPs from 40 to 100 nm, from 400 to $500 \mu\text{s}$ (median values of 1000 signals, with interquartile ranges from 150 to $250 \mu\text{s}$, respectively). Figure 1 shows the appearance of 60-nm Au NP signals, of the same total intensity, with respect to the dwell time used. By using dwell times shorter than $100 \mu\text{s}$, the profile of the transient signal produced by each

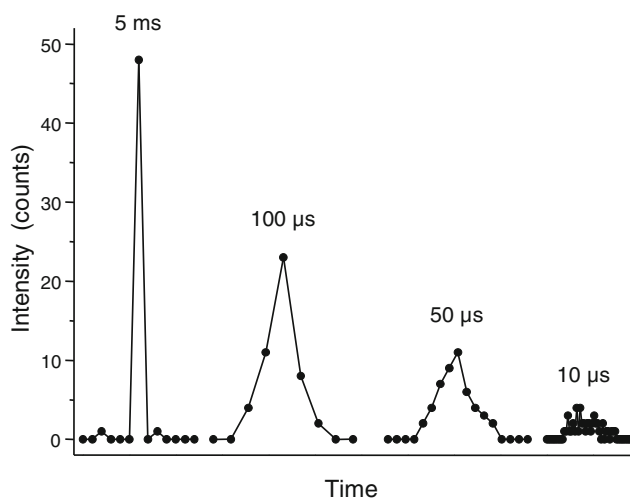


Fig. 1 Appearance of SP-ICP-MS signal depending on the dwell time selected (time scale for 100, 50, and $10 \mu\text{s}$, $\times 100$). NIST RM 8013 60-nm gold nanoparticles. Total intensity, 48 counts

nanoparticle can be recorded, whereas working at dwell times in the millisecond range, the packs of ions are measured as pulses. Dwell times in the range of 1 ms – $200 \mu\text{s}$, close to the width of the transient signals generated by each individual pack of ions, were not considered because the probability of measuring just a part of the pack is higher [5]. Whereas the effect of using long dwell times in relation with the occurrence of multiple-nanoparticle events will be discussed in the next paragraph, it is worth noting that the transient signals from 60-nm Au NPs were incorrectly recorded when too short dwell times (e.g., $10 \mu\text{s}$) were used, so such dwell times should be avoided. The reason for such behavior lies on the small number of ions counted during these short periods of time and the high uncertainty associated. By way of example, if 50 ions are recorded from a Au NP of 60 nm, 1 ± 1 ions would be detected each $10 \mu\text{s}$ if the 50 ions were homogeneously distributed along the $500\text{-}\mu\text{s}$ duration of the signal. However, because the ions arrive randomly at the detector, the counting would fluctuate between 0 and 3 counts per dwell time according to Poisson statistics.

Effect of dwell time on the occurrence of multiple-nanoparticle events

When recording events from individual nanoparticles, both as transient signals or pulses, the flux of nanoparticles through the plasma must be selected in accordance with the data acquisition frequency used. At the concentrations used in SP-ICP-MS, the arrival of nanoparticles at the plasma can be considered a random process, and Poisson statistics are used to estimate the probability of one or more than one nanoparticle arriving at the plasma during a fixed period of time, being detected as a single event [9]. The probability $P(n)$ of

recording events from n nanoparticles within a reading period is given by

$$P(n) = \frac{\lambda^n}{n!} e^{-\lambda} \quad (1)$$

where λ is a parameter that represents the flux of nanoparticles entering the plasma (Q_{NP}) multiplied by the reading period. This reading period is equal to the dwell time (t_{dwell}), when working in the range of milliseconds, and it was considered equal to the peak width (w_{peak}) of the transient signals (500 μ s along this work) when working in the microsecond range. Using a conventional nebulization system, the flux of nanoparticles is expressed as

$$Q_{NP} = \eta_{neb} Q_{sam} C_{NP} \quad (2)$$

where η_{neb} is the nebulization efficiency, Q_{sam} the sample uptake rate, and C_{NP} the nanoparticle number concentration. Equation 1 implies that using dwell times in the millisecond range, the use of shorter dwell times allows working at higher fluxes and hence at higher nanoparticle number concentrations, while maintaining a low occurrence of more than one nanoparticle event [11]. On the other hand, in the case of working in the microsecond range, there should be no influence of the dwell time and the occurrence of more than one nanoparticle event will depend directly on the number concentration.

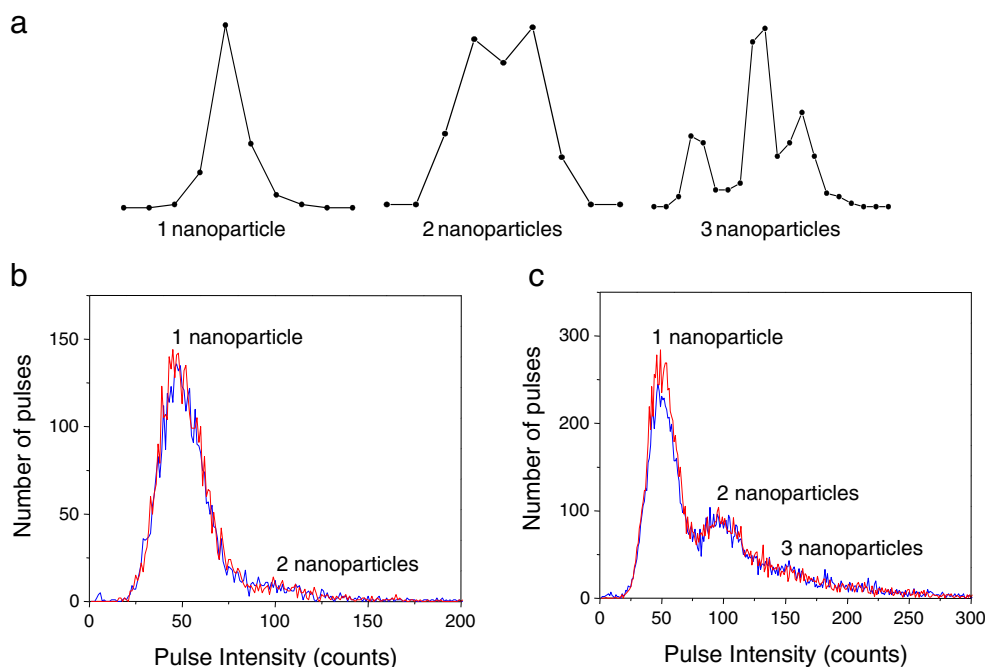
Figure 2a shows the typical profiles of transient signals acquired at 100 μ s dwell time, corresponding to one nanoparticle and two or three unresolved

nanoparticles, which are recorded as one-, two-, and three-nanoparticle events, respectively, but counted as a one-nanoparticle event due to the inherent difficulties of resolving conveniently the multiple contributions. Figure 2b, c shows the effect of nanoparticle number concentration on the occurrence of these multiple-nanoparticle events at nanoparticle concentrations of 3.8×10^8 and 2.2×10^9 L⁻¹. Distributions at intensities double or triple that corresponding to one-nanoparticle events are obtained depending on the concentration, whereas the reduction of the dwell time from 100 to 50 μ s did not produce any significant change.

Effect of acquisition parameters and nanoparticle number concentration on the uncertainty of data

As we have seen in the previous paragraph, the nanoparticle number concentration controls the occurrence of events due to two or more nanoparticles, which results in a bias because they are counted as one-nanoparticle events. On the other hand, the nanoparticle number concentration also controls the number of events counted during a specific period of time and, hence, the counting precision. In a previous publication [11], we proposed a criterion to control the uncertainty related to the counting of nanoparticle events based on the contributions of systematic and random errors associated to the counting of nanoparticle events. Random errors are governed by Poisson statistics, and they can be estimated from the total number of nanoparticles counted ($N = Q_{NP} t_i$) where t_i is the total acquisition time. This

Fig. 2 Effect of nanoparticle number concentration on the occurrence of multiple-nanoparticle events. NIST RM 8013 60-nm gold nanoparticles. **a** Transient signals corresponding to one nanoparticle and two and three unresolved nanoparticles (t_{dwell} , 100 μ s). Intensity histograms corresponding to number concentrations of **b** 3.8×10^8 and **c** 2.2×10^9 L⁻¹ and dwell times of 100 μ s (blue line) and 50 μ s (red line)



random error can be expressed as a relative standard deviation (rsd_{NP}):

$$rsd_{NP} = \frac{1}{\sqrt{t_i Q_{NP}}} \tag{3}$$

The systematic error when counting events arises from the difficulty of discriminating one-nanoparticle events from those of two or more nanoparticles. An approximate linear relationship was established between the relative bias ($bias_{NP}$) and the nanoparticle flux. This relative bias is related to the dwell time when working in the range of milliseconds and to the peak width when microseconds are used:

$$bias_{NP} \approx \frac{t_{dwell}}{2} Q_{NP} \tag{4}$$

$$bias_{NP} \approx \frac{W_{peak}}{2} Q_{NP} \tag{5}$$

Equations 4 and 5 show that the relative bias increases linearly with Q_{NP} , whereas the rsd decreases with the squared root of Q_{NP} (Eq. 3). Figure 3 shows this opposite behavior of relative bias and rsd for a range of t_i and t_{dwell} values. For a fixed t_i and t_{dwell} , there is an optimal flux at the intersection of both functions where the rsd and relative bias are equal and both types of errors contribute to uncertainty to the same extent. At higher concentrations, the bias is higher than the rsd , whereas at lower ones, the rsd predominates over the bias. This optimal flux can be related to the nanoparticle number concentration by using Eq. 2 and the specific nebulization conditions used. A spreadsheet is available in the ESM to calculate the optimal concentration for any set of instrument and acquisition parameters. As can be seen in Fig. 3, the uncertainty is considered independent with respect to the dwell time when events are

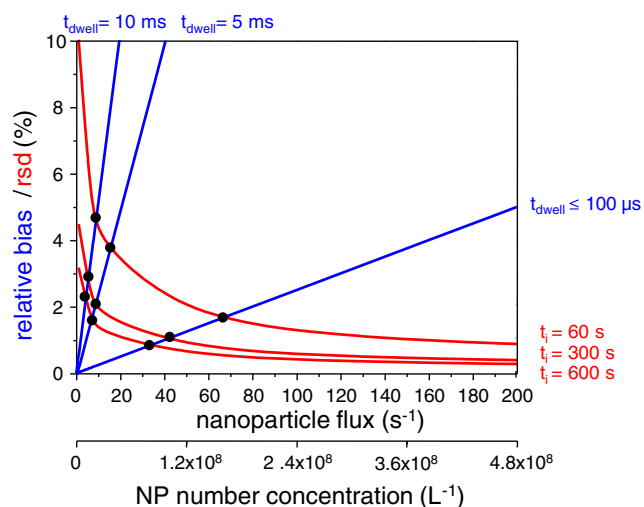


Fig. 3 Theoretical behavior of the relative standard deviation (*red*) and the relative bias (*blue*) associated with the counting of nanoparticles for different dwell and total acquisition times. *Dots* correspond to the optimal nanoparticle flux/number concentration at the dwell and total acquisition times selected

recorded as transient signals, which implies working with dwell times equal to or shorter than 100 μ s.

Under the experimental conditions used along this work, the nebulization efficiency working at a sample flow rate of 0.95 mL min⁻¹ was 2.6 %. The optimal number concentration calculated by using Eqs. 3 and 4 or 5, for a total acquisition time of 60 s, was 1.55×10^8 L⁻¹ working at $t_{dwell} \leq 100$ μ s and close to one order of magnitude lower working at 5 or 10 ms (3.40×10^7 and 2.06×10^7 L⁻¹, respectively). Table 2 summarizes the calculated optimal number concentration, as well as the corresponding bias and rsd . Data in Table 2 show that by decreasing the dwell time, the occurrence of two-nanoparticle events decreases and hence the bias, allowing higher optimal number concentration and improving the rsd due to counting statistics. By using a total acquisition time of 1 min and a dwell time of 5 ms, a rsd of 3.6 % is predicted, whereas for dwell times of 100 and 50 μ s, it should be equal to 1.6 %. These estimations are in close agreement with the $rsds$ obtained in practice at the corresponding optimal number concentrations for 60-nm silver nanoparticles: 3.9, 1.3, and 1.4 % (ten replicated measurements), respectively. Increasing the total acquisition time from 1 to 5 or 10 min, involves a decrease of rsd down to 1.0 and 0.8 %, respectively, with even smaller improvements at longer times. Thus, for the sample introduction system used in this work and using dwell times in the microseconds range, with a minimum acquisition time of 300 s, 1 % can be considered a practical limit for the attainable measurement precision. This figure could be improved by increasing the flux of nanoparticles by improving the nebulization efficiency without decreasing the sample flow rate, which is not the case with conventional pneumatic nebulizers.

Effect of dwell time on the linear range

The determination of nanoparticle number concentrations is based on the following expression:

$$N_{NP} = \eta_{nebul} Q_{sam} t_i C_{NP} \tag{6}$$

where N_{NP} is the number of nanoparticle events counted during the selected acquisition time (t_i). Equation 6 assumes that

Table 2 Calculated optimal nanoparticle number concentration for different dwell and total acquisition times and estimated uncertainty

Dwell time	Total acquisition time s	Number concentration L ⁻¹	$bias_{NP} = rsd_{NP}$ %
10 ms	60	2.06×10^7	4.3
5 ms	60	3.40×10^7	3.6
≤ 100 μ s	60	1.55×10^8	1.6
	300	9.98×10^7	1.0
	600	8.05×10^7	0.8

all the events counted correspond to one nanoparticle. At high number concentrations, the occurrence of events due to two or more nanoparticles is expected to be significant, as it can be calculated from Eq. 1, involving a departure from linearity due to the bias discussed in the previous paragraph.

Figure 4 shows that number concentration calibrations in SP-ICP-MS show an evident curvature, fitting to a second-order equation, both at milli- and microsecond dwell times. Because departure from linearity is related to the occurrence of two or more nanoparticle events, linear ranges working with millisecond dwell times are expected to be shorter than those working at microseconds, as can be observed in Fig. 4. By using a dwell time of 5 ms, the linear range set up to $2.5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$, whereas working in the microsecond range (t_{dwell} , 50 μs), the linear range increased one order of magnitude up to $3.8 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$. In any case, the determination of the optimal concentration range is a fair way to estimate the order of magnitude of the upper limit of the linear range.

Dwell time and the effect of the dissolved species

Plasma polyatomic ions (background) and dissolved species of the element measured contribute to the continuous baseline in the typical time scans recorded in single-particle mode. When the data from the time scan is plotted as a frequency histogram, this contribution corresponds to the first distribution, which should fit to a Poisson profile [3]. The most significant effect of high background levels or the presence of high concentrations of dissolved species is the increment in the size detection limits of the determination. The contribution of plasma polyatomics depends on the isotope measured, and it is critical for certain isotopes (e.g., ^{56}Fe , ^{48}Ti , ^{28}Si), although it can be reduced by collision or reaction cells [13]. On the other hand, if the sample contains both nanoparticles and dissolved species of the same element, the effect is similar to that

of the plasma background and involves the removal of the dissolved species to overcome this problem [14].

Figure 5 shows histograms corresponding to the 60-nm Ag NP suspension ($2.5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$) alone (Fig. 5a–d) and in the presence of dissolved silver at $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (Fig. 5e–h) and $4 \mu\text{g L}^{-1}$ (Fig. 5i–l). Time scans were recorded at 10 and 5 ms, as well as at 100 and 50 μs . Ideally, histograms should show two distributions, the first one due to the dissolved silver and the second one to the nanoparticles. In the case of Fig. 5a–d, where no dissolved silver was added, the first distribution was produced by residual silver (blank contribution). Dissolved species are homogeneously distributed into the aerosol droplets, producing a continuous flux of analyte to the plasma and hence a constant count rate signal in the detector, whose standard deviation depends just on Poisson statistics, being equal to the squared root of the signal expressed in counts, for signals below 1000 counts [15]. The count intensity at the maximum of these distributions increases with the dissolved species concentration, as it can be clearly observed in Fig. 5 for dwell times of 10 and 5 ms. On the other hand, if the dwell time is shortened, this intensity decreases proportionally, as it can be seen in Fig. 5e, f, i, and j for dwell times of 10 and 5 ms.

The intensity corresponding to the dissolved species/background (μ_B) affects directly the attainable size limit of detection (LOD_{size}) through its standard deviation (σ_B). Applying a 3σ criterion for spherical, solid, and pure nanoparticles, the LOD_{size} is given by the following expression [5, 11]:

$$\text{LOD}_{\text{size}} = \left(\frac{18\sigma_B}{\pi\rho X_M K_{\text{ICPMS}} K_M} \right)^{\frac{1}{3}} = \left(\frac{18\sqrt{\mu_B + 1}}{\pi\rho X_M K_{\text{ICPMS}} K_M} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (7)$$

where ρ is the density of the nanoparticle, X_M the mass fraction of the element in the NP, K_{ICPMS} the detection efficiency (ratio of the number of ions detected versus the number of

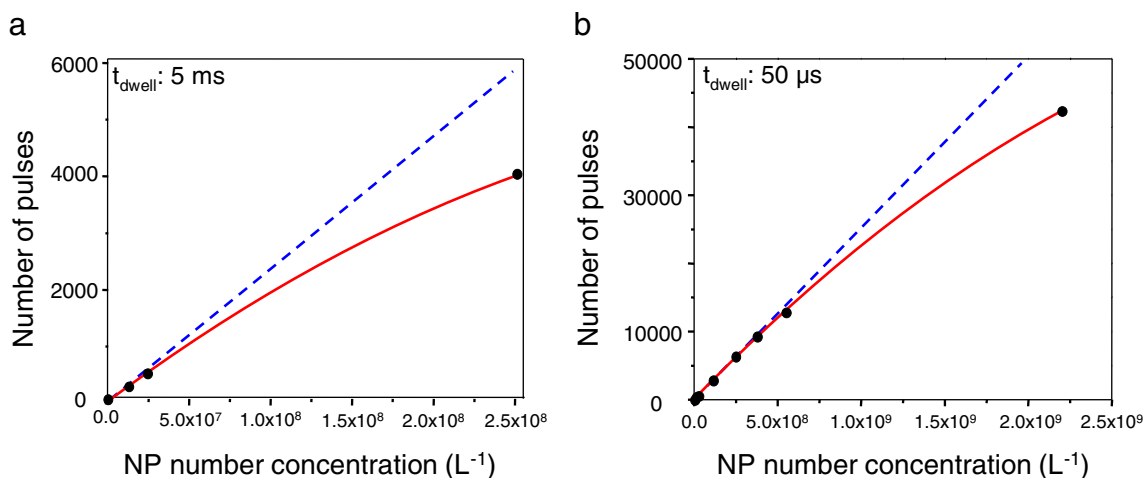


Fig. 4 Number concentration calibrations at different dwell times. **a** 5 ms, **b** 50 μs . Theoretical calibration (Eq. 6) (blue broken line); experimental calibration (red solid line). NIST RM 8013 60-nm gold nanoparticles. Total acquisition time, 60 s

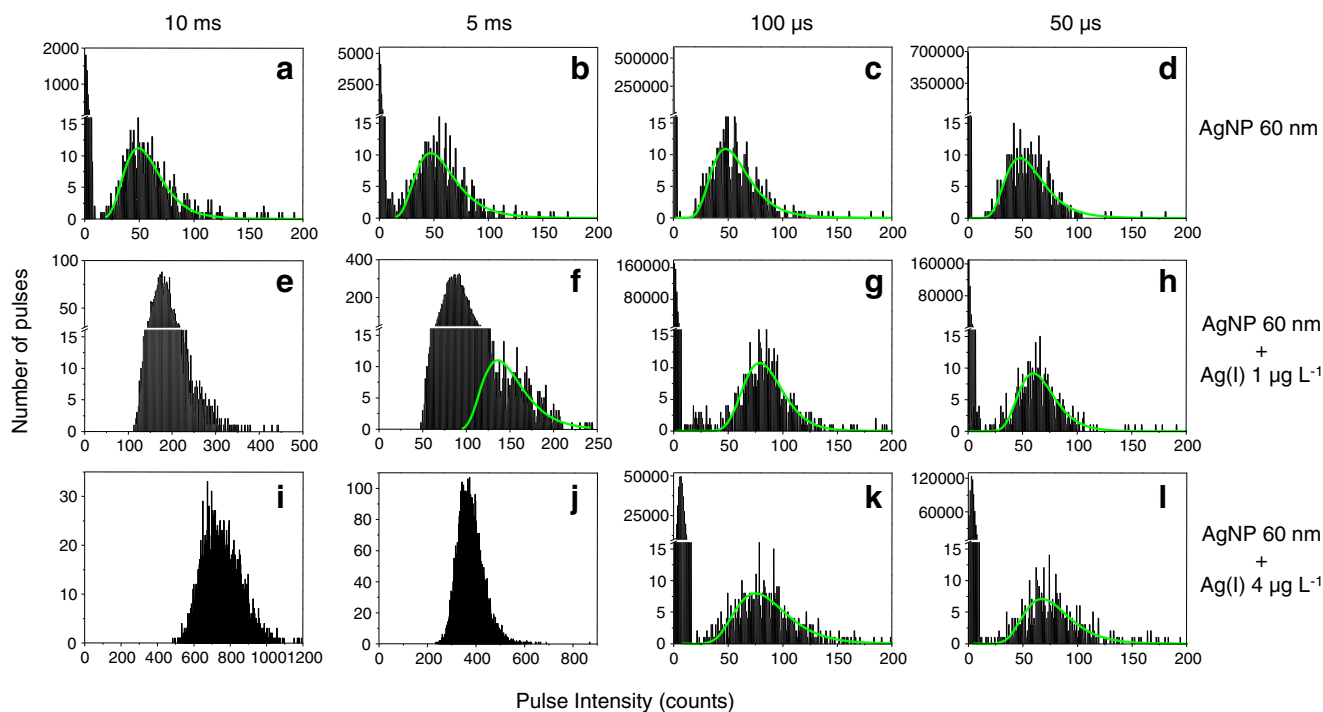


Fig. 5 Signal distribution histograms corresponding to **a–d** 60-nm nanoparticle suspension of $2.5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$, **e–h** 60-nm nanoparticle suspension of $2.5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ with $1 \mu\text{g L}^{-1}$ Ag(I), **i–l** 60-nm nanoparticle suspension of $2.5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ with $4 \mu\text{g L}^{-1}$ Ag(I). Dwell times, 10 ms, 5 ms, 100 μs , and 50 μs

atoms introduced into the ICP), and $K_M (=AN_{Av}/M_M)$ includes the contribution from the element measured (A , atomic abundance of the isotope considered; N_{Av} , Avogadro number; M_M , the atomic mass). Apart from the influence of dissolved species/background on LOD_{size} , Eq. 7 includes the effect of the detection efficiency, which depends on each particular instrument.

Table 3 summarizes the LOD_{size} calculated from the data shown in Fig. 5, for the different dwell times and dissolved silver concentrations checked. The limits of detection determined support the appearance of the histograms of Fig. 5e, i, f, and j, corresponding to dwell times of 10 and 5 ms, where the distribution corresponding to the nanoparticles is partially or totally overlapped with the dissolved silver distribution. On the

Table 3 Size limits of detection for silver nanoparticles in the presence of different concentrations of dissolved silver (I)

Dwell time	LOD_{size}		
	Ultrapure water	$1 \mu\text{g L}^{-1}$ Ag(I)	$4 \mu\text{g L}^{-1}$ Ag(I)
10 ms	17	34	43
5 ms	16	30	39
100 μs	14	17	21
50 μs	14	16	19

other hand, when working in the microsecond range (100 and 50 μs), although the presence of dissolved silver also affects the limits of detection, the effect is less critical, allowing the identification of the 60-nm silver nanoparticle distributions even in the presence of $4 \mu\text{g L}^{-1}$ of dissolved silver.

Practical approach for nanoparticle number concentration quantification

The reliable quantification of a suspension of nanoparticles implies the selection of the right concentration and to overcome the presence of dissolved species. If the concentration of nanoparticles is high enough, by choosing the most convenient dilution, the determination can be performed around the optimal nanoparticle concentration in order to get the best uncertainty figures. In a similar way, the contribution of the dissolved element can be reduced, improving the size detection limits and allowing the detection of the nanoparticles. As we have discussed above, by selecting short dwell times in the microsecond range, the contribution of the dissolved species can also be reduced significantly. Besides, the use of dwell times equal to or less than 100 μs allows getting lower rstds and bias, which do not depend on the dwell time selected.

From a practical point of view, the easiest way to find the right dilution to get the optimal concentration consists in checking the number of nanoparticle events recorded from an initial dilution. The calculation of the optimal concentration

Table 4 Determination of nanoparticle number concentrations of commercial silver nanoparticle suspensions. Mean \pm confidence interval ($n=3$)

Size	Number concentration		
	L ⁻¹		
	Calculated	Measured	
$t_{\text{dwell}}, 100 \mu\text{s}$		$t_{\text{dwell}}, 50 \mu\text{s}$	
60 nm	$2.23 \pm 0.17 \times 10^8$	$2.35 \pm 0.02 \times 10^8$	$2.43 \pm 0.12 \times 10^8$
100 nm	$2.34 \pm 0.37 \times 10^8$	$2.32 \pm 0.05 \times 10^8$	$2.44 \pm 0.07 \times 10^8$

from the experimental conditions selected (nebulization efficiency, sample flow rate, dwell time, total acquisition time) involves knowing also the expected number of nanoparticle events which should be recorded. By comparing the expected and the measured number of events, the right dilution can be found easily in an iterative way. For instance, by using the conditions used along this work (see Table 1), with a nebulization efficiency of 2.6 %, a total acquisition time of 1 min, and a dwell time of 50 μs , the calculated optimal concentration was $1.55 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, which should result in 3900 events. Thus, a dilution of the sample producing around 4000 events should be the best choice. A calibration with one standard at about these values would produce the best results [16], although if very diluted samples are going to be measured, the calculated optimal concentration is a good estimation of the linear range for a multi-point calibration. Table 4 shows the results obtained for the determination of the number concentration of silver nanoparticle suspensions of 60 and 100 nm by using the approach described above. Calibration was performed with NIST RM 8013 60-nm gold nanoparticles. Quantitative recoveries in the range of 99–109 % were obtained. Table 5 shows the capability of SP-ICP-MS using microsecond dwell times (100 and 50 μs) for quantification of nanoparticle concentrations in the part-per-trillion level in the presence of part-per-billion dissolved species. Sixty-nanometer

Table 5 Determination of nanoparticle number concentrations of 60-nm Ag nanoparticle suspensions in the presence of Ag(I). Mean \pm confidence interval ($n=3$)

Ag(I) concentration	Number concentration		
	L ⁻¹		
	Calculated	Measured	
$t_{\text{dwell}}, 100 \mu\text{s}$		$t_{\text{dwell}}, 50 \mu\text{s}$	
1 $\mu\text{g L}^{-1}$	$2.47 \pm 0.17 \times 10^7$	$2.41 \pm 0.35 \times 10^7$	$2.18 \pm 0.15 \times 10^7$
4 $\mu\text{g L}^{-1}$	$2.46 \pm 0.17 \times 10^7$	$2.17 \pm 0.25 \times 10^7$	$2.09 \pm 0.32 \times 10^7$

Ag nanoparticles were quantified in the presence of 1 and 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ of silver(I) with recoveries in the range of 85–98 %.

Conclusions

The availability of commercial fast-scanning quadrupole ICP-MS instruments, able to work with dwell times down to 10 μs , has opened new possibilities to single-particle ICP-MS. Apart from the capability of monitoring more than one isotope per particle by using microsecond dwell times, longer linear ranges can be achieved for number concentration calibrations and better precision, down to 1 % or even better, with respect to the use of millisecond dwell times. Moreover, these improvements are independent of the dwell time selected if it is equal to or shorter than 100 μs and longer than 10 μs . On the other hand, the presence of dissolved species, as well as the occurrence of high plasma background levels, can be managed more easily by using dwell times in the microsecond range than in the millisecond range because size limits of detection are less affected by the presence of dissolved species in the former case.

In spite of the advantages of using microsecond dwell times in SP-ICP-MS, all users, including those using older instruments limited to the millisecond range, but also the last generation instrument users working at microsecond dwell times, should be aware that, depending on the instrument and the experimental conditions used, the wrong selection of the particle concentrations can lead to inaccurate results. Results of the best quality can be achieved by selecting an optimal particle concentration, where the bias due to the occurrence of two-particle events is equal to the precision due to counting statistics.

Acknowledgments The authors thank D.M. Escala (Group of Non-linear Physics, University of Santiago de Compostela, Spain) for developing the MatLab programs for data processing.

Compliance with ethical standards

Funding This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, projects CTQ2012-38091-C02-01, CTQ2012-38091-C02-02, CTQ2015-68094-C2-1-R and CTQ2015-68094-C2-2-R.

Conflict of interest The Syngistix™ Nano Application Module was provided by Perkin Elmer.

References

1. Degueldre C, Favarger P-Y. Colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectroscopy: a feasibility study. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2003;217:137–42.

- Heithmar EM, Pergantis SA. Characterizing concentrations and size distributions of metal-containing nanoparticles in waste water, EPA/600/R-10/117. U.S. Environmental Protection Agency; 2010.
- Laborda F, Jiménez-Lamana J, Bolea E, Castillo JR. Selective identification, characterization and determination of dissolved silver(I) and silver nanoparticles based on single particle detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal At Spectrom.* 2011;26:1362–71.
- Pace HE, Rogers NJ, Jarolimek C, Coleman VA, Higgins CP, Ranville JF. Determining transport efficiency for the purpose of counting and sizing nanoparticles via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem.* 2011;83:9361–9.
- Laborda F, Bolea E, Jiménez-Lamana J. Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: a powerful tool for nanoanalysis. *Anal Chem.* 2014;86:2270–8.
- Peters R, Herrera-Rivera Z, Undas A, van der Lee M, Marvin H, Bouwmeester H, et al. Single particle ICP-MS combined with a data evaluation tool as a routine technique for the analysis of nanoparticles in complex matrices. *J Anal At Spectrom.* 2015;30:1274–85.
- Hineman A, Stephan C. Effect of dwell time on single particle inductively coupled plasma mass spectrometry data acquisition quality. *J Anal At Spectrom.* 2014;29:1252–7.
- Montaño MD, Badiei HR, Bazargan S, Ranville JF. Improvements in the detection and characterization of engineered nanoparticles using spICP-MS with microsecond dwell times. *Environ Sci Nano.* 2014;1:338–46.
- Olesik JW, Gray PJ. Considerations for measurement of individual nanoparticles or microparticles by ICP-MS: determination of the number of particles and the analyte mass in each particle. *J Anal At Spectrom.* 2013;27:1143–55.
- Tuoriniemi J, Cornelis G, Hassellöv M. Size discrimination and detection capabilities of single-particle ICPMS for environmental analysis of silver nanoparticles. *Anal Chem.* 2012;84:3965–72.
- Laborda F, Jiménez-Lamana J, Bolea E, Castillo JR. Critical considerations for the determination of nanoparticle number concentrations, size and number size distributions by single particle ICP-MS. *J Anal At Spectrom.* 2013;28:1220–32.
- Cornelis G, Hassellöv M. A signal deconvolution method to discriminate smaller nanoparticles in single particle ICP-MS. *J Anal At Spectrom.* 2014;29:134–44.
- Lee S, Bi X, Reed RB, Ranville JF, Herckes P, Westerhoff P. Nanoparticle size detection limits by single particle ICP-MS for 40 elements. *Environ Sci Technol.* 2014;48:10291–300.
- Hadioui M, Peyrot C, Wilkinson KJ. Improvements to single particle ICPMS by the online coupling of ion exchange resins. *Anal Chem.* 2014;86:4668–74.
- Laborda F, Medrano J, Castillo JR. Quality of quantitative and semiquantitative results in inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal At Spectrom.* 2001;16:732–8.
- Laborda F, Medrano J, Castillo JR. Influence of the number of calibration points on the quality of results in inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal At Spectrom.* 2004;19:1434–41.

ICP - Mass Spectrometry

Authors:

Isabel Abad-Álvaro^{1,2}, Elena Peña Vázquez²,
Eduardo Bolea¹, Pilar Bermejo-Barrera², Juan
Castillo¹, Francisco Laborda¹

¹ Group of Analytical Spectroscopy and
Sensors (GEAS), Institute of Environmental
Sciences (IUCA), University of Zaragoza,
Pedro Cerbuna 12, 50009
Zaragoza, Spain

² Group of Trace Elements, Spectroscopy and
Speciation (GETEE), Department of Analytical
Chemistry, Nutrition and Bromatology,
University of Santiago de Compostela,
Avda. Das Ciencias, s/n, 15782
Santiago de Compostela, Spain

A Comparison of Microsecond vs. Millisecond Dwell Times on Particle Number Concentration Measurements by Single Particle ICP-MS

Introduction

With the growing popularity of nanomaterials in a wide variety of products and processes, the need to measure and characterize

these materials has also grown. For metallic or metal-containing engineered nanoparticles (NPs), single particle ICP-MS (SP-ICP-MS) has been developed and is growing in popularity due to its ability to rapidly detect and characterize a large number of particles, determine particle size and size distributions, the particle number concentration in a sample, and the elemental mass concentration of both dissolved and particulate species. SP-ICP-MS has been applied to a wide variety of sample types¹⁻⁵, demonstrating its versatility.

A key variable in SP-ICP-MS, which must be applied correctly for accurate measurement of particle concentration, is the dwell time of the ICP-MS. Although this topic has been discussed previously^{6,7}, this work will focus on direct comparisons of results using both microsecond and millisecond dwell times. Since a detailed version of this work is available⁸, only a brief description will be given here.

Experimental

Standards

Gold (Au) and silver (Ag) nanoparticle suspensions were purchased from commercial sources: Au NPs (60 nm) were purchased from NIST™ (SRM 8013, Gaithersburg, Maryland, USA), while 40, 60, and 100 nm silver NPs were purchased from Sigma-Aldrich (Buchs, Switzerland). Prior to analysis, the stock solutions were diluted to appropriate concentrations in ultrapure water. After dilution and prior to analysis, solutions were sonicated for one minute in an ultrasonic bath.

Aqueous Ag and Au solutions were prepared from a 1000 mg/L stock standards (Ag: Merck™, Darmstadt, Germany; Au: Panreac™, Barcelona, Spain). For Ag, dilutions were done in ultrapure water, while for Au, 5% (v/v) hydrochloric acid was used as the diluent.

Instrumentation

All measurements were made with a PerkinElmer NexION® 350X ICP-MS operating in Single Particle mode, which eliminates the settling time of the quadrupole during data acquisition. Instrumental parameters are shown in Table 1. All data were collected and processed with the Syngistix™ Nano Application Module, within the Syngistix for ICP-MS instrument software.

Table 1. NexION 350 ICP-MS Operating Parameters.

Parameter	Value
Nebulizer	Concentric PFA
Spray Chamber	Quartz cyclonic
Sample Uptake Rate (mL/min)	0.95
RF Power (W)	1600
Isotopes Monitored	¹⁰⁷ Ag, ¹⁹⁷ Au

Results and Discussion

Recording the Signal

From previous work, it is known that the time duration of the cloud of ions from a single nanoparticle is on the order of 400-500 μs ⁹. In this work, the duration of the ion signal was measured from 40, 60, and 100 nm Ag NPs. The results appear in Table 2 and show that larger particles produce longer signals, as expected. When measuring the signal duration from a 60 nm Au ENP, it was found to be of the same order as the Ag ENP. These results indicate that using dwell times < 100 μs will allow multiple data points to be acquired for each particle.

Table 2. Duration of Ion Signal as a Function of Ag Particle Size.

Ag Particle Size (nm)	Ion Signal Duration (μs)
40	400
60	450
100	500

Figure 1 shows 60 nm Au NP signals as a function of dwell time for a constant particle concentration, with the total ion intensity being constant with respect to dwell time. The data in the figure indicate that the transient signal profile produced from each ENP is recorded when using microsecond dwell times, whereas for millisecond dwell times, packs of ions are measured as pulses. It can also be seen that the signal degrades using a 10 μs dwell time.

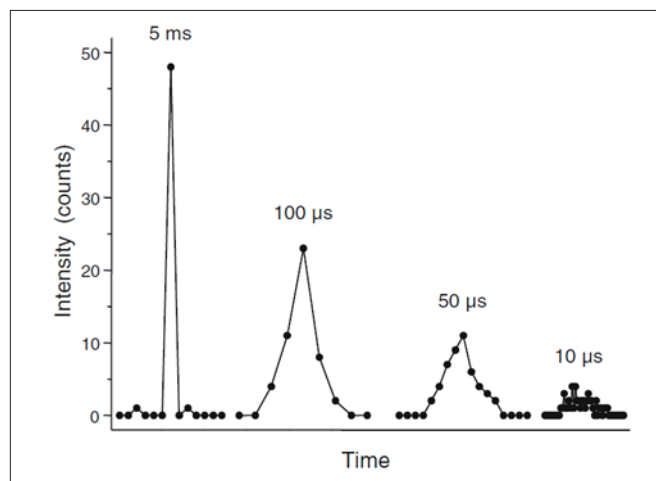


Figure 1. SP-ICP-MS signal as a function of dwell time for NIST™ 8013 60 nm Au NPs (248,000 part/mL). Total intensity = 48 counts.

Effect of Dwell Time on Number Concentration

When working with dwell times in the millisecond range (commonly 3-10 ms), the risk of measuring two or more particles within a dwell time, if particle concentrations are too high, implies a systematic error when counting particle events (which are considered due to just one particle). On the other hand, if microsecond dwell times are used, the risk arises from recording transient signals corresponding to two or more unresolved particles. In any case, the consequence will be an increased bias in the determined particle number concentration. The extent of this bias depends on the particle number concentration in the measured suspension, and, ultimately, the flux of NPs entering the plasma. However, if the particle concentration is reduced to avoid this bias, the number of particle events recorded will be lowered, increasing the random errors due to counting statistics and impairing the precision of the measurements. Table 3 shows the effect of dwell time for a compromised particle number concentration, where bias and random errors are similar, as well as the relative errors in the measurements. Although the optimal NP concentration that can be measured decreases with increasing dwell time, the error in the measurements is quite high: more than 3%. These results imply that longer dwell times may be useful for measuring NPs in samples with low NP concentrations (as expected in environmental systems)¹⁰, but the error of the measurement will be great, leading to less accurate results.

In contrast, using dwell times < 100 μ s, the errors decrease significantly, even as the particle concentration increases, as may be expected in consumer products^{2,3}. However, even at low particle concentrations, the error of the results decreases. These results suggest that dwell times < 100 μ s are more appropriate for any SP-ICP-MS measurements, no matter the NP concentration.

Table 3. Calculated Optimal NP Number Concentrations for Different Dwell and Acquisition Times and Estimated Uncertainty.

Dwell Time	Acquisition Time (s)	Number Concentration (Part/mL)	Error (%)
10 ms	60	20,600	4.3
5 ms	60	34,000	3.6
< 100 μ s	60	155,000	1.6
	300	99,800	1.0
	600	80,500	0.8

Effect of Dwell Time on Linear Range of Particle Concentrations

We have seen that millisecond dwell times produce significant bias when determining particle number concentrations (Table 3). Nevertheless, the results imply that samples with high NP concentrations can be diluted significantly and be analyzed with millisecond dwell times, although the results will not be as accurate as with microsecond dwell times. It is important to understand the effect of dwell time on the linearity of the response at different dwell times. To achieve this, data was acquired for 60 seconds for 60 nm Au NPs using dwell times of 5 ms and 50 μ s for different NP concentrations. The results are plotted in Figure 2 and show that linear range for particle concentration is one order of magnitude higher for 50 μ s dwell times than for 5 ms dwell times. This observed deviation from linearity is directly related to the occurrence of two-NP events, which are recorded as single particle events, and take place at lower particle concentrations when millisecond dwell times are selected. Again, this is important when considering samples with high nanoparticle concentrations.

Effect of Dwell Time on Dissolved Species

Even though SP-ICP-MS is designed to look at NPs, dissolved species of the element of interest are also seen: since a single mass is being scanned, signals from the metal present both in the particles and as dissolved species will be measured. Dissolved species will be visible in the background/baseline signal between particle pulses. The baseline can also be due to interferences (i.e. ArO⁺ on ⁵⁶Fe⁺), but Reaction mode can remove these interferences¹⁰.

The problem with dissolved species is that their presence affects the smallest size NPs that can be measured: the intensity of the particle signal remains constant, but as the background signal increases, the signal-to-background ratio decreases.

To study this effect, three solutions were prepared: 60 nm Ag NPs, 60 nm Ag NPs + 1 μ g/L dissolved Ag, and 60 nm Ag NPs + 4 μ g/L dissolved Ag. In all solutions, the Ag NP concentration was 25,000 parts/mL. For each solution, data was acquired for 60 seconds at four different dwell times: 10 ms, 5 ms, 100 μ s, and 50 μ s. The results of these studies are shown in Figure 3, where the x-axis represents the pulse intensity, and the y-axis shows the number of pulses.

Looking at the 60 nm Ag NP solutions (a-d), the plots for all dwell times look similar: the nanoparticle distribution is centered around a pulse intensity of 50 counts, and the number of pulses is about 15. The first distribution represents the dissolved Ag in the sample. Because no dissolved silver was added in these samples, the intensity is near zero.

With the addition of 1 μ g/L dissolved silver, the plots begin to change (e-h). For the millisecond dwell times, the distributions move to higher counts (about 150-200 counts for the 5 and 10 ms dwell times, respectively), and the distribution corresponding to the dissolved Ag increases significantly. These changes indicate that the NPs and dissolved Ag are not being distinguished. In contrast with the microsecond dwell times, the increase in the dissolved Ag distribution is low due to the short dwell times selected, showing that both the Ag NPs and dissolved Ag are being detected independently.

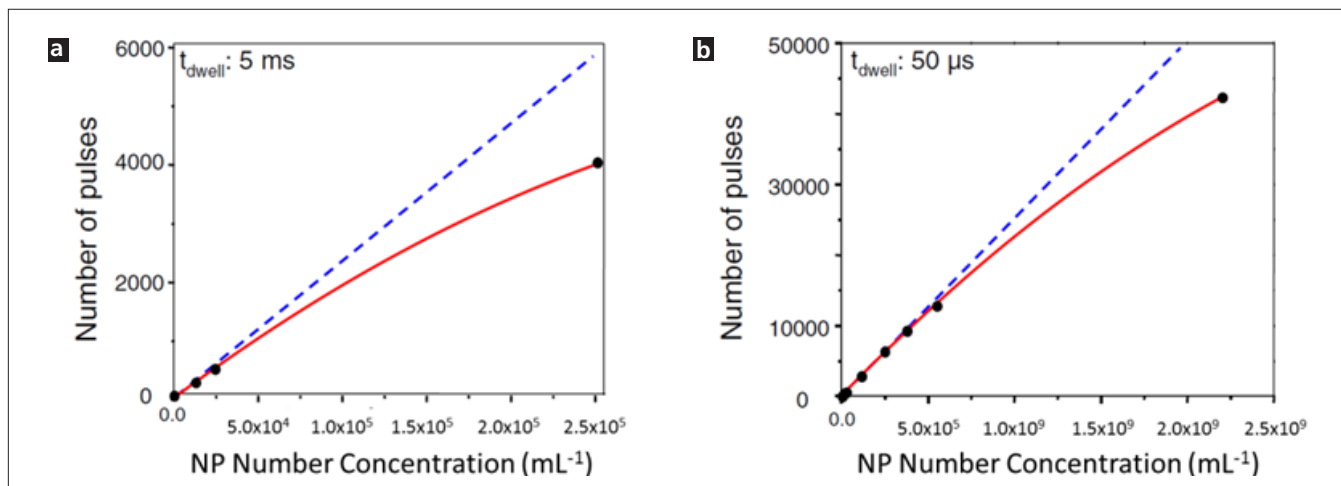


Figure 2. Number concentrations at dwell times of 5 ms (a) and 50 μ s (b). Blue line = theoretical calculations; red line = experimental results (60 nm Au NPs, acquisition time = 60 sec).

As the dissolved Ag concentration is increased to 4 $\mu\text{g/L}$ (Figure 3 i-l), the distributions for the millisecond dwell times shift farther to the right, indicating increased intensity, the result of the increased Ag concentration. In contrast, the distributions with the microsecond dwell times move to a lesser extent. These results indicate that the higher level of dissolved Ag is being measured, but it is not affecting the ability to measure the 60 nm Ag NPs.

Taken together, the results from these tests demonstrate that dwell times of 100 μs or less allow NPs to be detected in the presence of dissolved species. As the dissolved concentration increases, shorter dwell times will not increase the background signal significantly, maintaining a fair signal-to-background ratio. However, there will eventually be a limit where the dissolved concentration will decrease the signal-to-background ratio to a point where it will not be possible to detect NPs.

Approach for Particle Number Concentration Quantification

When developing a quantitative method for SP-ICP-MS analysis, the selection of the appropriate particle concentration is important, and it is directly related to the dwell times used, as shown above. The main advantage when using microsecond dwell times ($\leq 100 \mu\text{s}$) is that the same NP concentrations are appropriate over a range of dwell times, whereas working at milliseconds, these concentrations should be selected for each

dwell time. In any case, for samples with high NP concentrations, using the appropriate dilution factor must be considered.

As an example, consider the experimental conditions used in this work and the analysis of 60 nm Ag NPs. Using a 50 μs dwell time, the optimal Ag NP concentration is 155,000 part/mL, which should give 3900 particle events in a 60 second analysis. If the NP concentration in an unknown sample is lower, the number of events recorded will be smaller, which will only affect the precision of the results due to counting statistics. On the other hand, a sample with a high concentration of NPs should be analyzed at various dilutions until about 4000 events are measured in 60 seconds – this would be the correct dilution.

Conclusion

This work has demonstrated the importance of dwell time when measuring particle concentrations by SP-ICP-MS. While dwell times from microseconds to milliseconds are available, milliseconds have several disadvantages which could lead to erroneous results when measuring particle concentration. In contrast, microsecond dwell times allow particles to be measured in the presence of dissolved species, are less likely to measure two particles, allow higher particle concentrations to be measured, and lead to less bias in the results.

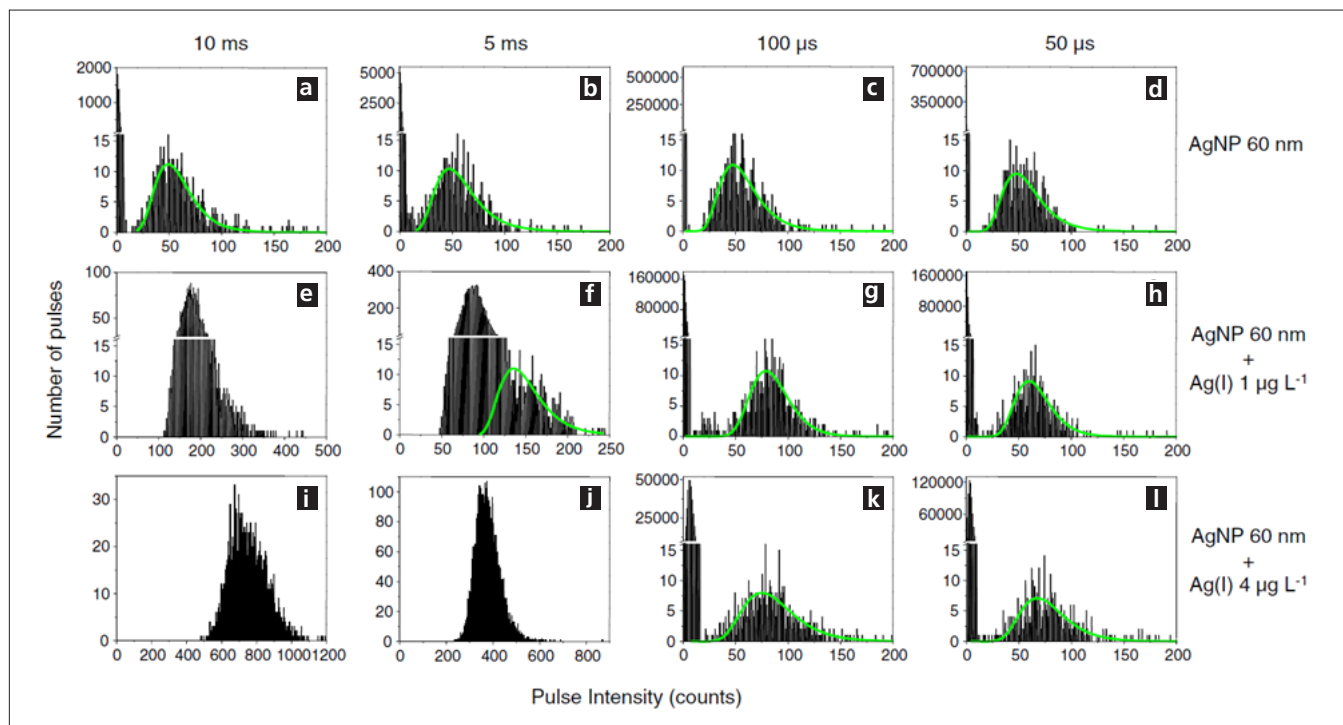


Figure 3. Size distribution histograms for: 60 nm Ag NPs (a-d); 60 nm Ag NPs + 1 $\mu\text{g/L}$ dissolved Ag (e-h); and 60 nm Ag NPs + 4 $\mu\text{g/L}$ dissolved Ag (i-l). All solutions contained Ag NPs at a concentration of 25,000 part/mL and were analyzed with dwell times of 10 ms (a, e, i), 5 ms (b, f, j), 100 μs (c, g, k), and 50 μs (d, h, l).

References

1. Hadioui, M., Wilkinson, K., Stephan, C. "Assessing the Fate of Silver Nanoparticles in Surface Water using Single Particle ICP-MS", PerkinElmer application note, 2014.
2. Davidowski, L., Stephan, C. "Characterization of Silver Nanoparticles in Dietary Supplements by Single Particle ICP-Mass Spectrometry", PerkinElmer application note, 2014.
3. Dan, Y., Shi, H., Lian, X., Stephan, C. "Measurement of Titanium Dioxide Nanoparticles in Sunscreen using Single Particle ICP-MS", PerkinElmer application note, 2015.
4. Cirtiu, C.-M., Fleury, N., Stephan, C. "Assessing the Fate of Nanoparticles in Biological Fluids using SP-ICP-MS", PerkinElmer application note, 2015.
5. Gray, E. Higgins, C.P., Ranville, J.F. "Analysis of Nanoparticles in Biological Tissues using SP-ICP-MS", PerkinElmer application note, 2014.
6. Hineman, A., Stephan, C. *J. Anal. At. Spectrom.* 2014, 29, 1252.
7. Stephan, C., Neubauer, K. "Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Understanding How and Why", PerkinElmer white paper 2014.
8. Abad-Álvarez, I., Peña-Vázquez, E., Bolea, E., Bermejo-Barrera, P., Castillo, J.R., Laborda, F. *Anal. Bioanal. Chem.* 2016, 408, 5089.
9. Olesik, J.W., Gray, P.J. *J. Anal. At. Spectrom.* 2012, 27, 1143.
10. Stephan, C. "Analysis of Iron Nanoparticles in Organic Solvents Used in the Semiconductor Industry Using Single Particle ICP-MS in Reaction Mode", PerkinElmer white paper 2015.

Consumables Used

Component	Description	Part Number
Pure-Grade Silver Standard	1000 mg/L, 125 mL	N9300171
Pure-Grade Gold Standard	1000 mg/L, 125 mL	N9303759
60 nm Gold Nanoparticles	60 nm, 2.60E+10, 25 mL	N8142303
Sample Uptake Tubing	Green/orange (0.38 mm id), PVC, flared, pack of 12	N07773113
Drain Tubing	Gray/gray (1.30 mm id), Santoprene, pack of 12	N0777444
Sample Tubes	Box of 500	B0193233 (15 mL) B0193234 (50 mL)



Cite this: *J. Anal. At. Spectrom.*, 2017, 32, 1101

An ICP-MS-based platform for release studies on silver-based nanomaterials

Isabel Abad-Alvaro,^{ID} Eduardo Bolea,^{ID} Francisco Laborda^{ID}* and Juan R. Castillo^{ID}

Engineered nanoparticles are being incorporated into different products and nanocomposites. The release of these nanoparticles, as well as other derived species, can subsequently lead to consumer and environmental exposure, being a relevant factor for risk assessment. The need for analytical methods for the detection, characterization and quantitation of these released species under relevant conditions becomes evident. In this work, a platform of methods based on the use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) is proposed to obtain information about the release of silver from silver based nanocoatings and nanocomposites. The sensitivity and element specific response of conventional ICP-MS is complemented by the use of the technique in single particle mode and in combination with ultrafiltration and asymmetrical flow field flow fractionation. By using these three methods, information about the release of both dissolved and particulate forms of silver, as well as the size of the nanoparticles, can be obtained under a variety of scenarios at concentrations down to $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ and a nanoparticle diameter of 5 nm. The feasibility of the platform was checked through a number of paradigmatic cases.

Received 13th February 2017
Accepted 20th April 2017

DOI: 10.1039/c7ja00059f

rs.c.li/jaas

1. Introduction

There is an increasing need for reliable analytical methods to get information related to engineered nanomaterials (ENMs).¹ The analytical information demanded by stakeholders, government agencies or researchers can range from the detection of nanoparticles to their characterization (size, shape, composition...) or the determination of their concentrations. ENMs are commonly being applied onto surfaces or incorporated into the matrixes of diverse materials; in such cases, additional information about the behaviour of the nanoparticle along its life cycle is also demanded.^{2,3} For solid products, this means to be able to monitor under diverse conditions the release of nanoparticles and/or dissolved components, and their interaction with other species, as well as the agglomeration/aggregation of the nanoparticles, or the modification of their surfaces. For inorganic nanomaterials, and depending on the release scenario, this can imply to cope with pristine or surface modified nanoparticles, as well as ionic or complexed species from the dissolution/oxidation of the original nanoparticles.

There is currently no single analytical method able to detect, characterize, and quantify nanoparticles in complex systems. Thus a multimethod approach is often required to obtain the

analytical information demanded.⁴ On the other hand, although a wide range of analytical techniques is available to study ENMs, limitations become evident when they are applied to the analysis of ENMs in complex samples, like those from environmental or biological systems, at realistic concentrations. Focusing on inorganic nanoparticles, the use of element-specific techniques is the most valuable tool for their detection. Due to the low detection limits attainable (down to ng L^{-1}), inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) is one of the most used techniques for detection, as well as for quantification, of the element/s present in the nanoparticles and the sample.⁵ Conventional ICP-MS is sensitive to the elements present in a sample that contains a nanomaterial, but it is not capable of providing any information about the physicochemical form of the element (*e.g.*, if present as dissolved species or as particulate), or any other information related to the nanoparticles (size, shape, aggregation...). When ICP-MS is combined with a previous separation step, like ultracentrifugation,⁶ ultrafiltration,⁷ cloud point⁸ or solid phase extraction,⁹ additional information about the released soluble species or the nanoparticles themselves can be obtained. On the other hand, the use of ICP-MS as an element-specific detector, on-line coupled to continuous separation techniques, like field flow fractionation (FFF)¹⁰ or hydrodynamic chromatography (HDC)¹¹ allows us to obtain information about the size of the nanoparticles separated, as well as quantitative information with respect to their size. Finally, when ICP-MS is used in single particle mode (SP-ICP-MS) it is possible to detect and quantify

Group of Analytical Spectroscopy and Sensors (GEAS), Institute of Environmental Sciences (IUCA), University of Zaragoza, Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza, Spain. E-mail: flaborda@unizar.es

dissolved *versus* particulate forms of the element in the same sample, and provide information about the mass of the element per particle and its size (if additional information about shape, composition and density of the particles is available), as well as about its number and mass concentration at levels below ng L^{-1} .¹²

Silver-based nanomaterials are used in a wide range of products due to their antimicrobial properties.¹³ The biocidal activity of these nanomaterials is based on the release of metallic silver nanoparticles, as well as silver(i) due to oxidation processes.¹⁴ Thus information about silver release cannot be limited to total concentrations and detailed information about both particulate and dissolved silver is needed.¹⁵ Although potentiometric measurements with ion selective electrodes can provide information about dissolved silver in ionic form (Ag^+), the use of ultrafiltration in combination with an atomic spectrometric technique like ICP-MS allows us to get information about silver species with size/molecular mass below the cut-off of the ultrafiltration membrane. In this context, small pore size membranes (1–5 kDa) are commonly used for the isolation of ionic silver and low molecular mass complexes.^{16,17} A number of continuous separation techniques coupled to ICP-MS, including reversed phase chromatography¹⁸ and capillary electrophoresis,¹⁹ have proved to be suitable for the simultaneous separation of silver(i), as well as silver nanoparticles, although the developed methods have been checked just as proofs-of-concept. Alternatively, asymmetrical flow field flow fractionation (AF4) allows us to obtain information about silver complexes not filtered through the permeable membrane of the separation channel, and silver nanoparticles.^{20,21} By using SP-ICP-MS, quantitative information about any form of dissolved and particulate silver species can be obtained, in addition to mass per particle/size information.²² Alternatively, AF4 has been coupled to ICP-MS working in single particle mode, both off-line²³ and on-line,²⁴ to differentiate silver nanoparticles with similar hydrodynamic sizes.

The aim of this work is to show, through a number of cases, the feasibility of a platform of analytical methods based on the use of ICP-MS to get different types of complementary information demanded to solve real problems related to release studies involving silver-based nanomaterials. The methods selected were: (i) ultrafiltration in combination with ICP-MS, for the determination of the dissolved fraction (smaller than the membrane pore size) of the element; (ii) single particle ICP-MS, to detect the presence of dissolved and particulate forms of the element; (iii) asymmetrical flow field flow fractionation (AF4) coupled to ICP-MS, to obtain information about the size of the nanoparticles and their mass concentration.

2. Experimental

2.1. Instrumentation

A Perkin-Elmer Sciex model ELAN DRC-e ICP mass spectrometer (Toronto, Canada) was used throughout. The sample introduction system consisted of a glass concentric Slurry nebulizer and a baffled cyclonic spray chamber (Glass

Table 1 Default instrumental and data acquisition parameters of ICP-MS

Instrumental parameters		
RF power	1200 W	
Argon gas flow rate		
Plasma	15 L min^{-1}	
Auxiliary	1.2 L min^{-1}	
Nebulizer	1.0 L min^{-1}	
Sample uptake rate	1.0 mL min^{-1}	
Data acquisition parameters		
Measuring mode	Standard	Single particle detection
Points per spectral peak	1	1
Sweeps	20	1
Dwell time	50 ms	5 ms
Readings per replicate	1	12 000
Settling time	3 ms	3 ms
Integration time	1 s	60 s
Isotopes monitored	¹⁰⁷ Ag ¹⁰⁹ Ag	

Expansion, Melbourne, Australia). Default instrumental and data acquisition parameters are listed in Table 1.

The AF4 system used was an AF2000 (Postnova Analytics, Landsberg, Germany). The trapezoidal channel was 27.5 cm in length and from 2 to 0.5 cm in width, and the spacer used for all the measurements was 350 mm thick. An ultrafiltration membrane of polyether sulfone (PES) (cut-off 5 kDa; PostnovaAnalytics) was used as the accumulation wall.

2.2. Chemicals

Diluted suspensions of silver nanoparticles were prepared from commercially available suspensions. Suspensions of mono-disperse silver nanoparticles of 10 (PlasmaChem, Berlin, Germany), 20 ± 5 , 40 ± 5 , 60 ± 5 and 100 ± 8 nm (Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland) were used. Dilutions were prepared in ultrapure water (Milli-Q Advantage, Molsheim, France) by accurately weighing (± 0.1 mg) aliquots of the stock suspensions after one minute sonication. After dilution and before each analysis, the suspensions were sonicated for one minute.

Aqueous silver solutions were prepared from a standard stock solution of 1000 mg L^{-1} (Panreac, Barcelona, Spain) by dilution in ultrapure water. The carrier used for AF4 separation was prepared by dissolving the corresponding mass of sodium dodecyl sulphate (SDS) (BioRad, California, USA) in ultrapure water.

2.3. Materials

Two types of nanomaterials were studied: glass slides coated with silver nanoparticles and structured SiO_2 -based nanocomposites containing a single layer of silver nanoparticles.

Glass slides (75×25 cm) were coated directly with silver nanoparticles by plasma vapour deposition, producing a porous nanostructured thin film. Structured nanocomposites ($\text{SiO}_2/\text{AgNPs}/\text{SiO}_2/\text{Si}$) consisted of squared plates (2×2 cm), where a single layer of AgNPs was embedded in a 90 nm thick silica layer by a combination of physical vapour deposition and plasma-enhanced chemical vapour deposition.

Table 2 AF4 cross-flow programs. Out flow: 1.00 mL min⁻¹

Program step	Time (min)	Cross-flow		
		Mode	mL min ⁻¹	
Injection/focusing Separation	Injection flow 0.2 mL min ⁻¹	5	1	
	Program 1 ^a	7	Constant	0.500
		1	Linear decay	0.500 to 0
	Program 2 ^b	2	Constant	0
		8	Constant	0.325
		1	Linear decay	0.325 to 0
		2	Constant	0

^a Nanocoated glass slides. ^b Structured SiO₂-based nanocomposites.

2.4. Procedures

2.4.1. Silver release experiments. Glass slides coated with silver nanoparticles were put into polyethylene tubes, filled with 50 mL of ultrapure water and placed in a rotary tumbler for 24 hours at 29 rpm and room temperature in darkness. After this period, the suspension from the release assays was transferred to a polyethylene tube and stored at 4 °C in darkness for analysis.

In the case of nanocomposites, plates containing the embedded silver nanoparticles were immersed in 6 mL of 10 mM 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid (MOPS) adjusted at pH 7.5 and shaken for 20 hours at room temperature in darkness. After removing the plate, algae (*Chlamydomonas reinhardtii*) were added to 3 mL of the solution to get a cell concentration of 6×10^5 cells per mL. After 1 hour of algae exposure under agitation and continuous illumination to avoid aggregation and ensure normal activity of algae, the medium was centrifuged and the supernatant was stored at 4 °C in darkness for analysis. Control plates with no embedded silver nanoparticles were also tested under the same conditions.

2.4.2. Ionic silver determination by ultrafiltration and ICP-MS. The dissolved silver in the suspensions was isolated by removing silver nanoparticles using Nanosep Pall centrifugal ultrafilter devices with cut-off membranes of 3 kDa (equivalent to a 2 nm hydrodynamic diameter). Ultrafilter devices were washed by centrifugation with 500 µL of ultrapure water twice. The second washing was kept to check for any potential contamination. Suspensions were sonicated for two minutes; 500 µL were subjected to centrifugation for 20 min at 9000 rpm and 20 °C (Thermo Heraeus Multifuge X1R, equipped with a fixed angle rotor for Eppendorf tubes, Waltham, USA). The ultrafiltrate (ca. 500 µL) was diluted up to 5 mL with ultrapure water prior to ICP-MS analysis.

2.4.3. Silver nanoparticle determination by AF4-ICP-MS. 100 µL of the suspensions were injected directly in the AF4 channel. A 0.01% (m/v) SDS solution prepared in ultrapure water adjusted to pH 8.0 was used as the carrier for separation and size characterization of silver nanoparticles. The cross-flow programs listed in Table 2 were used.

2.4.4. SP-ICP-MS measurements. The suspensions were diluted with ultrapure water, according to the silver concentration, and measured in single particle mode, using a dwell time of 5 ms with an integration time of 60 s (12 000 points).

The limited data acquisition rate of the instrument was overcome by monitoring two isotopes (¹⁰⁷Ag and ¹⁰⁹Ag) and using the settling time of the quadrupole to empty the buffer. Although the use of dwell times in the millisecond range may lead to record nanoparticle events as split events or as 2 or more nanoparticle events,²⁵ these effects can be minimized by appropriate data processing²⁶ or by selecting the adequate nanoparticle concentration.²⁷ For the samples analysed in this work, this was not a serious limitation because SP-ICP-MS measurements were used for screening purposes.

2.4.5. Silver determination by ICP-MS. Suspensions from the release studies with the glass slides were directly quantified, whereas suspensions from structured SiO₂-based nanocomposites were diluted 1 : 10 with ultrapure water prior to the ICP-MS analysis.

3. Results and discussion

3.1. Performance of the ICP-MS based methods

Although concentration is not a serious limitation in SP-ICP-MS, because number concentration detection limits of 1000 mL⁻¹ can be achieved with the conditions used in this work,²⁸ size detection limits are conditioned by the background levels and the occurrence of dissolved species of the element being measured. Size detection limits, calculated by using the 3σ criterion,²⁹ of 24 nm were achieved in ultrapure water, whereas they increased up to 40 nm in the presence of 135 ng L⁻¹ of Ag(I).

The achievable sensitivity of the ultrafiltration method combined with the determination of silver in the ultrafiltrate by ICP-MS depends on the volumes and dilution selected. Following the procedure describe in Section 2.4.2, detection limits of 100 ng L⁻¹ were calculated from the ultrafiltration blanks. By using the ultrafiltration membranes with a cut-off of 3 kDa, the ultrafiltrate can contain silver bearing nanoparticles below ca. 2 nm and silver(I) species below 3 kDa, including ionic Ag⁺ if no silver complexing ligands are present.

With respect to AF4-ICP-MS, nanoparticles from ca. 5 nm could be separated using the nanoparticle programs summarized in Table 2. Concentration detection limits were calculated as three times the standard deviation of the baseline divided by the sensitivity.²¹ 100 µL of a diluted suspension of 10-nm Ag NP standard (50 µg L⁻¹ silver concentration) was injected. The peak

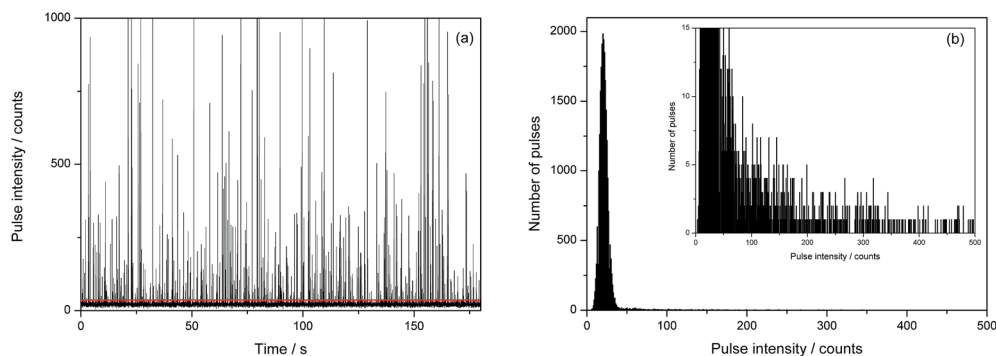


Fig. 1 Analysis of a suspension from a release assay with a silver nanocoated slide by SP-ICP-MS. (a) Time scan of the suspension containing dissolved and particulate silver. (b) Pulse intensity frequency histogram of data from (a). Red line: 3σ threshold.

height at the maximum of the ICP-MS fractogram obtained was used for calculations. A value of $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ was found, which corresponds to a concentration of $1.8 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ for silver nanoparticles of 10 nm.

3.2. Case studies

Two case studies were selected to show the feasibility of the proposed ICP-MS platform to obtain information about the fate and occurrence of different silver species released from a material containing silver nanoparticles in contact with an aqueous phase. Although the first case study is a paradigmatic example, involving the release of silver into ultrapure water, the second one corresponds to a typical ecotoxicological test, where the released silver interacts with algae, increasing the complexity of the medium.

3.2.1. Case 1: release of silver from a nanocoating. Once the release experiment described in Section 2.4.1 was finished, the glass slide was removed from the suspension and the remaining silver was dissolved with concentrated nitric acid. Silver was measured in this solution and in the suspension by ICP-MS to determine the total silver content of the coating and the total silver released respectively. The total silver content in the coating was $14.02 \pm 0.05 \mu\text{g}$, whereas $0.82 \pm 0.02 \mu\text{g}$ of Ag was found in the suspension, accounting for 5.8% of the total amount of silver in the coating.

Fig. 1a shows the time scan obtained from the diluted suspension analysed by SP-ICP-MS. The scan showed a baseline at intensities higher than the corresponding blank, indicating the occurrence of dissolved forms of silver. On the other hand, the presence of pulses over the 3σ threshold confirmed the occurrence of silver bearing particles. In SP-ICP-MS, it is

a common practice to process raw data from time scans by plotting the pulse intensity vs. the pulse intensity frequency, to obtain frequency histograms where the first distribution is due to the background and/or the presence of dissolved forms of the element measured and the second to the particles themselves.¹² Fig. 1b shows the corresponding histogram where just one tailed distribution was present, suggesting that most of the particulate silver corresponds to nanoparticles below the size detection limit²² (*ca.* 40 nm) which was affected by the presence of dissolved silver. Thus the occurrence of dissolved silver and small silver nanoparticles was prevented to take full advantage of SP-ICP-MS, being restricted to be used as a screening method to confirm the presence of both dissolved and particulate silver.

Because dissolved and particulate silver distributions were not fully resolved in the SP-ICP-MS histograms, quantification of both species was not possible. As an alternative, dissolved silver was fractionated by ultrafiltration and quantified by analysis of the ultrafiltrate by ICP-MS. Table 3 summarizes the corresponding results, confirming the qualitative information obtained by SP-ICP-MS about the occurrence of dissolved and particulate silver, which accounted for the 43% and 57%, respectively, of the total silver released. Due to the use of the lower pore size membrane available and the release medium used, the ultrafiltered silver could be associated with ionic silver (Ag^+), although the occurrence of very small nanoparticles below *ca.* 2 nm may not be discarded. In more complex media, the presence of dissolved $\text{Ag}(\text{i})$ forms different than Ag^+ , namely those complexed by different ligands, could invalidate the ultrafiltration procedure depending on the molecular mass of the complexes. In any case, the retention of the ionic silver in the membranes used can be considered negligible, with recoveries of $102 \pm 3\%$.³⁰

Table 3 Total and fractionated silver released from a nanocoating

Fraction	Technique	Ag (μg)	Ag vs. total released (%)
Total Ag	ICP-MS	14.02 ± 0.05	
Total Ag released ($\text{AgNP} + \text{Ag}^+$)	ICP-MS	0.82 ± 0.02	
Ag^+ released	UF + ICP-MS	0.35 ± 0.01	42.7 ± 1.1
AgNP released	AF4-ICP-MS	0.47 ± 0.03	57.4 ± 3.8

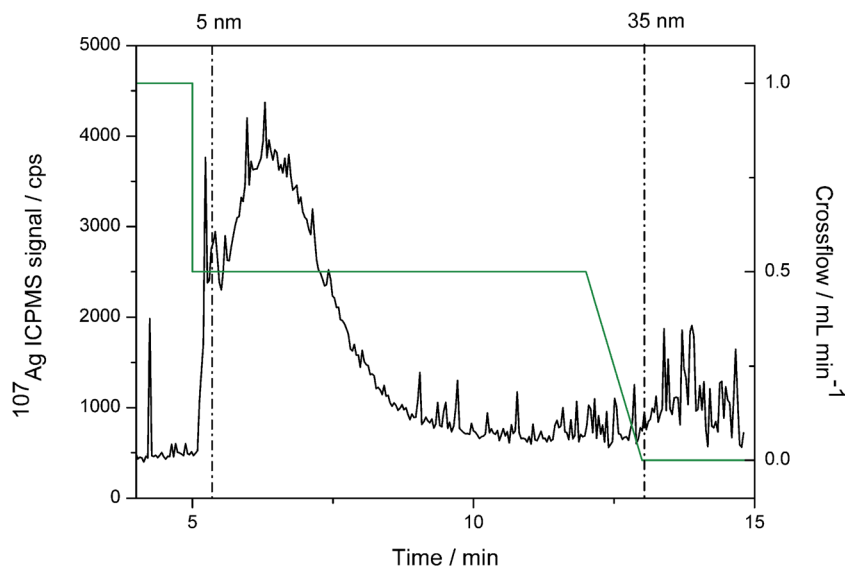


Fig. 2 AF4-ICP-MS fractogram of the suspension from a release assay with a silver nanocoated slide.

The limitations of SP-ICP-MS discussed above to characterize and quantify the silver nanoparticles in the suspension could be overcome by using AF4 coupled to ICP-MS. To this end, the suspension was analysed by AF4-ICP-MS under the conditions described in Section 2.4.3 and Table 2. Fig. 2 shows the corresponding fractogram. Size characterization was done by calibrating the AF4 system *vs.* Ag NP size standards. The following linear relationship between the logarithm of the retention ratio R (elution time corresponding to the void volume divided by the retention time for a given particle) and the logarithm of the diameter (d) in nanometres was experimentally found: $\log R = -0.4507 \log d + 0.3041$ ($r = 0.988$). According to this expression, the separation range using the cross-flow program summarized in Table 2 was 5–35 nm, and the size corresponding to the maximum of the peak was 7.0 ± 0.1 nm. This result justifies the failure of SP-ICP-MS to characterize the silver nanoparticles in the suspension.

The silver nanoparticles were quantified directly from the fractogram against ionic silver standards, injected in flow injection mode, by integrating the fractogram and the flow injection peaks. The silver present as nanoparticles in the suspension was 0.47 ± 0.03 μg , which is in agreement with the particulate fraction determined as the difference between the total silver released and the ultrafiltered silver (0.47 ± 0.02 μg). On the other hand, the recovery of the sample in the AF4 channel was $54 \pm 7\%$, in agreement with the measured content of particulate silver determined by ultrafiltration, which accounted for 57% of total silver, and the loss of dissolved silver through the accumulation wall of the channel.

3.2.2 Case 2: release of silver from a nanocomposite in an ecotoxicological test. Table 4 summarizes the results obtained for the content of total silver in the test media analysed. Different control samples, consisting of test media (10 mM MOPS) from tests performed with or without substrate and with or without algae, were also run (in the absence of silver

nanocomposites). Silver concentrations below 0.35 $\mu\text{g L}^{-1}$ were obtained in all cases. Test media from positive assays with silver nanocomposites but not exposed to algae showed higher silver concentrations than those exposed to algae. Because the difference was statistically significant, it suggested that part of the silver released was sorbed by the algae.

The test media were diluted 1 : 1000 and analysed by SP-ICP-MS. Fig. 3 shows the time scans corresponding to samples S2-110 and S2-111. As in the previous case, the occurrence of significant amounts of dissolved silver and the small size of the silver nanoparticles hindered us from fully exploiting the capabilities of SP-ICP-MS, just allowing to screen the release of silver bearing particles along with dissolved silver.

Test media from positive assays were ultrafiltered through 3 kDa membranes and analysed by ICP-MS, confirming the

Table 4 Total and ultrafiltered silver concentration in test media from ecotoxicological tests with *Chlamydomonas reinhardtii*

Sample	Substrate	Algae	Fraction	Silver concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Controls				
C1-000	✗	✗	Total	0.02 ± 0.02
C2-000	✗	✗	Total	0.17 ± 0.02
C3-001	✗	✓	Total	0.35 ± 0.03
C4-001	✗	✓	Total	0.25 ± 0.04
C5-100	✓	✗	Total	0.35 ± 0.03
C6-101	✓	✓	Total	0.06 ± 0.03
Substrates with Ag NPs				
S1-110	✓	✗	Total	28.35 ± 1.93
			Ultrafiltered	22.44 ± 1.83
S2-110	✓	✗	Total	37.30 ± 1.57
			Ultrafiltered	25.02 ± 1.93
S1-111	✓	✓	Total	17.30 ± 0.17
			Ultrafiltered	5.72 ± 0.08
S2-111	✓	✓	Total	17.55 ± 0.18
			Ultrafiltered	8.53 ± 0.43

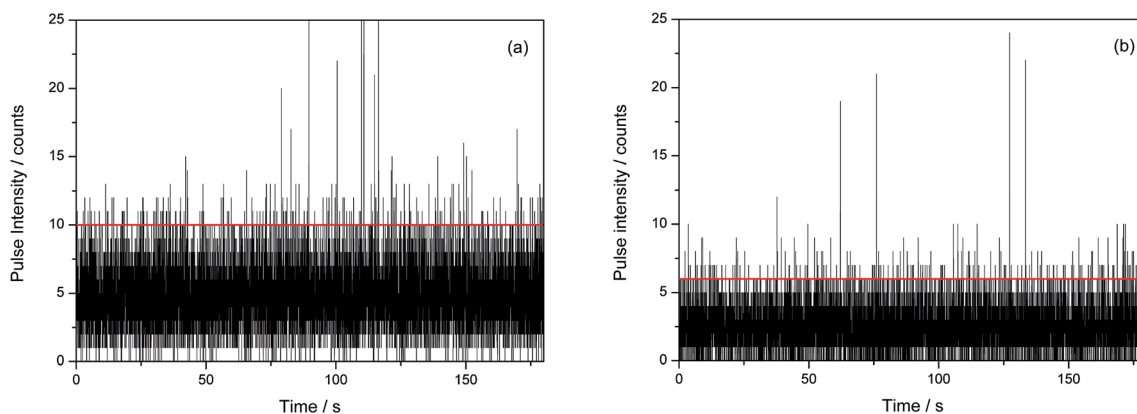


Fig. 3 Analysis of test media from ecotoxicological tests of Ag nanocomposites by SP-ICP-MS. (a) Time scans from test media in the absence (a) and presence of algae (b). Red line: 3σ threshold.

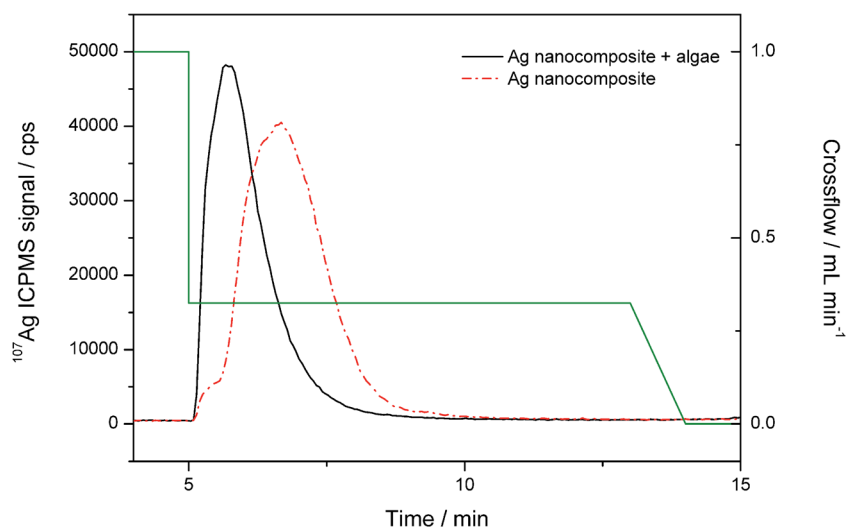


Fig. 4 AF4-ICP-MS fractograms of ecotoxicological test media of Ag nanocomposites in the absence and presence of algae.

occurrence of dissolved silver species below this molecular mass, as summarized in Table 4. Whereas in the assays performed without algae, the fraction of ultrafiltered silver accounted for $73 \pm 8\%$ of the total silver released, and it was reduced to $41 \pm 11\%$ in the presence of algae. In the absence of algae, the ultrafiltered silver could be associated with ionic silver, because MOPS does not complex silver(i); however, the complexation of silver(i) by algal exopolymeric substances (EPSs) could not be discarded in samples S1-111 and S2-111. In such cases, the occurrence of silver complexed by macromolecules over 3 kDa invalidates the fractionation of dissolved/particulate silver obtained by ultrafiltration, since both silver nanoparticles and silver-macromolecule complexes (>3 kDa) are retained by the membrane.

In comparison with ultrafiltration, AF4 provides a continuous separation of species with respect to their molecular mass/size. Fig. 4 shows the fractograms from samples S2-110 and S2-111, corresponding to ecotoxicological tests performed in the absence and presence of algae. In the first case, a peak partially

resolved from the void peak was obtained at 6.7 min, corresponding to 9.2 ± 0.3 nm by calibration against silver nanoparticles. However, in the presence of algae, silver was eluted at 5.7 min, suggesting the occurrence of smaller silver nanoparticles or silver(i) complexes with algal EPSs. Because of the low concentration of silver, the presence of silver nanoparticles could not be confirmed by monitoring the UV-visible absorption at *ca.* 400 nm due to their plasmon resonance, although the UV-visible spectrum at 5.7 min showed a shoulder at 256 nm, typical of organic matter.

To confirm the identity of the peaks, aliquots of the control sample C4-001 (MOPS test medium exposed to algae but not to the silver nanocomposite) were spiked with AgNO_3 and 10 nm silver nanoparticles. When the control sample containing algal EPSs was spiked with Ag(i) a peak at 5.9 min was observed, whereas it appeared at 6.6 min when spiked with silver nanoparticles (Fig. 5). Thus although the occurrence of silver nanoparticles below 10 nm could not be discarded, most of the silver released from the nanocomposite during the ecotoxicological

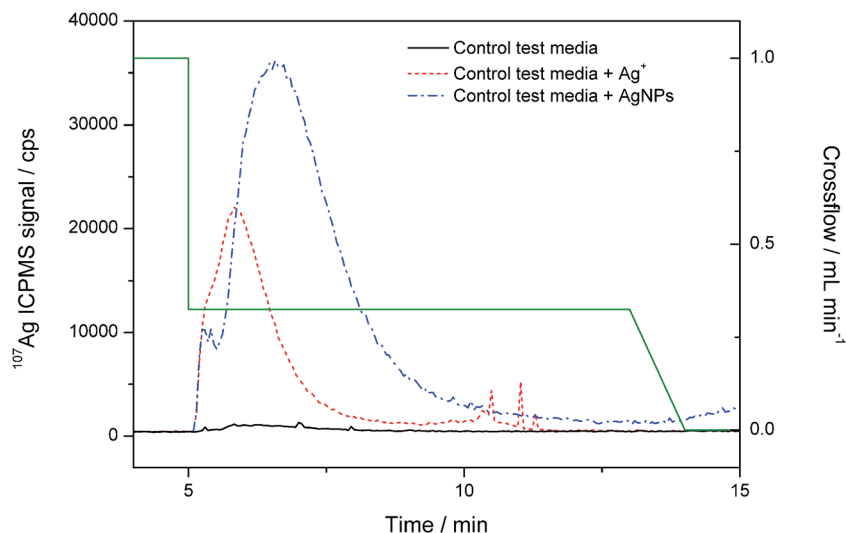


Fig. 5 AF4-ICP-MS fractograms of the control ecotoxicological test media exposed to algae but not to Ag nanocomposites, and spiked with $60 \mu\text{g L}^{-1}$ of silver as AgNO_3 and 10 nm silver nanoparticles.

test was found complexed with algal EPSs, which contributed to the oxidation of the formerly released silver nanoparticles.

4. Conclusions

Release studies of silver-based nanomaterials can involve the detection of both dissolved and particulate forms of silver, their quantification and the size characterization of the released particles. Depending on the complexity of the releasing medium, the dissolved silver can be found as ionic silver(I) (Ag^+) or complexed by ligands present in the medium. Whereas electron microscopy and light scattering techniques can cope with particulate forms at mg L^{-1} levels, for lower concentrations and for dissolved forms, other techniques and methods must be considered. The use of ICP-MS in single particle mode, as well as the combination of conventional ICP-MS with ultrafiltration and AF4, has proven to be a useful approach to obtain the maximum amount of information about the release of silver from a solid nanomaterial under different conditions. SP-ICP-MS could just be used as a screening tool because of the small size of the nanoparticles involved and the presence of dissolved forms of silver(I). More information (size, mass and number concentration) may be obtained when bigger particles are involved or more sensitive instruments are available. In any case, the occurrence of both dissolved and particulate forms of silver was confirmed in the two case studies presented. Ultrafiltration was useful when silver was present in ionic form and not complexed by ligands bigger than the ultrafiltration membrane cut-off, as in the ecotoxicological test case-study, where the amount of dissolved silver(I) was underestimated due to its complexation with algal extracellular polymeric substances. Finally, although AF4-ICP-MS does not provide information about dissolved species of low molecular weight (below the cut-off of the accumulation membrane), both size (hydrodynamic diameters) and quantitative information can be obtained for particles and macromolecular silver species, complementing the two other methods.

The proposed platform of analytical methods based on the use of ICP-MS is a competitive tool for detection, size characterization and quantitation of silver nanoparticles and dissolved silver(I) species, not only in release studies but in other samples containing these species. Although the presented case-studies involved silver, the platform is suitable for being applied to other elements and nanoparticles.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and the European Regional Development Fund, project CTQ2015-68094-C2-1-R (MINECO/FEDER). The authors would like to acknowledge the use of Servicio General de Apoyo a la Investigación-SAI, Universidad de Zaragoza, for ICP-MS measurements; N. Manninen and A. Cavaleiro (SEG-CEMUC, University of Coimbra), and S. Carvalho (GRF, University of Minho) for providing the silver coated samples; A. Pugliara, R. Carles and C. Bonafos (CEMES CNRS, University of Toulouse), K. Makasheva (LAPLACE, University of Toulouse) and E. Navarro (IPE, CSIC), for providing the culture media for ecotoxicological tests with silver nanocomposites.

References

- 1 C. Contado, *Front. Chem.*, 2015, **3**, 48.
- 2 A. Caballero-Guzman and B. Nowack, *Environ. Pollut.*, 2016, **213**, 502–517.
- 3 A. Mackevica and S. Foss Hansen, *Nanotoxicology*, 2016, 1–13.
- 4 F. Laborda, E. Bolea, G. Cepriá, M. T. Gómez, M. S. Jiménez, J. Pérez-Arantegui and J. R. Castillo, *Anal. Chim. Acta*, 2016, **904**, 10–32.
- 5 P. Krystek, A. Ulrich, C. C. Garcia, S. Manohar and R. Ritsema, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2011, **26**, 1701.
- 6 J. M. Unrine, B. P. Colman, A. J. Bone, A. P. Gondikas and C. W. Matson, *Environ. Sci. Technol.*, 2012, **46**, 6915–6924.

- 7 L. M. Furtado, M. E. Hoque, D. M. Mitrano, J. F. Ranville, B. Cheever, P. C. Frost, M. A. Xenopoulos, H. Hintelmann and C. D. Metcalfe, *Environ. Chem.*, 2014, **11**, 419–430.
- 8 J. Liu, J. Chao, R. Liu, Z. Tan, Y. Yin, Y. Wu and G. Jiang, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 6496–6502.
- 9 L. Li, K. Leopold and M. Schuster, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 9165–9167.
- 10 B. Meermann, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2015, **407**, 2665–2674.
- 11 A. Philippe and G. E. Schaumann, *PLoS One*, 2014, **9**, 1–9.
- 12 F. Laborda, E. Bolea and J. Jiménez-Lamana, *Trends Environ. Anal. Chem.*, 2016, **9**, 15–23.
- 13 G. Franci, A. Falanga, S. Galdiero, L. Palomba, M. Rai, G. Morelli and M. Galdiero, *Molecules*, 2015, **20**, 8856–8874.
- 14 N. Durán, M. Durán, M. B. de Jesus, A. B. Seabra, W. J. Fávaro and G. Nakazato, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, 2016, **12**, 789–799.
- 15 B. Reidy, A. Haase, A. Luch, K. A. Dawson and I. Lynch, *Materials*, 2013, **6**, 2295–2350.
- 16 Y.-J. Lee, J. Kim, J. Oh, S. Bae, S. Lee, I. S. Hong and S. H. Kim, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2011, **31**, 155–159.
- 17 A. Ozaki, E. Kishi, T. Ooshima, A. Hase and Y. Kawamura, *Food Addit. Contam., Part A*, 2016, **33**, 1490–1498.
- 18 J. Soto-Alvaredo, M. Montes-Bayón and J. Bettmer, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 1316–1321.
- 19 B. Franze and C. Engelhard, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 5713–5720.
- 20 M. E. Hoque, K. Khosravi, K. Newman and C. D. Metcalfe, *J. Chromatogr. A*, 2012, **1233**, 109–115.
- 21 E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, F. Laborda and J. R. Castillo, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **401**, 2723–2732.
- 22 F. Laborda, J. Jiménez-Lamana, E. Bolea and J. R. Castillo, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2011, **26**, 1362–1371.
- 23 W.-C. Lee, B.-T. Lee, S. Lee, Y. S. Hwang, E. Jo, I.-C. Eom, S.-W. Lee and S.-O. Kim, *Microchem. J.*, 2016, **129**, 219–230.
- 24 K. A. Huynh, E. Siska, E. Heithmar, S. Tadjiki and S. A. Pergantis, *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 4909–4916.
- 25 I. Strengé and C. Engelhard, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2015, **31**, 135–144.
- 26 J. Liu, K. E. Murphy, R. I. MacCuspie and M. R. Winchester, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 3405–3414.
- 27 I. Abad-Álvarez, E. Peña-Vázquez, E. Bolea, P. Bermejo-Barrera, J. R. Castillo and F. Laborda, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 5089–5097.
- 28 F. Laborda, J. Jiménez-Lamana, E. Bolea and J. R. Castillo, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2013, **28**, 1220–1232.
- 29 S. Lee, X. Bi, R. B. Reed, J. F. Ranville, P. Herckes and P. Westerhoff, *Environ. Sci. Technol.*, 2014, **48**, 10291–10300.
- 30 E. Caballero-Díaz, C. Pfeiffer, L. Kastl, P. Rivera-Gil, B. Simonet, M. Valcárcel, J. Jiménez-Lamana, F. Laborda and W. J. Parak, *Part. Part. Syst. Charact.*, 2013, **30**, 1079–1085.

VI. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Woodrow Wilson International Center for Scholars. Nanotechnology consumer product inventory. Available at <http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/>. Project of Emerging Nanotechnologies, Washington, DC.
- [2] A.G. Howard, On the challenge of quantifying man-made nanoparticles in the aquatic environment, *J. Environ. Monit.* 12 (2010) 135–42.
- [3] A. Nel, T. Xia, L. Mädler, N. Li, Toxic potential of materials at the nanolevel, *Science*. 311 (2006) 622–7.
- [4] A. Maynard, R.J. Aitken, T. Butz, V. Colvin, K. Donaldson, G. Oberdörster, M.A. Philbert, J. Ryan, A. Seaton, V. Stone, others, Safe handling of nanotechnology, *Nature*. 444 (2006) 267.
- [5] M.R. Wiesner, G. V. Lowry, P. Alvarez, D. Dionysiou, P. Biswas, Assessing the Risks of Manufactured Nanomaterials, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 4336–4345.
- [6] European Commission, 2011/696/EU: Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial, *Off. J. Eur. Communities: Legis.*, 2011, 275, 38–40.
- [7] T. Linsinger, G. Roebben, D. Gilliland, Requirements on measurements for the implementation of the European Commission definition of the term “nanomaterial,” 2012.
- [8] H. Rauscher, K. Rasmussen, B. Sokull-Klüttgen, Regulatory Aspects of Nanomaterials in the EU, *Chemie Ing. Tech.* (2016) 224–231.
- [9] European Commission. SCENIHR/002/05. The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies. 2006.
- [10] Environmental Protection Agency. EPA 100/B-07/001. Nanotechnology White Paper, 2007.
- [11] M. Auffan, J. Rose, M.R. Wiesner, J. Y. Bottero, Chemical stability of metallic nanoparticles: a parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro, *Environ. Pollut.* 157 (2009) 1127–33.
- [12] R.F. Domingos, M.A. Baalousha, Y. Ju-Nam, M.M. Reid, N. Tufenkji, J.R. Lead,

- G.G. Leppard, K.J. Wilkinson, Characterizing manufactured nanoparticles in the environment: Multimethod determination of particle sizes, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 7277–7284.
- [13] L. Calzolari, D. Gilliland, F. Rossi, Measuring nanoparticles size distribution in food and consumer products : a review, *Food Addit. Contam.* (2012) 37–41.
- [14] O.D. Hendrickson, I. V. Safenkova, A. V. Zherdev, B.B. Dzantiev, V.O. Popov, Methods of detection and identification of manufactured nanoparticles, *Biophysics.* 56 (2012) 961–986.
- [15] A. Lapresta-Fernández, A. Salinas-Castillo, S. Anderson de la Llana, J.M. Costa-Fernández, S. Domínguez-Meister, R. Cecchini, L.F. Capitán-Vallvey, M.C. Moreno-Bondi, M. P. Marco, J.C. Sánchez-López, I.S. Anderson, A General Perspective of the Characterization and Quantification of Nanoparticles: Imaging, Spectroscopic, and Separation Techniques, *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* 39 (2014) 423–458.
- [16] O. A. Sadik, N. Du, V. Kariuki, V. Okello, V. Bushlyar, Current and emerging technologies for the characterization of nanomaterials, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2 (2014) 1707–1716.
- [17] T.M. Benn, P. Westerhoff, Nanoparticle Silver Released into Water from Commercially Available Sock Fabrics, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 4133–4139.
- [18] S.K. Brar, M. Verma, Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques, *TrAC Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 4–17.
- [19] K. Tiede, A.B. A Boxall, S.P. Tear, J. Lewis, H. David, M. Hasselov, Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment, *Food Addit. Contam. Part A.* 25 (2008) 795–821.
- [20] M.D. Montaña, G. V Lowry, F. von der Kammer, J. Blue, J.F. Ranville, Current status and future direction for examining engineered nanoparticles in natural systems, *Environ. Chem.* 11 (2014) 351–366.
- [21] P. Krystek, A. Ulrich, C.C. Garcia, S. Manohar, R. Ritsema, Application of plasma spectrometry for the analysis of engineered nanoparticles in suspensions and products, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 1701–1721.
- [22] F. Von Der Kammer, S. Legros, T. Hofmann, E.H. Larsen, K. Loeschner, Separation and characterization of nanoparticles in complex food and environmental samples by field-flow fractionation, *TrAC Trends Anal. Chem.*

- 30 (2011) 425–436.
- [23] K. Tiede, A.B. A. Boxall, D. Tiede, S.P. Tear, H. David, J. 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.* 24 (2009) 964.
- [24] A. I. López-Lorente, B.M. Simonet, M. Valcárcel, Electrophoretic methods for the analysis of nanoparticles, *TrAC Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 58–71.
- [25] F. Scholz, The electrochemistry of particles, droplets, and vesicles – the present situation and future tasks, *J. Solid State Electrochem.* 15 (2011) 1699–1702.
- [26] Olga S. Ivanova, Francis P. Zamborini, Size – Dependent Electrochemical Oxidation of Silver Nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 70–72.
- [27] K. Tschulik, R.G. Palgrave, C. Batchelor-McAuley, R.G. Compton, “Sticky electrodes” for the detection of silver nanoparticles, *Nanotechnology.* 24 (2013) 295502.
- [28] N. V. Rees, Electrochemical insight from nanoparticle collisions with electrodes: A mini-review, *Electrochem. Commun.* 43 (2014) 83–86.
- [29] W. Cheng, R.G. Compton, Electrochemical detection of nanoparticles by “nano-impact” methods, *TrAC Trends Anal. Chem.* 58 (2014) 79–89.
- [30] E.J.E. Stuart, Y. G. Zhou, N. V. Rees, R.G. Compton, Determining unknown concentrations of nanoparticles: the particle-impact electrochemistry of nickel and silver, *RSC Adv.* 2 (2012) 6879.
- [31] F. Laborda, E. Bolea, G. Cepriá, M.T. Gómez, M.S. Jiménez, J. Pérez-Arantegui, J.R. Castillo, Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples, *Anal. Chim. Acta.* 904 (2016) 10–32.
- [32] P. Luo, I. Morrison, A. Dudkiewicz, K. Tiede, E. Boyes, P. O’Toole, S. Park, A.B. Boxall, Visualization and characterization of engineered nanoparticles in complex environmental and food matrices using atmospheric scanning electron microscopy, *J. Microsc.* 250 (2013) 32–41.
- [33] R.I. MacCuspie, K. Rogers, M. Patra, Z. Suo, A.J. Allen, M.N. Martin, V. A Hackley, Challenges for physical characterization of silver nanoparticles under pristine and environmentally relevant conditions., *J. Environ. Monit.*

- 13 (2011) 1212–26.
- [34] J. A. Gallego-Urrea, J. Tuoriniemi, M. Hassellöv, Applications of particle-tracking analysis to the determination of size distributions and concentrations of nanoparticles in environmental, biological and food samples, *TrAC Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 473–483.
- [35] S. Lee, X. Bi, R.B. Reed, J.F. Ranville, P. Herckes, P. Westerhoff, Nanoparticle size detection limits by single particle ICP-MS for 40 elements, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 10291–300.
- [36] F. Laborda, E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: a powerful tool for nanoanalysis, *Anal. Chem.* 86 (2014) 2270–8.
- [37] A. J. Bednar, A. R. Poda, D.M. Mitrano, A. J. Kennedy, E.P. Gray, J.F. Ranville, C. A. Hayes, F.H. Crocker, Comparison of On-Line Detectors for Field Flow Fractionation Analysis of Nanomaterials, *Talanta.* (2012).
- [38] B. Franze, C. Engelhard, Fast separation, characterization, and speciation of gold and silver nanoparticles and their ionic counterparts with micellar electrokinetic chromatography coupled to ICP-MS, *Anal. Chem.* 86 (2014) 5713–5720.
- [39] K. Tiede, A.B. A. Boxall, X. Wang, D. Gore, D. Tiede, M. Baxter, H. David, S.P. Tear, J. Lewis, Application of hydrodynamic chromatography-ICP-MS to investigate the fate of silver nanoparticles in activated sludge, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 1149.
- [40] J. Ellison, C. Batchelor-Mcauley, K. Tschulik, R.G. Compton, The use of cylindrical micro-wire electrodes for nano-impact experiments; Facilitating the sub-picomolar detection of single nanoparticles, *Sensors Actuators, B Chem.* 200 (2014) 47–52.
- [41] A.J. Bone, B.P. Colman, A.P. Gondikas, K.M. Newton, K.H. Harrold, R.M. Cory, J.M. Unrine, S.J. Klaine, C.W. Matson, R.T. Di Giulio, Biotic and Abiotic Interactions in Aquatic Microcosms Determine Fate and Toxicity of Ag Nanoparticles: Part 2–Toxicity and Ag Speciation, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 6925–6933.
- [42] L.M. Furtado, M.E. Hoque, D.M. Mitrano, J.F. Ranville, B. Cheever, P.C. Frost, M. A. Xenopoulos, H. Hintelmann, C.D. Metcalfe, The persistence and transformation of silver nanoparticles in littoral lake mesocosms monitored

- using various analytical techniques, *Environ. Chem.* 11 (2014) 419.
- [43] J. Liu, J. Chao, R. Liu, Z. Tan, Y. Yin, Y. Wu, G. Jiang, Cloud Point Extraction as an Advantageous Preconcentration Approach for Analysis of Trace Silver Nanoparticles in Environmental Waters, *Evaluation*. 81 (2009) 6496–6502.
- [44] L. Li, K. Leopold, M. Schuster, Effective and selective extraction of noble metal nanoparticles from environmental water through a noncovalent reversible reaction on an ionic exchange resin, *Chem. Commun.* 48 (2012) 9165.
- [45] B. Meermann, Field-flow fractionation coupled to ICP-MS: separation at the nanoscale, previous and recent application trends, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 2665–74.
- [46] A. Philippe, G.E. Schaumann, Evaluation of hydrodynamic chromatography coupled with uv-visible, fluorescence and inductively coupled plasma mass spectrometry detectors for sizing and quantifying colloids in environmental media, *PLoS One*. 9 (2014) 1–9.
- [47] F. Laborda, E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry for the analysis of inorganic engineered nanoparticles in environmental samples, *Trends Environ. Anal. Chem.* 9 (2016) 15–23.
- [48] Y. Echegoyen, C. Nerín, Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers., *Food Chem. Toxicol.* 62 (2013) 16–22.
- [49] D.M. Mitrano, E.K. Leshner, A. Bednar, J. Monserud, C.P. Higgins, J.F. Ranville, Detecting nanoparticulate silver using single-particle inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Environ. Toxicol. Chem.* 31 (2012) 115–121.
- [50] J. Tuoriniemi, G. Cornelis, M. Hassellöv, Size Discrimination and Detection Capabilities of Single-Particle ICPMS for Environmental Analysis of Silver Nanoparticles, *Anal. Chem.* 84 (2012) 3965–72.
- [51] R. Peters, Z. Herrera-Rivera, A. Undas, M. van der Lee, H. Marvin, H. Bouwmeester, S. Weigel, Single particle ICP-MS combined with a data evaluation tool as a routine technique for the analysis of nanoparticles in complex matrices, *J. Anal. At. Spectrom.* 30 (2015) 1274–1285.
- [52] S. V. Jenkins, H. Qu, T. Mudalige, T.M. Ingle, R. Wang, F. Wang, P.C. Howard, J. Chen, Y. Zhang, Rapid determination of plasmonic nanoparticle agglomeration status in blood, *Biomaterials*. 51 (2015) 226–237.

- [53] W.C. Lee, B.T. Lee, S. Lee, Y.S. Hwang, E. Jo, I.C. Eom, S.W. Lee, S.O. Kim, Optimisation, evaluation and application of asymmetrical flow field-flow fractionation with single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS) to characterise silver nanoparticles in environmental media, *Microchem. J.* (2016).
- [54] K.A. Huynh, E. Siska, E. Heithmar, S. Tadjiki, S.A. Pergantis, Detection and Quantification of Silver Nanoparticles at Environmentally Relevant Concentrations Using Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation Online with Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 88 (2016) 4909–4916.
- [55] S.K. Misra, A. Dybowska, D. Berhanu, S.N. Luoma, E. Valsami-Jones, The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies, *Sci. Total Environ.* 438 (2012) 225–232.
- [56] J.Y. Liu, R.H. Hurt, Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 2169–2175.
- [57] K. A. Huynh, K.L. Chen, Aggregation Kinetics of Citrate and Polyvinylpyrrolidone Coated Silver Nanoparticles in Monovalent and Divalent Electrolyte Solutions, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2012) 5564–5571.
- [58] R. Ma, C. Levard, S.M. Marinakos, Y. Cheng, J. Liu, F.M. Michel, G.E. Brown, G. V Lowry, Size-controlled dissolution of organic-coated silver nanoparticles, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 752–759.
- [59] E. Navarro, F. Piccapietra, B. Wagner, F. Marconi, R. Kaegi, N. Odzak, L. Sigg, R. Behra, Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 8959–64.
- [60] D.A. Ladner, M. Steele, A. Weir, K. Hristovski, P. Westerhoff, Functionalized nanoparticle interactions with polymeric membranes, *J. Hazard. Mater.* 211–212 (2012) 288–295.
- [61] F. Van Koetsem, S. Verstraete, E. Wallaert, K. Verbeken, P. Van der Meeren, J. Rinklebe, G. Du Laing, Use of filtration techniques to study environmental fate of engineered metallic nanoparticles: Factors affecting filter performance, *J. Hazard. Mater.* 322 (2017) 105–117.
- [62] C. Degueldre, P.Y. Favarger, Colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectroscopy: a feasibility study, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 217 (2003) 137–142.

- [63] E.M. Heithmar, S.A. Pergantis, *Characterizing Concentrations and Size Distributions of Metal-Containing Nanoparticles in Waste Water*, 2010.
- [64] F. Laborda, J. Jiménez-Lamana, E. Bolea, J.R. Castillo, Selective identification, characterization and determination of dissolved silver (I) and silver nanoparticles based on single particle detection by inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 1362.
- [65] H.E. Pace, N.J. Rogers, C. Jarolimek, V. A Coleman, C.P. Higgins, J.F. Ranville, Determining transport efficiency for the purpose of counting and sizing nanoparticles via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 83 (2011) 9361–9.
- [66] A. Hineman, C. Stephan, Effect of dwell time on single particle inductively coupled plasma mass spectrometry data acquisition quality, *J. Anal. At. Spectrom.* 29 (2014) 1252.
- [67] J.W. Olesik, P.J. Gray, Considerations for measurement of individual nanoparticles or microparticles by ICP-MS: determination of the number of particles and the analyte mass in each particle, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1143.
- [68] C. Degueldre, P. Y. Favarger, Thorium colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Talanta.* 62 (2004) 1051–4.
- [69] C. Degueldre, P.Y. Favarger, C. Bitea, Zirconia colloid analysis by single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 518 (2004) 137–142.
- [70] C. Degueldre, P.Y. Favarger, R. Rossé, S. Wold, Uranium colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Talanta.* 68 (2006) 623–8.
- [71] C. Degueldre, P. Favarger, S. Wold, Gold colloid analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry in a single particle mode, *Anal. Chim. Acta.* 555 (2006) 263–268.
- [72] M. Schimpf, K. Caldwell, J.C. Giddings, *Field-Flow Fractionation Handbook*, John Wiley & Sons. (2000).
- [73] E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, F. Laborda, J.R. Castillo, Size characterization and quantification of silver nanoparticles by asymmetric flow field-flow fractionation coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 2723–2732.

- [74] L. Kvitek, A. Panacek, J. Soukupova, M. Kolar, R. Vecerova, R. Prucek, M. Holecova, R. Zboril, Effect of Surfactants and Polymers on Stability and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles (NPs), *J. Phys. Chem. C*. 112 (2008) 5825–5834.
- [75] N.S. Tulse, A.B. Stefaniak, M.E. Vance, K. Rogers, S. Mwilu, R.F. LeBouf, D. Schwegler-Berry, R. Willis, T.A. Thomas, L.C. Marr, Characterization of silver nanoparticles in selected consumer products and its relevance for predicting children's potential exposures, *Int. J. Hyg. Environ. Health*. 218 (2015) 345–357.
- [76] A.P. Gondikas, F. Von Der Kammer, R.B. Reed, S. Wagner, J.F. Ranville, T. Hofmann, Release of TiO₂ nanoparticles from sunscreens into surface waters: A one-year survey at the old danube recreational lake, *Environ. Sci. Technol*. 48 (2014) 5415–5422.
- [77] L. Li, G. Hartmann, M. Döblinger, M. Schuster, Quantification of nanoscale silver particles removal and release from municipal wastewater treatment plants in Germany, *Environ. Sci. Technol*. 47 (2013) 7317–7323.
- [78] J.M. Unrine, B.P. Colman, A.J. Bone, A.P. Gondikas, C.W. Matson, Biotic and abiotic interactions in aquatic microcosms determine fate and toxicity of ag nanoparticles. Part 1. Aggregation and dissolution, *Environ. Sci. Technol*. 46 (2012) 6915–6924.
- [79] X. Chen, H.J. Schluesener, Nanosilver: A nanoparticle in medical application, *Toxicol. Lett*. 176 (2008) 1–12.
- [80] K. Vasilev, J. Cook, H.J. Griesser, Antibacterial surfaces for biomedical devices, *Expert Rev. Med. Devices*. 6 (2009) 553–567.
- [81] D. Campoccia, L. Montanaro, C.R. Arciola, A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces, *Biomaterials*. 34 (2013) 8533–8554.
- [82] J.R. Morones, J.L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J.B. Kouri, J.T. Ramírez, M.J. Yacaman, The bactericidal effect of silver nanoparticles, *Nanotechnology*. 16 (2005) 2346–2353.
- [83] I. Sonodi, B. Salopek-Sonodi, Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria., *J. Colloid Interface Sci*. 275 (2004) 177–82.
- [84] J.S. Kim, E. Kuk, K.N. Yu, J. H. Kim, S.J. Park, H.J. Lee, S.H. Kim, Y.K. Park, Y.H.

- Park, C.Y. Hwang, Y.K. Kim, Y.S. Lee, D.H. Jeong, M.H. Cho, Antimicrobial effects of silver nanoparticles, *Nanomedicine*. 3 (2007) 95–101.
- [85] S.W.P. Wijnhoven, W.J.G.M. Peijnenburg, C.A. Herberths, W.I. Hagens, A.G. Oomen, E.H.W. Heugens, B. Roszek, J. Bisschops, I. Gosens, D. Van De Meent, others, Nano-silver a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment, *Nanotoxicology*. 3 (2009) 109–138.
- [86] X. Yang, W. Li, Z. Li, Y. Wei, W. Huang, Depth profiles of Ag nanoparticles in silicate glass, *Appl. Phys. A*. 90 (2007) 465–467.
- [87] V.S.K. Chakravadhanula, C. Kübel, T. Hrkac, V. Zaporojtchenko, T. Strunskus, F. Faupel, L. Kienle, Surface segregation in TiO₂-based nanocomposite thin films, *Nanotechnology*. 23 (2012) 495701.
- [88] A. Parveen, T. Ali, M. Wahid, S. Rao, Facile biological approach for immobilization, physicochemical characterization and antibacterial activity of noble metals nanocomposites, *Mater. Lett.* 148 (2015) 86–90.
- [89] N.K. Manninen, S. V. Calderon, I. Carvalho, M. Henriques, A. Cavaleiro, S. Carvalho, Antibacterial Ag/a-C nanocomposite coatings: The influence of nano-galvanic a-C and Ag couples on Ag ionization rates, *Appl. Surf. Sci.* 377 (2016) 283–291.
- [90] S.M. Marques, P. Costa, S. Lanceros-mendez, S. Carvalho, Ti_{1-x}Ag_x electrodes deposited on polymer based sensors, 604 (2016) 55–62.
- [91] N.K. Manninen, J.C. Oliveira, S. Carvalho, A. Cavaleiro, Characterization of surface Ag nanoparticles in nanocomposite a-C:Ag coatings by grazing incidence X-ray diffraction at sub-critical angles of incidence, *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* 122 (2016) 1–5.
- [92] C. Burda, X. Chen, R. Narayanan, M.A. El-Sayed, *Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes*, 2005.
- [93] E. Caballero-Díaz, C. Pfeiffer, L. Kastl, P. Rivera-Gil, B. Simonet, M. Valcárcel, J. Jiménez-Lamana, F. Laborda, W.J. Parak, The toxicity of silver nanoparticles depends on their uptake by cells and thus on their surface chemistry, *Part. Part. Syst. Charact.* 30 (2013) 1079–1085.
- [94] F. Laborda, J. Jiménez-Lamana, E. Bolea, J.R. Castillo, Critical considerations for the determination of nanoparticle number concentrations, size and number size distributions by single particle ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 28 (2013) 1220–1232.

- [95] J.M. Zook, S.E. Long, D. Cleveland, C.L.A. Geronimo, R.I. MacCuspie, Measuring silver nanoparticle dissolution in complex biological and environmental matrices using UV-visible absorbance, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 1993–2002.
- [96] E. Navarro, F. Piccapietra, B. Wagner, F. Marconi, R. Kaegi, N. Odzak, L. Sigg, R. Behra, Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 8959–64.
- [97] D. He, J.J. Dorantes-Aranda, T.D. Waite, Silver Nanoparticle - Algae Interactions: Oxidative Dissolution, Reactive Oxygen Species Generation and Synergistic Toxic Effects, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 8731–8.
- [98] A.J. Miao, K. a Schwehr, C. Xu, S.-J. Zhang, Z. Luo, A. Quigg, P.H. Santschi, The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances., *Environ. Pollut.* 157 (2009) 3034–41.
- [99] S.S. Merchant, S.E. Prochnik, O. Vallon, E.H. Harris, J. Karpowicz, G.B. Witman, A. Terry, A. Salamov, L.K. Fritz-laylin, L. Maréchal-Drouard, W.F. Marshall and others, The *Chlamydomonas* Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions, *Science.* 318 (2010) 245–250.
- [100] E. Navarro, B. Wagner, N. Odzak, L. Sigg, R. Behra, Effects of Differently Coated Silver Nanoparticles on the Photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 8041–8047.
- [101] S.N. Sørensen, C. Engelbrekt, H.-C.H. Lützhøft, J. Jiménez-Lamana, J.S. Noori, F.A. Alatraktchi, C.G. Delgado, V.I. Slaveykova, A. Baun, A Multimethod Approach for Investigating Algal Toxicity of Platinum Nanoparticles, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 10635-10643.
- [102] N. von Moos, V.B. Koman, C. Santschi, O.J.F. Martin, L. Maurizi, A. Jayaprakash, P. Bowen, V.I. Slaveykova, Pro-oxidant effects of nano-TiO₂ on *Chlamydomonas reinhardtii* during short-term exposure, *RSC Adv.* 6 (2016) 115271-115283.
- [103] C. Santschi, N. von Moos, V.B. Koman, V.I. Slaveykova, P. Bowen, O.J.F. Martin, Non-invasive continuous monitoring of pro-oxidant effects of engineered nanoparticles on aquatic microorganisms, *J. Nanobiotechnology.* 15 (2017) 19.
- [104] F. Piccapietra, C.G. Allué, L. Sigg, R. Behra, Intracellular silver accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* upon exposure to carbonate coated silver

- nanoparticles and silver nitrate, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 7390–7397.
- [105] B. Despax, C. Saulou, P. Raynaud, L. Datas, M. Mercier-Bonin, Transmission electron microscopy for elucidating the impact of silver-based treatments (ionic silver versus nanosilver-containing coating) on the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Nanotechnology*. 22 (2011) 175101.
- [106] C. Beer, R. Foldbjerg, Y. Hayashi, D.S. Sutherland, H. Autrup, Toxicity of silver nanoparticles—nanoparticle or silver ion?, *Toxicol. Lett.* 208 (2011) 286-292.
- [107] N. Alissawi, T. Peter, T. Strunskus, C. Ebbert, G. Grundmeier, F. Faupel, Plasma-polymerized HMDSO coatings to adjust the silver ion release properties of Ag/polymer nanocomposites, *J. Nanoparticle Res.* 15 (2013).
- [108] N. Alissawi, V. Zaporojtchenko, T. Strunskus, I. Kocabas, V.S.K. Chakravadhanula, L. Kienle, D. Garbe-Schönberg, F. Faupel, Effect of gold alloying on stability of silver nanoparticles and control of silver ion release from vapor-deposited Ag-Au/polytetrafluoroethylene nanocomposites, *Gold Bull.* 46 (2013) 3–11.
- [109] A. Pugliara, C. Bonafos, R. Carles, B. Despax, K. Makasheva, Controlled elaboration of large-area plasmonic substrates by plasma process, *Mater. Res. Express.* 2 (2015) 65005.
- [110] P. Verdugo, A.L. Alldredge, F. Azam, D.L. Kirchman, U. Passow, P.H. Santschi, The oceanic gel phase: A bridge in the DOM-POM continuum, *Mar. Chem.* 92 (2004) 67–85.
- [111] J. Castaing, Uso de arcillas en alimentación animal. XIV Curso de Especialización Avances en nutrición y alimentación animal. Expoaviga98
- [112] F. Bergaya, G. Lagaly, General introduction: clays, clayminerals, and clay science. In: F. Bergaya, G. Lagaly (Eds.), *Handbook of Clay Science. Part A. Fundamentals, Development in Clay Science.* Elsevier (2013) 1-19.
- [113] A. López-Galindo, C. Viseras, P. Cerezo, Compositional, technical and safety specifications of clays to be used as pharmaceutical and cosmetic products, *Appl. Clay Sci.* 36 (2007) 51–63.
- [114] S.P. Singh, L.Q. Ma, W.G. Harris, Heavy metal interactions with phosphatic clay: sorption and desorption behavior, *J. Environ. Qual.* 30 (2001) 1961–1968.
- [115] N. Krikorian, D. F. Martin, Extraction of selected heavy metals using modified clays. *J Environ Sci Health Part A.* 40 (2005) 601–8.

- [116] W.J. Chen, L.C. Hsiao, K.K.Y. Chen, Metal desorption from copper(II)/nickel(II)-spiked kaolin as a soil component using plant-derived saponin biosurfactant, *Process Biochem.* 43 (2008) 488–498.
- [117] H.H. Murray. *Applied Clay Mineralogy Occurrences, Processing and Application of Kaolins, Bentonites, Palygorskite-Sepiolite, and Common Clays.* *Developments in Clay Science*, vol.2, Elsevier (2006) 1-6.
- [118] S. Maisanaba, S. Pichardo, M. Puerto, D. Gutiérrez-Praena, A.M. Cameán, A. Jos, Toxicological evaluation of clay minerals and derived nanocomposites: A review, *Environ. Res.* 138 (2015) 233–254.
- [119] D. Jordá-Beneyto, M., Ortuño, N., Devis, A., Aucejo, S., Puerto, M., Gutiérrez-Praena, A. Houtman, J., Pichardo, S., Maisanaba, S., Jos, Use of nanoclay platelets in food packaging materials: technical and cytotoxicity approach, *Food Addit. Contam. A.* 31, (2014) 354 – 364.
- [120] S. Maisanaba, M. Puerto, S. Pichardo, M. Jordá, F.J. Moreno, S. Aucejo, Á. Jos, In vitro toxicological assessment of clays for their use in food packaging applications, *Food Chem. Toxicol.* 57 (2013) 266–275.
- [121] L.B. Williams, D.W. Metge, D.D. Eberl, R.W. Harvey, What makes a clay antibacterial ?, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 3768-3773.
- [122] F.G. Ferris, W.S. Fyfe, T.J. Beveridge, Bacteria as nucleation sites for authigenic minerals in a metal-contaminated lake sediment, *Chem. Geol.* 63 (1987) 225–232.
- [123] G. Carja, Y. Kameshima, A. Nakajima, C. Dranca, K. Okada, Nanosized silver-anionic clay matrix as nanostructured ensembles with antimicrobial activity, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 34 (2009) 534–539.
- [124] G.S. Gupta, A. Dhawan, R. Shanker, Montmorillonite clay alters toxicity of silver nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) eleutheroembryo, *Chemosphere.* 163 (2016) 242–251.
- [125] P.C. Lombardo, A.L. Poli, L.F. Castro, J.R. Perussi, C.C. Schmitt, Photochemical Deposition of Silver Nanoparticles on Clays and Exploring Their Antibacterial Activity, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 8 (2016) 21640–21647.
- [126] F.B. Karel, A.S. Koparal, E. Kaynak, Development of silver ion doped antibacterial clays and investigation of their antibacterial activity, *Adv. Mater. Sci. Eng.* 2015 (2015).
- [127] J.W. Rhim, L.F. Wang, Preparation and characterization of carrageenan-based

- nanocomposite films reinforced with clay mineral and silver nanoparticles, *Appl. Clay Sci.* 97–98 (2014) 174–181.
- [128] J.C. Wei, Y.T. Yen, Y.T. Wang, S. Hsu, J.J. Lin, Enhancing silver nanoparticle and antimicrobial efficacy by the exfoliated clay nanoplatelets, *RSC Adv.* 3 (2013) 7392.
- [129] B. Roy, P. Bharali, B.K. Konwar, N. Karak, Silver-embedded modified hyperbranched epoxy/clay nanocomposites as antibacterial materials, *Bioresour. Technol.* 127 (2013) 175–180.
- [130] K. Burridge, J. Johnston, T. Borrmann, Silver nanoparticle–clay composites, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 734–742.
- [131] R. Patakfalvi, A. Oszkó, I. Dékány, Synthesis and characterization of silver nanoparticle/kaolinite composites, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 220 (2003) 45–50.
- [132] L.F. Giraldo, P. Camilo, T. Kyu, Incorporation of silver in montmorillonite-type phyllosilicates as potential antibacterial material, *Curr. Opin. Chem. Eng.* 11 (2016) 7–13.
- [133] A. Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. and Lonvaud, A. *Handbook of enology. Volumes 1 and 2.* John Wiley & Sons (2006).
- [134] J. Bakker, P. Bridle, S.J. Bellworth, H.P. Reader, S.J. Watkins, Effect of Sulphur Dioxide and Must Extraction on Colour, Phenolic Composition and Sensor y Quality of Red Table Wine, *J. Sci. Food Agric.* 78 (1998) 297-307.
- [135] H. Vally, N.L.A. Misso, V. Madan, Clinical effects of sulphite additives, *Clin. Exp. Allergy.* 39 (2009) 1643–1651.
- [136] Unión Europea. Reglamento (CE) N° 606/2009 de la Comisión de 10 de julio de 2009 que fija determinadas disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) N° 479/2008 del Consejo en lo relativo a las categorías de productos vinícolas, las prácticas enológicas y las restricciones aplicables.
- [137] OIV (2015). *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et de moûts.* Paris: OIV
- [138] M.C. Santos, C. Nunes, J.A. Saraiva, M.A. Coimbra, Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: Review of their potentialities and limitations, *Eur. Food Res. Technol.* 234 (2012) 1–12.
- [139] R.F. Guerrero, E. Cantos-Villar, Demonstrating the efficiency of sulphur

- dioxide replacements in wine: A parameter review, *Trends Food Sci. Technol.* 42 (2015) 27–43.
- [140] A. García-Ruiz, J. Crespo, J.M. López-de-Luzuriaga, M.E. Olmos, M. Monge, M.P. Rodríguez-Álvaro, P.J. Martín-Álvarez, B. Bartolome, M. V. Moreno-Arribas, Novel biocompatible silver nanoparticles for controlling the growth of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in wines, *Food Control.* 50 (2015) 613–619.
- [141] T. Garde-Cerdán, R. López, P. Garijo, L. González-Arenzana, A.R. Gutiérrez, I. López-Alfaro, P. Santamaría, Application of colloidal silver versus sulfur dioxide during vinification and storage of Tempranillo red wines, *Aust. J. Grape Wine Res.* 20 (2014) 51–61.
- [142] P.M. Izquierdo-Cañas, E. García-Romero, B. Huertas-Nebreda, S. Gómez-Alonso, Colloidal silver complex as an alternative to sulphur dioxide in winemaking, *Food Control.* 23 (2012) 73–81.
- [143] OIV/OENO 145/2009. Adición al vino de cloruro de plata, (2009).
- [144] E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, F. Laborda, I. Abad-Álvaro, C. Bladé, L. Arola, J.R. Castillo, Detection and characterization of silver nanoparticles and dissolved species of silver in culture medium and cells by AsFIFFF-UV-Vis-ICPMS: application to nanotoxicity tests, *Analyst.* 139 (2014) 914–22.
- [145] G.A. Sotiriou, A. Meyer, J.T.N. Knijnenburg, S. Panke, S.E. Pratsinis, Quantifying the Origin of Released Ag⁺ Ions from Nanosilver, *Langmuir.* 28 (2012) 15929–15936.
- [146] C. Levard, B.C. Reinsch, F.M. Michel, C. Oumahi, G. V. Lowry, G.E. Brown, Sulfidation processes of PVP-coated silver nanoparticles in aqueous solution: Impact on dissolution rate, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 5260–5266.
- [147] O. Choi, T.E. Clevenger, B. Deng, R.Y. Surampalli, L. Ross, Z. Hu, Role of sulfide and ligand strength in controlling nanosilver toxicity, *Water Res.* 43 (2009) 1879–86.
- [148] M.A. Latorre, M. Fondevila, Nanopartículas de plata como aditivo en alimentación animal, *Doss. Aliment. Anim.* 10 (2010) 38–41.
- [149] Diario Oficial de la Unión Europea, Reglamento (CE) N° 1831/2003 Del Parlamento Europeo y del consejo de 22 de septiembre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal, (2003) L268/36.
- [150] P.W.J.J. Van Der Wielen, S. Biesterveld, H. Hofstra, B. A P. Urlings, F. Van, Role

- of Volatile Fatty Acids in Development of the Cecal Microflora in Broiler Chickens during Growth Role of Volatile Fatty Acids in Development of the Cecal Microflora in Broiler Chickens during Growth, 66 (2000) 6–11.
- [151] J. A. Byrd, B.M. Hargis, D.J. Caldwell, R.H. Bailey, K.L. Herron, J.L. McReynolds, R.L. Brewer, R.C. Anderson, K.M. Bischoff, T.R. Callaway, L.F. Kubena, Effect of lactic acid administration in the drinking water during preslaughter feed withdrawal on Salmonella and Campylobacter contamination of broilers, *Poult. Sci.* 80 (2001) 278–283.
- [152] P. Chaveerach, D. a Keuzenkamp, L.J. A Lipman, F. Van Knapen, Effect of organic acids in drinking water for young broilers on Campylobacter infection, volatile fatty acid production, gut microflora and histological cell changes, *Poult. Sci.* 83 (2004) 330–334.
- [153] J.P. Griggs, J.P. Jacob, Alternatives to antibiotics for organic poultry production, *J. Appl. Poult. Res.* 14 (2005) 750–756.
- [154] M. Gunal, G. Yayli, O. Kaya, N. Karahan, O. Sulak., The effects of antibiotic growth promoter, probiotic or organic acid supplementation on performance, intestinal microflora and tissue of broiler, *Int. J. Poult. Sci.* 5 (2006) 149–155.
- [155] M. Murphy Cowan, Plant Products as Antimicrobial agents, *Clin. Microbiol. Rev.* 12 (1999) 564–582.
- [156] P.J. Naughton, L.L. Mikkelsen, B.B. Jensen, Effects of Nondigestible Oligosaccharides on Salmonella enterica Serovar Typhimurium and Nonpathogenic Escherichia coli in the Pig Small Intestine In Vitro, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 3391–3395.
- [157] G.E. Gardiner, P.G. Casey, G. Casey, P.B. Lynch, P.G. Lawlor, C. Hill, G.F. Fitzgerald, C. Stanton, R.P. Ross, Relative Ability of Orally Administered Lactobacillus murinus to Predominate and Persist in the Porcine Gastrointestinal Tract, *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004) 1895–1906.
- [158] L.D. Franco, M. Fondevila, M.B. Lobera, C. Castrillo, Effect of combinations of organic acids in weaned pig diets on microbial species, *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 89 (2005) 88–93.
- [159] C.N. Lok, C.M. Ho, R. Chen, Q.Y. He, W.Y. Yu, H. Sun, P.K.H. Tam, J.F. Chiu, C.M. Che, Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities., *J. Biol. Inorg. Chem.* 12 (2007) 527–34.

- [160] B.S. Atiyeh, M. Costagliola, S.N. Hayek, S.A. Dibo, Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature, *Burns*. 33 (2007) 139–148.
- [161] L. Pineda, A. Chwalibog, E. Sawosz, C. Lauridsen, R. Engberg, J. Elnif, A. Hotowy, F. Sawosz, Y. Gao, A. Ali, H.S. Moghaddam, Effect of silver nanoparticles on growth performance, metabolism and microbial profile of broiler chickens, *Arch. Anim. Nutr.* 66 (2012) 416–429.
- [162] M. Gholami-Ahangaran, N. Zia-Jahromi, Nanosilver effects on growth parameters in experimental aflatoxicosis in broiler chickens, *Toxicol. Ind. Health*. 29 (2013) 121–125.
- [163] M. Fondevila, R. Herrer, M.C. Casallas, L. Abecia, J.J. Duchá, Silver nanoparticles as a potential antimicrobial additive for weaned pigs, *Anim. Feed Sci. Technol.* 150 (2009) 259–269.
- [164] G.S. Martynkova, M. Valaskova, Antimicrobial Nanocomposites Based on Natural Modified Materials: A Review of Carbons and Clays, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 14 (2014) 673–693.
- [165] S. Boisen, J. A. Fernández, Prediction of the total tract digestibility of energy in feedstuffs and pig diets by in vitro analyses, *Anim. Feed Sci. Technol.* 68 (1997) 277–286.
- [166] J.W. Card, B.A. Magnuson, Letter To The Editor: Characterization parameters for studies on food and food-related nanomaterials, *J. Food Sci.* 74 (2009) vi–vii.
- [167] V. Stone, B. Nowack, A. Baun, N. van den Brink, F. Von Der Kammer, M. Dusinska, R. Handy, S. Hankin, M. Hassellöv, E. Joner, T.F. Fernandes, Nanomaterials for environmental studies: classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterisation, *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 1745–54.
- [168] S. Gupta Mukherjee, N. O’Clonadh, A. Casey, G. Chambers, Comparative in vitro cytotoxicity study of silver nanoparticle on two mammalian cell lines, *Toxicol. Vitr.* 26 (2012) 238–251.
- [169] C. Marambio-Jones, E.M. V. Hoek, A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment, *J. Nanoparticle Res.* 12 (2010) 1531–1551.
- [170] S. Kittler, C. Greulich, J. Diendorf, M. Köller, M. Epple, Toxicity of silver

- nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions, *Chem. Mater.* 22 (2010) 4548–4554.
- [171] S. Grosse, L. Evje, T. Syversen, Silver nanoparticle-induced cytotoxicity in rat brain endothelial cell culture, *Toxicol. Vitro.* 27 (2013) 305–313.
- [172] S.M. Hussain, K.L. Hess, J.M. Gearhart, K.T. Geiss, J.J. Schlager, In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells, *Toxicol. Vitro.* 19 (2005) 975–983.
- [173] A. Lankoff, W.J. Sandberg, A. Wegierek-Ciuk, H. Lisowska, M. Refsnes, B. Sartowska, P.E. Schwarze, S. Meczynska-Wielgosz, M. Wojewodzka, M. Kruszewski, The effect of agglomeration state of silver and titanium dioxide nanoparticles on cellular response of HepG2, A549 and THP-1 cells, *Toxicol. Lett.* 208 (2012) 197–213.
- [174] B. Schmidt, K. Loeschner, N. Hadrup, A. Mortensen, J.J. Sloth, C.B. Koch, E.H. Larsen, Quantitative characterization of gold nanoparticles by field-flow fractionation coupled online with light scattering detection and inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 83 (2011) 2461–8.
- [175] J. Jiménez-Lamana, F. Laborda, E. Bolea, I. Abad-Álvaro, J.R. Castillo, J. Bianga, M. He, K. Bierla, S. Mounicou, L. Ouerdane, S. Gaillet, J.-M. Rouanet, J. Szpunar, An insight into silver nanoparticles bioavailability in rats., *Metallomics.* 6 (2014) 2242–9.
- [176] A.D. Hawkins, A.J. Bednar, J. V. Cizdziel, K. Bu, J.A. Steevens, K.L. Willett, Identification of silver nanoparticles in *Pimephales promelas* gastrointestinal tract and gill tissues using flow field flow fractionation ICP-MS, *RSC Adv.* 4 (2014) 41277–41280.
- [177] J.G. Coleman, A.J. Kennedy, A.J. Bednar, J.F. Ranville, J.G. Laird, A.R. Harmon, C. A. Hayes, E.P. Gray, C.P. Higgins, G. Lotufo, J.A. Steevens, Comparing the effects of nanosilver size and coating variations on bioavailability, internalization, and elimination, using *Lumbriculus variegatus*., *Environ. Toxicol. Chem.* 32 (2013) 2069–77.
- [178] A R. Poda, A J. Bednar, A J. Kennedy, A. Harmon, M. Hull, D.M. Mitrano, J.F. Ranville, J. Steevens, Characterization of silver nanoparticles using flow-field flow fractionation interfaced to inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 4219–4225.
- [179] P. M-M, W. Somchue, J. Shiowatana, A. Siripinyanond, Flow field-flow fractionation for particle size characterization of selenium nanoparticles

- incubated in gastrointestinal conditions, *Food Res. Int.* 57 (2014) 208–209.
- [180] D. Bartczak, P. Vincent, H. Goenaga-Infante, Determination of size and number-based concentration of silica nanoparticles in a complex biological matrix by online techniques, *Anal. Chem.* 87 (2015) 5482–5485.
- [181] P. Krystek, K. Kettler, B. van der Wagt, W.H. de Jong, Exploring influences on the cellular uptake of medium-sized silver nanoparticles into THP-1 cells, *Microchem. J.* 120 (2015) 45–50.
- [182] J.A. Nóbrega, M.C. Santos, R.A. de Sousa, S. Cadore, R.M. Barnes, M. Tatro, Sample preparation in alkaline media, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 61 (2006) 465–495.
- [183] M.D. Montaña, H.R. Badiei, S. Bazargan, J.F. Ranville, Improvements in the detection and characterization of engineered nanoparticles using spICP-MS with microsecond dwell times, *Environ. Sci. Nano.* 1 (2014) 338.
- [184] A. Praetorius, A. Gundlach-Graham, E. Goldberg, W. Fabienke, J. Navratilova, A. Gondikas, R. Kaegi, D. Günther, T. Hofmann, F. von der Kammer, Single-particle multi-element fingerprinting (spMEF) using inductively-coupled plasma time-of-flight mass spectrometry (ICP-TOFMS) to identify engineered nanoparticles against the elevated natural background in soils, *Environ. Sci. Nano.* (2017).
- [185] M. Hadioui, C. Peyrot, K.J. Wilkinson, Improvements to single particle ICPMS by the online coupling of ion exchange resins., *Anal. Chem.* 86 (2014) 4668–74.
- [186] F. Laborda, J. Medrano, J.R. Castillo, Quality of quantitative and semiquantitative results in inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 16 (2001) 732–738.
- [187] F. Laborda, J. Medrano, J.R. Castillo, Influence of the number of calibration points on the quality of results in inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 1434.
- [188] M.P. Rayman, The importance of selenium to human health., *Lancet (London, England)*. 356 (2000) 233–41.
- [189] M.P. Rayman, The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up?, *Br. J. Nutr.* 92 (2004) 557–573.
- [190] G.N. Schrauzer, Selenium yeast: composition, quality, analysis, and safety, *Pure Appl. Chem.* 78 (2006) 105–109.

- [191] S.J. Fairweather-Tait, Y. Bao, M.R. Broadley, R. Collings, D. Ford, J.E. Hesketh, R. Hurst, Selenium in human health and disease, *Antioxid Redox Signal.* 14 (2011) 1337–1383.
- [192] D.G. Barceloux, Selenium, *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 37 (1999) 145–172.
- [193] L. Wu, Review of 15 years of research on ecotoxicology and remediation of land contaminated by agricultural drainage sediment rich in selenium, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57 (2004) 257–269.
- [194] K. Bierla, J. Szpunar, A. Yiannikouris, R. Lobinski, Comprehensive speciation of selenium in selenium-rich yeast, *Trends Anal. Chem.* 41 (2012) 122–132.
- [195] S.G. Casal, J. Far, K. Bierla, L. Ouerdane, J. Szpunar, Study of the Se-containing metabolomes in Se-rich yeast by size-exclusion-cation-exchange HPLC with the parallel ICP MS and electrospray orbital ion trap detection, *Metallomics.* 2 (2010) 535–548.
- [196] J. Far, H. Preud'homme, R. Lobinski, Detection and identification of hydrophilic selenium compounds in selenium-rich yeast by size exclusion-microbore normal-phase HPLC with the on-line ICP-MS and electrospray Q-TOF-MS detection, *Anal. Chim. Acta.* 657 (2010) 175–190.
- [197] M. Dernovics, R. Lobinski, Characterization of the selenocysteine-containing metabolome in selenium-rich yeast: Part 1. Identification of new species by multi-dimensional liquid chromatography with parallel ICP-MS and electrospray Q-TOFMS/MS detection, *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 72–83.
- [198] L. Tastet, D. Schaumlöffel, B. Bouyssiere, R. Lobinski, Identification of selenium-containing proteins in selenium-rich yeast aqueous extract by 2D gel electrophoresis, nanoHPLC-ICP MS and nanoHPLC-ESI MS/MS, *Talanta.* 75 (2008) 1140–1145.
- [199] L. Tastet, D. Schaumlöffel, R. Lobinski, ICP-MS-assisted proteomics approach to the identification of selenium-containing proteins in selenium-rich yeast, *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 309–317.
- [200] M. Dernovics, J. Far, R. Lobinski, Identification of anionic selenium species in Se-rich yeast by electrospray QTOF MS/MS and hybrid linear ion trap/orbitrap MSn, *Metallomics.* 1 (2009) 317–329.
- [201] M. Shakibaie, H. Forootanfar, Y. Golkari, T. Mohammadi-Khorsand, M.R. eza Shakibaie, Anti-biofilm activity of biogenic selenium nanoparticles and selenium dioxide against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*,

- Pseudomonas aeruginosa*, and *Proteus mirabilis*, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 29 (2015) 235–241.
- [202] E. Cremonini, E. Zonaro, M. Donini, S. Lampis, M. Boaretti, S. Dusi, P. Melotti, M.M. Lleo, G. Vallini, Biogenic selenium nanoparticles: characterization, antimicrobial activity and effects on human dendritic cells and fibroblasts, *Microb. Biotechnol.* 9 (2016) 758–771.
- [203] S. Lampis, E. Zonaro, C. Bertolini, P. Bernardi, C.S. Butler, G. Vallini, Delayed formation of zero-valent selenium nanoparticles by *Bacillus mycoides* SeITE01 as a consequence of selenite reduction under aerobic conditions., *Microb. Cell Fact.* 13 (2014) 35.
- [204] S. Lampis, E. Zonaro, C. Bertolini, D. Cecconi, F. Monti, M. Micaroni, R.J. Turner, C.S. Butler, G. Vallini, Selenite biotransformation and detoxification by *Stenotrophomonas maltophilia* SeITE02: Novel clues on the route to bacterial biogenesis of selenium nanoparticles, *J. Hazard. Mater.* 324 (2017) 3–14.
- [205] T.W. May, R.H. Wiedmeyer, M. Chaudhary-Webb, D.C. Paschal, W.C. Elliott, H.P. Hopkins, A M. Ghazi, B.C. Ting, I. Romieu, O. Vicente, E. Pelfort, L. Martinez, R. Olsina, E. Marchevsky, H.P. Chen, D.T. Miller, J.C. Morrow, A table of polyatomic interferences in ICP-MS, *At. Spectrosc.* 19 (1998) 150–155.
- [206] S.D. Tanner, V.I. Baranov, D.R. Bandura, Reaction cells and collision cells for ICP-MS: A tutorial review, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 57 (2002) 1361–1452.
- [207] I. Feldmann, N. Jakubowski, C. Thomas, D. Stuewer, Application of a hexapole collision and reaction cell in ICP-MS Part II: Analytical figures of merit and first applications, *Fresenius. J. Anal. Chem.* 365 (1999) 422–428.
- [208] J.M. Marchante-Gayon, C. Thomas, I. Feldmann, N. Jakubowski, Comparison of different nebulisers and chromatographic techniques for the speciation of selenium in nutritional commercial supplements by hexapole collision and reaction cell ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 15 (2000) 1093–1102.
- [209] B. Jackson, A. Liba, J. Nelson, Advantages of reaction cell ICP-MS on doubly charged interferences for arsenic and selenium analysis in foods, *J. Anal. At. Spectrom.* 2015 (2014) 1–5.
- [210] J.J. Sloth, E.H. Larsen, The application of inductively coupled plasma dynamic reaction cell mass spectrometry for measurement of selenium isotopes,

- isotope ratios and chromatographic detection of selenoamino acids, *J. Anal. At. Spectrom.* 15 (2000) 669–672.
- [211] Z. Ni, Y. Liu, M. Qu, Determination of 5 natural selenium species in selenium-enriched bamboo shoots using LC-ICP-MS, *Food Sci. Biotechnol.* 23 (2014) 1049–1053.
- [212] B. Hattendorf, D. Günther, Strategies for method development for an inductively coupled plasma mass spectrometer with bandpass reaction cell. Approaches with different reaction gases for the determination of selenium, *Spectrochim. Acta - Part B.* 58 (2003) 1–13.
- [213] I. Abad-Álvarez, E. Peña-Vázquez, E. Bolea, P. Bermejo-Barrera, J.R. Castillo, F. Laborda, Evaluation of number concentration quantification by single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry: microsecond vs. millisecond dwell times, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 5089–5097.
- [214] S. Dwivedi, A.A. AlKhedhairy, M. Ahamed, J. Musarrat, Biomimetic Synthesis of Selenium Nanospheres by Bacterial Strain JS-11 and Its Role as a Biosensor for Nanotoxicity Assessment: A Novel Se-Bioassay, *PLoS One.* 8 (2013) 1–10.
- [215] Z.H. Lin, C.R.C. Wang, Evidence on the size-dependent absorption spectral evolution of selenium nanoparticles, *Mater. Chem. Phys.* 92 (2005) 591–594.