

# Estudios de liberación de plata a partir de nanocompuestos de interés alimentario para producción animal

---

Trabajo de fin de grado

NURIA TEIXIDÓ BACHES

Junio 2019, Zaragoza

Directora Dra. María Teresa Gómez Cotín

Departamento de Química Analítica



Departamento de  
Química Analítica  
Universidad Zaragoza

## Acrónimos

- **NPs** – Nanopartículas
- **AgNPs** – Nanopartículas de plata
- **AAS**– Espectroscopía de Absorción Atómica
- **FAAS** – Espectroscopía de Absorción Atómica en Llama
- **TEM** - Microscopía Electrónica de Transmisión
- **DLS** – Dispersión Dinámica de la Luz
- **ICP-MS** – Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo
- **GFAAS** – Espectroscopía de Absorción Atómica con Horno de Grafito
- **UF** – Ultrafiltración
- **FFF** – Fraccionamiento en Flujo mediante Campos
- **HDC** – Cromatografía Hidrodinámica
- **BFS** – Suero Fetal Bovino
- **Tris** - Tris(hidroximetil)aminometano

## RESUMEN

El trabajo se basa en la importancia de las nanopartículas de plata como alternativa al uso de antibióticos en la producción animal, debido a sus propiedades antimicrobianas. Se realizan estudios con un tipo de nanomaterial denominado C3 que es un sistema caolín-plata. Esta muestra contiene nanopartículas de plata y plata iónica. Se determina el contenido total de plata en la muestra. Asimismo se estudia la posible liberación de plata en distintos medios acuosos y celulares, para conocer la cantidad de plata que puede llegar a los animales al ser suministrada en su alimentación. Los estudios de lixiviación se llevan a cabo a distintos tiempos para comprobar cuánto tarda la plata en ser liberada en el interior del animal. Además se aplican procesos de ultrafiltración para separar las distintas especies de plata. Se utiliza la Espectroscopía de Absorción Atómica en Llama (FAAS) como sistema de detección. Los resultados indican que la mayor parte de la plata presente se encuentra en forma iónica, que el contenido de plata total es de 0,84% y que la cantidad de plata liberada en agua es de alrededor de un 44%.

## ABSTRACT

The paper is based on the importance of silver nanoparticles as an alternative to the use of antibiotics in animal production, due to its antimicrobial properties. Studies are carried out with a nanomaterial called C3, which is a Kaolin-silver system. This sample contains silver nanoparticles and ionic silver. The total silver content in the sample is determined. Likewise, the possible release of silver in different aqueous and cellular medium is studied, in order to know the amount of silver that can reach the animals when it is supplied in their diet. The leaching studies are carried out at different times to test how long it takes the silver to be released inside the animal. In addition, ultrafiltration processes are applied to separate the different species of silver. Flame Atomic Absorption Spectroscopy (FAAS) is used as detection system. The results indicate that most of the silver present is in ionic form, that the total silver content is 0.84% and that the amount of silver released in water is around 44%.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. USOS Y APLICACIONES DE LAS NANOPARTÍCULAS.....	1
1.2. LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN PRODUCCIÓN ANIMAL. ....	1
1.3. TÉCNICAS INSTRUMENTALES PARA DETERMINAR NPs.....	2
1.4. TÉCNICAS DE SEPARACIÓN DE NPs .....	3
<b>2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO</b> .....	<b>4</b>
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>5</b>
3.1. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS .....	5
3.1.1. Instrumentación .....	5
3.1.2. Aparatos .....	5
3.1.3. Reactivos, disoluciones patrón y muestras. ....	5
3.2. METODOLOGÍA: Preparación de las muestras. ....	6
3.2.1. Estudios preliminares sobre patrones de AgNPs. ....	7
3.2.2. Estudios preliminares sobre la muestra: pH y Conductividad. ....	7
3.2.3. Preparación de la muestra para determinar el contenido total de Ag. ....	8
3.2.4. Preparación de la muestra para determinar la cantidad de Ag liberada en agua. 8	
3.2.5. Preparación de la muestra para determinar la cantidad de Ag liberada en ácido nítrico (HNO <sub>3</sub> ). ....	9
3.2.6. Preparación de la muestra para determinar la cantidad de Ag liberada en un medio de Fosfatos (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ).....	9
3.2.7. Preparación de la muestra para determinar la cantidad de Ag liberada en tris(hidroximetil)aminometano (tampón pH 8) .....	9
3.2.8. Preparación de la muestra para determinar la Ag liberada en distintos medios de cultivo celular .....	10
3.2.9. Separación de Ag iónica y Nanopartículas por Ultrafiltración (UF).....	10
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>11</b>
4.1. ESTUDIO ESTADISTICO DE LA FORMA DE PREPARACION DE LOS SISTEMAS DE CALIBRACIÓN .....	11
4.2. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LOS PATRONES DE AgNPs.....	12
4.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE Ag.....	15
4.5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE Ag LIBERADA EN AGUA.....	15

4.6.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE Ag LIBERADA EN ÁCIDO NÍTRICO .....	16
4.7.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE Ag LIBERADA EN MEDIO FOSFATOS.....	17
4.8.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE Ag LIBERADA EN MEDIO TRIS.....	18
4.9.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE Ag LIBERADA EN MEDIOS DE CULTIVO .....	20
4.10.	SEPARACIÓN DE PLATA IÓNICA Y DE NANOPARTICULAS DE PLATA MEDIANTE ULTRAFILTRACIÓN .....	20
5.	CONCLUSIONES .....	22
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	23
Anexo I	.....	26
Anexo II	.....	27
Anexo III	.....	28

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. USOS Y APLICACIONES DE LAS NANOPARTÍCULAS.

Las nanopartículas (NPs) son partículas de tamaños inferiores a 100 nanómetros al menos en dos de sus dimensiones, y pueden ser sintetizadas a partir de distintos materiales, como pueden ser los metales. Es muy frecuente el uso de las nanopartículas en áreas muy distintas, como en la alimentaria, la textil, por ejemplo en ropa deportiva para evitar malos olores, en cosméticos y cremas solares, para bloquear los rayos UV, así como en la industria de la construcción y la automotriz. En el campo de la medicina, se utilizan las NPs como transporte de fármacos, ya que mejoran la selectividad, haciendo que se localice mejor el sitio de acción donde debe liberarse el medicamento y también pueden usarse como biosensores para detectar anomalías en el organismo.<sup>1,2</sup>

Distintos metales y compuestos metálicos como plata, oro, hierro, zinc u óxido de titanio son la base de nanopartículas que se utilizan en distintas aplicaciones. Las nanopartículas de metal llamaron la atención en la medicina para su uso en terapias antimicrobiales produciendo la lisis de las paredes celulares de las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Asimismo, diferentes estudios han demostrado un potencial antimicrobiano inhibitorio, antiinflamatorio y actividades antiangiogénicas de las nanopartículas de plata (AgNPs).<sup>3,4</sup>

Las AgNPs han tenido una importante aplicación en numerosos productos comerciales debido a sus propiedades bactericidas. Se han incorporado a suplementos disponibles comercialmente y a los alimentos destinados al consumo oral debido a los beneficios que proponen. Pero la ingestión de AgNPs también puede causar riesgos severos de salud, como por ejemplo, arritmia cardíaca y deformación de la columna vertebral.<sup>5</sup> Por ello es de suma importancia definir los niveles de nanomateriales base plata ingeridos.

La naturaleza no biodegradable del metal es uno de los principales inconvenientes para estas partículas, además que no hay información sobre sus transformaciones químicas y su destino in vivo en el cuerpo humano, particularmente si es capaz de alcanzar el sistema circulatorio o no.<sup>6</sup>

Como ya hemos comentado, la bibliografía al respecto indica que las nanopartículas de plata tienen actividad antibacteriana contra cepas de bacterias gram-negativas y gram-positivas, siendo más efectivas sobre las gram-negativas, debido a que las gram-positivas tienen una pared bacteriana más gruesa a causa del peptidoglicano que la compone. Pero además, dicha actividad depende del tamaño y de la concentración de las NPs. Un aumento de tamaño de las NPs reduce su actividad antibacteriana, por tanto, las partículas más pequeñas de AgNPs actuarán con mayor potencia.<sup>3,7,8</sup>

## 1.2. LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN PRODUCCIÓN ANIMAL.

Aunque en medicina llevan usándose durante varios años, en cuanto a la veterinaria y producción animal su aplicación es todavía relativamente nueva. Son muchas las aplicaciones que tienen las nanopartículas en este sector, como puede ser la administración de nutrientes específicos, como probióticos y suplementos, o para el tratamiento de enfermedades o su posible diagnóstico. Pero una de las más importantes a día de hoy es en la alimentación animal, utilizando las

nanopartículas como aditivos alimentarios.<sup>4</sup> La salud del animal está determinada en gran parte por una nutrición adecuada y un buen entorno de vida, y la optimización de estos factores hará que aumente positivamente la calidad de los alimentos de origen animal y además un aumento de la eficiencia de la crianza.<sup>9</sup>

En la industria ganadera se han utilizado antibióticos como promotores de crecimiento y para impedir enfermedades. Éstos eliminan las bacterias patógenas presentes en el tracto digestivo de los animales con el fin de favorecer la absorción de nutrientes y por tanto para aumentar los rendimientos productivos del animal. Pero debido al aumento de bacterias resistentes a los antibióticos tras un uso continuado de ellos, y además que puede provocar la contaminación de la carne, se están empezando a prohibir dichos antibióticos<sup>10</sup> para sustituirlos por nanopartículas, ya que según estudios llevados a cabo concluyen que pueden ser buenas candidatas para realizar estas funciones, sobre todo en cuanto a la actividad antimicrobiana.<sup>4</sup>

Ejemplos de lo anterior son ensayos in vitro (plata coloidal de 0 a 25,50 o 100 mg/L) e in vivo con lechones destetados (20 y 40 mg/L AgNPs en matriz de sepiolita) en los cuales se observó una disminución de coliformes en el contenido ileal de los cerdos, mientras que no se observó ningún efecto en los lactobacilos, además de la reducción de la concentración de patógenos como *Clostridium perfringens* y *Cl. Histolyticum* en el íleon.<sup>11</sup>

### **1.3. TÉCNICAS INSTRUMENTALES PARA DETERMINAR NPs**

Se dispone de técnicas variadas para detectar, caracterizar y cuantificar las NPs en matrices complejas. Cuando el analito es una nanopartícula, una especie en fase sólida de tamaño inferior a 100 nm, la información cuantitativa se proporciona como concentración molar o como concentración numérica; la información cualitativa viene asociada a la caracterización química o la caracterización física (tamaño, forma, agregación) del material. Además, es interesante obtener información sobre especiación, sobre la liberación de nanopartículas libres o en forma iónica.<sup>12</sup>

Habitualmente las nanopartículas se sintetizan, se funcionalizan o se utilizan para formar nanomateriales y es preciso llevar a cabo estudios de caracterización de esos nuevos compuestos o de las NPs. Para ello se utilizan distintas técnicas instrumentales para conocer ese tipo de información. La Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) ó la Dispersión Dinámica de la Luz (DLS) son ejemplos de estas técnicas.

La Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) es una de las técnicas utilizada para determinar el tamaño, forma y morfología de los nanomateriales. Dicha técnica consiste en acelerar un haz de electrones y hacerlos incidir en la muestra. Esta interacción entre la muestra y los haces de electrones da lugar a imágenes, las cuales nos permiten caracterizar las nanopartículas, que aparecen como puntos sobre la superficie del material analizado.<sup>13,14</sup>

La Dispersión Dinámica de la Luz (DLS) es una de las técnicas más empleadas para medir el tamaño de las nanopartículas en suspensiones acuosas. DLS mide el movimiento browniano de las NPs, a través de las variaciones dependientes del tiempo; las partículas más pequeñas se mueven rápidamente y se acelera la variación de la intensidad de dispersión y en cambio las partículas más grandes tienen variaciones más lentas. Las técnicas de DLS requieren información sobre la viscosidad

y el índice de refracción, que a menudo no está disponible o es difícil de conocer en muestras que son altamente complejas.<sup>12, 15</sup>

Para cuantificar NPs que habitualmente se encuentran a niveles muy bajos en las muestras, la técnica que da mayores prestaciones es la Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS). Aunque también hay referencias de trabajos basados en técnicas menos sensibles, basadas en la Espectroscopía de Absorción Atómica (AAS).

La Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS) consiste básicamente en vaporizar e ionizar la muestra líquida gracias a un plasma de Ar y los iones una vez formados pasan al espectrómetro de masas donde se separan y se detectan.<sup>12, 14</sup> Actualmente muchos trabajos se orientan a la determinación de partículas individuales (SP-ICP-MS); Vidmar et al<sup>16</sup> estudian distintos métodos de preparación de muestra en tejidos humanos usando esta técnica.

La Espectroscopía de Absorción Atómica en Llama (FAAS) es una técnica selectiva que se basa en obtención de átomos en estado gas a la temperatura de una llama habitualmente de aire-acetileno que alcanza una temperatura de unos 2000 grados centígrados; estos átomos absorben la radiación emitida por una lámpara del mismo elemento a analizar. Se emplea para la determinación cualitativa o cuantitativa de metales, siempre que podamos disolver la muestra. Su límite de detección es del orden de mg/L.<sup>17</sup> No hay muchas referencias aplicadas a las AgNPs. Wu y Men<sup>18</sup> utilizan la llama para determinar AgNPs en muestras medioambientales de aguas. Choleva, T.G. et al<sup>19</sup> trabajan sobre formas de preparar muestras medioambientales mediante sistemas de extracción del analito previos y Sirirat, N. et al.<sup>20</sup> realizan estudios sobre los procesos que tienen lugar al utilizar termospray aplicado a AgNPs.

La Espectroscopía de Absorción atómica con Horno de Grafito (GFAAS) se basa en la obtención de átomos mediante un calentamiento eléctrico, en un tubo de grafito situado entre dos electrodos y que se calienta hasta unos 2300-2400 grados centígrados. El límite de detección en este caso es del orden de  $\mu\text{g/L}$ .<sup>21</sup>

Además de las técnicas de detección anteriores también se acude a métodos electroquímicos, como la voltametría.

La Voltametría comprende un conjunto de técnicas electroanalíticas en que se estudia la intensidad de corriente eléctrica, o sus cambios, en sistemas sometidos a un potencial o un barrido de potenciales. La teoría se basa en reacciones de oxidación reducción en el sistema y en las inmediateces de los electrodos, pero tiene muchas aplicaciones y la instrumentación se basa en los electrodos y en su selectividad. Las NPs asociadas a métodos electroquímicos tienen una aplicación importante en cuanto al diseño de sensores o a la modificación o construcción de electrodos.<sup>22</sup>

#### **1.4. TÉCNICAS DE SEPARACIÓN DE NPs**

Las técnicas de separación de nanopartículas se emplean acopladas a las técnicas de detección descritas anteriormente, primordialmente a ICP-MS. La separación de las partículas se realiza en función de su tamaño, superficie, densidad, etc., dando una buena resolución en sistemas complejos.

Algunas de las técnicas más utilizadas se describen a continuación:

Ultrafiltración (UF): Se basa en el uso de membranas nanoporosas de diferentes materiales y con límites de peso molecular. La UF es un tipo de filtración en la cual la presión hidrostática fuerza un líquido contra una membrana semipermeable. Los sólidos suspendidos y los solutos de alto peso molecular son retenidos, mientras que el agua y los solutos de bajo peso molecular atraviesan la membrana. De esta forma, las especies iónicas libres se pueden separar fácilmente de las nanopartículas.<sup>12</sup> Un tema diferente en cuanto a ultrafiltración y NPs es la utilización de éstas para mejorar las propiedades de las membranas de los filtros.<sup>23</sup>

Fraccionamiento de Flujo mediante Campos (FFF): La separación tiene lugar en un canal delgado y alargado por donde pasan las nanopartículas sin una fase estacionaria, causada por la acción de un campo externo que se aplica perpendicularmente a un flujo laminar. Es una de las técnicas más prometedoras, debido al poder de resolución para una amplia gama de tamaños de partículas y por la mínima interacción que tiene el analito con la superficie al no haber fase estacionaria.<sup>12, 24,25</sup>

Cromatografía hidrodinámica (HDC): En la cromatografía hidrodinámica, las columnas se empaquetan con macropartículas no porosas, construyendo canales de flujo, y la separación se produce por el gradiente de velocidad dentro de los capilares entre las partículas del empaquetamiento. Así, las partículas más grandes se transportan más rápido que las más pequeñas, ya que pasan menos tiempo cerca de los bordes de los capilares.<sup>6, 12</sup>

## 2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

El principal objetivo de este trabajo de fin de grado es conocer cuánta plata se libera a partir de una muestra compleja, un nanomaterial que contiene caolín (aditivo para la alimentación animal)-plata al ponerlo en contacto con medios acuosos simulando procesos que sufre este compuesto durante la digestión. La plata liberada actúa como antimicrobiano y puede llegar a reemplazar el uso de antibióticos dependiendo de cómo actúe. Los objetivos específicos del trabajo son:

- Realización de estudios iniciales de cuantificación de plata en nanopartículas de plata patrón con el fin de estudiar su posible degradación con el tiempo.
- Determinación de pH y conductividad de la muestra suspendida en medio acuoso.
- Determinación del contenido total de plata en la muestra.
- Realización de ensayos de liberación de plata en medio acuoso.
- Realización de ensayos de liberación de plata en ácido diluido.
- Realización de ensayos de liberación de plata en matriz de fosfatos.
- Realización de ensayos de liberación de plata en medio tamponado.
- Realización de ensayos de liberación de plata en medios de cultivo celulares.
- Determinación del contenido de plata iónica y AgNPs en el nanomaterial mediante ultrafiltración.

Además, en cuanto a los objetivos académicos que se pretenden cumplir son:

- Efectuar búsquedas bibliográficas para conocer y entender el tema al que hace referencia el trabajo.
- Poder aplicar y demostrar lo aprendido durante el Grado en relación al trabajo en un laboratorio, conociendo y formando parte de un equipo de investigación.
- Mejorar aprendiendo nuevas técnicas y formas de trabajar en un laboratorio. Asimismo, mejorar mis capacidades de interpretar datos, medidas experimentales y de resolución a problemas que pueden surgir durante la práctica.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL.

#### 3.1. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS

##### 3.1.1. Instrumentación

- Espectrofotómetro de Absorción Atómica en llama modelo Perkin Elmer AAnalyst 200 equipado con lámpara de cátodo hueco de Ag.
- Espectrofotómetro de Absorción Atómica en llama modelo Perkin Elmer Z380 equipado con lámpara de cátodo hueco de Ag.
- Balanza analítica GH-200 con precisión de  $\pm 0,1$  mg.
- pH-metro, Crison Basic 20; Crison, Barcelona, España.
- Sonda Conductividad; HANNA INSTRUMENTS.

##### 3.1.2. Aparatos

- Incubadora; OVAN, Barcelona, España.
- Centrífuga Heraeus Multifuge X1R; Thermo Fisher scientific, Waltham, EEUU.
- Baño de ultrasonidos Ultrasons P Selecta.
- Sistema de agitación rotatorio Heidolph.
- Sistema de generación de agua ultrapura MILLIPORE.
- Micropipetas 200-1000  $\mu$ L BIOHIT PROLINE y Bibby Sterilin.
- Ultrafiltros Nanosep 3 kDa OMEGA (Pall).
- Tubos Falcon de polipropileno de 15 y 50 ml.
- Tubos Eppendorf 1,5 mL.
- Vasos de Teflón.
- Vasos de precipitados
- Pipetas pasteur.

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

###### Reactivos:

- Ácido nítrico HNO<sub>3</sub> 69,0% (m/m) PanReac AppliChem.
- Agua Ultrapura (Millipore).
- Hidrógeno fosfato de sodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), > 99,0% Sigma –Aldrich.
- Tampón TRIS tris(hidroximetil)aminometano, pH 8

#### Disoluciones patrón y estándares:

- Patrón de Ag (I) para ICP de 994±3 mg/L (Sigma-Aldrich, Suiza).
- Estándares de AgNPs de **10 nm, 20 nm, 40 nm y 60 nm** Silver Nanospheres, citrate. Nanoxact 20 mg/L (Marca nanoComposix San Diego, EEUU).
- Estándar de AgNPs: **50 nm** Silver Nanospheres, citrate. Nanoxact 5000 mg/L (Marca nanoComposix San Diego, EEUU).

#### Muestras:

Se ha trabajado con dos muestras diferentes, C2 y C3 que llevan un tratamiento específico. La muestra denominada C3, que lleva un recubrimiento de plata y la muestra C2, tratada de forma similar a C3 pero que no contiene plata. El tratamiento de preparación incluye el depósito de plata en la superficie del caolín en forma de nanopartículas de plata metálica.

El material utilizado para la preparación de disoluciones de patrones y muestras se sumerge previamente en una disolución de HNO<sub>3</sub> en agua MilliQ al 10% (v/v) durante 24 h. Transcurrido el tiempo se lavan con agua desionizada y se dejan secar. Así se asegura que el material está totalmente limpio y no contaminado.

#### Medios de cultivo celular:

Se ha trabajado con tres medios de cultivo celular de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's médium en inglés, es una fórmula modificada que permite el crecimiento celular *in vitro* proporcionando los nutrientes esenciales requeridos por la célula) que contienen cantidades distintas de suero bovino fetal (FBS) y un determinado antibiótico PS:

- MEDIO 1: DMEM (1X)+GlutaMAX™-I - (10% Suero Bovino Fetal (FBS), 1% PS). Marca Gibco
- MEDIO 2: DMEM (1X)+GlutaMAX™-I - (5% FBS, 1% PS). Marca Gibco
- MEDIO 3: DMEM (1X)+GlutaMAX™-I - (0% FBS, 1% PS). Marca Gibco

### **3.2. METODOLOGÍA: Preparación de las muestras.**

En este apartado se van a exponer los diferentes tratamientos de la muestra de Caolín-Ag (C3) que se han realizado, tanto para conocer cuál es el contenido total en Ag de las muestras estudiadas como para realizar estudios de lixiviación de Ag en diferentes medios. El objeto de esta lixiviación es tener datos sobre la posible accesibilidad de plata al ser ingerida en suplementos alimenticios y al ser liberada durante el proceso. Además, también se presenta la metodología llevada a cabo para comprobar el contenido total de Ag en una serie de patrones de AgNPs de distintos tamaños; este estudio se relaciona con trabajos preliminares en el laboratorio antes de abordar las muestras reales.

Todas las determinaciones se han realizado por Espectroscopía de Absorción Atómica en Llama (FAAS), cuya sensibilidad (relacionada con los niveles de concentración de las muestras) está acorde con los rangos de analito esperados, en el orden de unos pocos mg/L. A lo largo de todo el trabajo se han preparado rectas de calibrado, con patrones hasta 5 mg/L preparados en HNO<sub>3</sub> al 1%.

Las disoluciones de patrones y de muestras se han preparado por pesada en balanza analítica. A continuación se presentan tablas modelo empleadas durante la preparación de las muestras y los cálculos posteriores realizados. Algunas de ellas se adjuntan como anexos.

	Caolín (g)	V total (g)
Tiempo (variable)		
Blanco		
Réplica 1 R1		
Réplica 2 R2		

Tabla 1. Modelo de tabla para preparación de muestras por pesada en balanza

	Concentración obtenida (mg/L)	Concentración en sobrenadante (mg/L)	Miligramos	% Plata
Tiempo (variable)				
Blanco				
R1				
R2				

Tabla 2. Modelo de tabla para la determinación de la concentración y porcentaje en las muestras

En la Tabla 1 se tiene en cuenta la primera disolución que se prepara, con el peso de muestra original y el volumen final del agente lixiviante. En la Tabla 2, se muestra la concentración de Ag obtenida en las disoluciones medidas por FAAS, además de las correcciones por la dilución realizada y la transformación a peso (en mg) y los porcentajes de plata.

### 3.2.1. Estudios preliminares sobre patrones de AgNPs.

Para los estudios de estabilidad de patrones de nanopartículas de plata se prepararon disoluciones de patrones de nanopartículas de concentración 3 mg/L en 5mL de ácido nítrico, en proporción HNO<sub>3</sub>:AgNPs (1:1) para cada tamaño de partícula, es decir, un total de 4 disoluciones de muestra.

Para estudios de recuperación se prepararon disoluciones de AgNPs de distintos tamaños, de concentración 2 mg/L en 5 mL de ácido nítrico, en proporción HNO<sub>3</sub>:AgNPs (1:1) a las cuales se añadía patrón de plata hasta obtener asimismo 2 mg/L de plata añadida, como se observa en la figura 1.

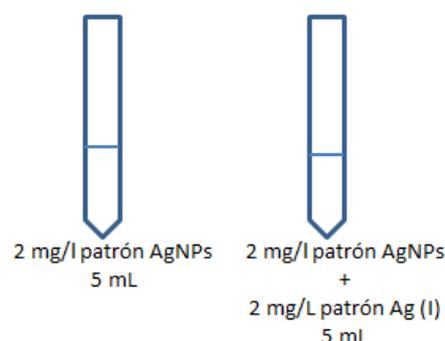


Figura 1: Estudio de Recuperación.

### 3.2.2. Estudios preliminares sobre la muestra: pH y Conductividad.

Se procedió a la preparación de suspensiones de la muestra en agua, dejándolas agitar durante una hora para medir pH y conductividad de las disoluciones resultantes. Las mezclas fueron:

- C2 + H<sub>2</sub>O
- C3 + H<sub>2</sub>O
- C3 + Medio 1 (BFS 10%)
- C3 + Medio 2 (BFS 5%)
- C3 + Medio 3 (BFS 0%)

En el caso del medio acuoso, se prepararon dos réplicas de cada muestra, C2 y C3, de las cuales se pesaron 50 mg de muestra en 50 mL de agua ultrapura.

Para los medios de cultivo, se pesaron 100 mg de C3 y se añadieron 35 mL para cada uno de los medios. Los procedimientos ya estaban establecidos de antemano.

### 3.2.3. Preparación de la muestra para determinar el contenido total de Ag.

Para llevar a cabo la determinación del contenido total de plata se realizó un ataque ácido con ácido nítrico, para el cual se pesaron aproximadamente 100 mg de la muestra y se añadieron 3 mL de HNO<sub>3</sub> al 50% en vasos de Teflón. Esta disolución se lleva a calentar hasta sequedad en baño de arena. Y una vez seco, al residuo sólido se le añaden 3 mL de HNO<sub>3</sub> al 10% para resuspenderlo y así poder trasvasarlo de los vasos de Teflón a tubos de 15 mL de capacidad; el volumen total fue de 10 mL. Estos tubos se llevan a centrifugar a 3000 rpm durante 10 min. Por último se coge 1 mL del sobrenadante tras la centrifugación y se lleva a un volumen final de 50 mL con HNO<sub>3</sub> al 1%.

A continuación se presenta un esquema del procedimiento:

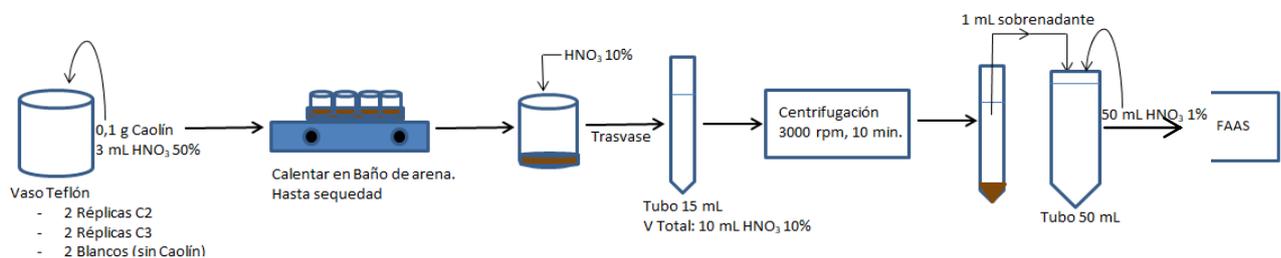


Figura 2: Preparación de la muestra para determinación del contenido total de Ag

### 3.2.4. Preparación de la muestra para determinar la cantidad de Ag liberada en agua.

Para determinar el contenido de plata procedente de la muestra que se libera en agua se realizan ensayos de lixiviación, que consisten en mantener la muestra en contacto con el agua desionizada y en agitación. El proceso se realiza a distintos tiempos.

Para llevar a cabo dichos ensayos de lixiviación de las muestras se pesaron 50 mg de Caolín C3, y se añadieron 50 mL de agua ultrapura en tubos de 50 mL. Se preparan en total dos réplicas de muestra y un blanco (tan solo contiene el agente lixivante), en este estudio no se utilizó la muestra C2 sin recubrimiento de Ag. La disolución se mantiene en agitación durante distintos tiempos, es decir, se realizaron diferentes ensayos a diferentes tiempos de agitación (10 min, 1 h, 4 h, 24 h, 48 h) para comprobar qué cantidad de plata se va liberando con el tiempo. Transcurrido el tiempo de cada

ensayo se llevan a centrifugar a 5000 rpm durante 17 min; el sólido contiene las partículas de tamaños mayores a 0,2  $\mu\text{m}$ .

Tras la centrifugación se coge 1 mL del sobrenadante y se realiza una dilución 1:3 con  $\text{HNO}_3$  1%. En el siguiente esquema se muestra el procedimiento llevado a cabo:

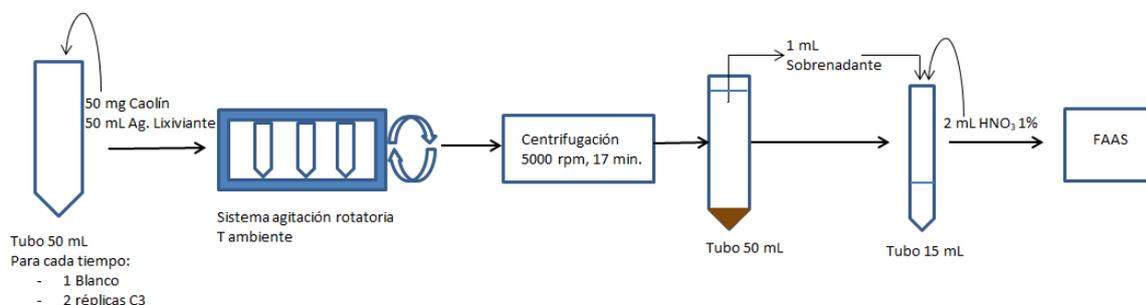


Figura 3: Preparación de la muestra para determinación de la Ag liberada en medios diferentes

### 3.2.5. Preparación de la muestra para determinar la cantidad de Ag liberada en ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ).

Para la preparación de las disoluciones en el caso de la lixiviación con ácido nítrico diluido se realizan los mismos ensayos que en el caso del agua ultrapura, lo único que se cambia es el agente lixivante. En este caso se añadieron los 50 mL de Ácido nítrico al 1%. Y tras la centrifugación se prepara el extracto: se coge 1 mL de sobrenadante y se realiza una dilución 1:3 con  $\text{HNO}_3$  1%. El esquema del procedimiento corresponde al mostrado en la Figura 3.

### 3.2.6. Preparación de la muestra para determinar la cantidad de Ag liberada en un medio de Fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ).

En el caso de la lixiviación con fosfatos, lo primero que se lleva a cabo es la preparación del agente lixivante. Para ello, se prepara una disolución 0,1 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y se comprueba que el pH es de 7,0-8,0 ajustándolo con  $\text{HNO}_3$ . Una vez preparado, se realiza el mismo procedimiento que en los casos anteriores, utilizando la disolución de Fosfatos como agente lixivante, y por tanto su esquema también es la Figura 3.

Debido a que la plata puede precipitar en forma de fosfatos, al tener un producto de solubilidad  $K_{ps} = 10^{-17}$  se realiza un ensayo para comprobar que no perdemos Ag precipitada como cloruro de plata durante la lixiviación. Para ello se prepararon dos réplicas de patrón de Ag(I) de 10 mg/L en 50 mL del medio de fosfatos. Y se procedió a someter al patrón de concentración de Ag conocida y exento de otros compuestos al mismo tratamiento que se indica en la Figura 3.

### 3.2.7. Preparación de la muestra para determinar la cantidad de Ag liberada en tris(hidroximetil)aminometano (tampón pH 8)

En este caso se prepara un tampón Tris de pH 8 pesando 3,028 gramos del reactivo y llevando a un litro de agua desionizada, y así obtener una concentración de 0,025 M. Posteriormente se ajusta el pH hasta 8. La preparación de las muestras en este medio es el descrito en los apartados anteriores.

### 3.2.8. Preparación de la muestra para determinar la Ag liberada en distintos medios de cultivo celular

En este estudio se utilizan tres medios de cultivo que difieren en el contenido de suero Bovino Fetal (FBS). Además de glucosa y FBS, contienen un determinado antibiótico denominado PS. Los pHs de cada medio son:

- Medio 1 → 10 % FBS, 1 % PS. pH = 7,90
- Medio 2 → 5 % FBS, 1 % PS. pH = 7,78
- Medio 3 → 0 % FBS, 1 % PS. pH = 7,60

Las muestras del caolín-plata C3 en cada medio de cultivo tienen una concentración máxima de 12,5 g/L para llevar a cabo estudios de toxicidad. Por ello se pesan unos 187,5 mg de muestra y se añaden 15 mL del correspondiente medio. En total se preparan para cada medio 2 blancos de control (C2+Medio) y 2 réplicas de las muestras (C3+Medio). La suspensión se mantuvo en agitación durante 24 h, a 37°C en incubadora. Transcurrido el tiempo, se centrifugan durante 23 min a 5000 rpm y del sobrenadante obtenido tras la separación, se realiza una dilución 1:5 con agua MilliQ.

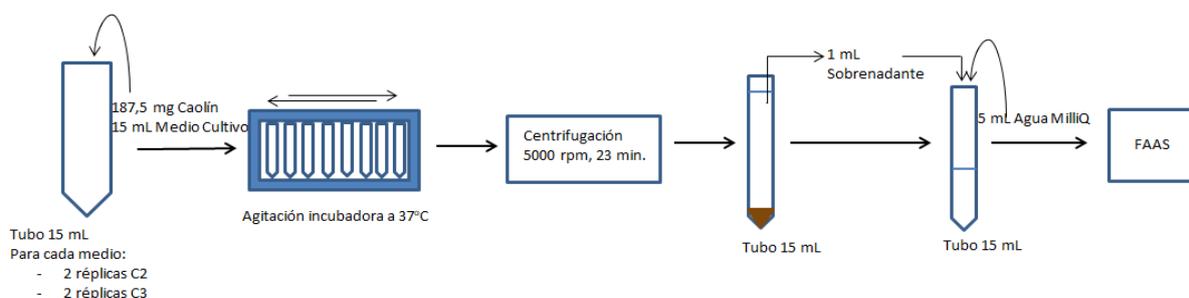


Figura 4: Preparación de la muestra para determinación de la Ag liberada en los medios de cultivo

### 3.2.9. Separación de Ag iónica y Nanopartículas por Ultrafiltración (UF).

Como ya se ha comentado anteriormente, la ultrafiltración se emplea para separar material coloidal en diferentes tamaños, ya que se utilizan membranas con un tamaño de poro definido. En este caso se aplica a material a escala nanométrica junto a plata iónica. El ultrafiltro en nuestro caso son membranas de 3 kDa, que sólo podrán ser atravesadas por plata disuelta, ya que las nanopartículas no pasan esa membrana. El paso de la disolución a través de ella es debido a la presión hidrostática. La figura 5 muestra de forma esquematizada cómo es el proceso de separación.

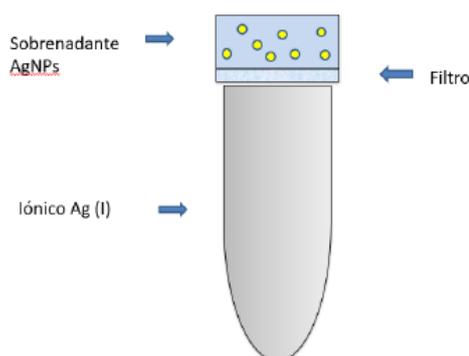


Figura 5: Diseño de un ultrafiltro

La ultrafiltración se aplicó para estudiar las especies de Ag liberadas en medio acuoso y en los medios de cultivo.

De la disolución resultante tras lixiviar la muestra con agua o con medios de cultivo, se toma un extracto de 500  $\mu\text{l}$  del sobrenadante de las muestras tras la centrifugación. Las condiciones de ultrafiltración fueron 9000 rpm durante 30 minutos. Finalizado el proceso el volumen se diluye a 1:5 con  $\text{HNO}_3$  1%. La figura 6 muestra un esquema del método de preparación llevado a cabo.

Los ultrafiltros previamente se acondicionan con agua de la siguiente manera:

1. Tomar 500  $\mu\text{L}$  de agua MilliQ.
  2. Centrifugar durante 10 minutos a 9000 rpm
- Realizar el proceso 2 veces

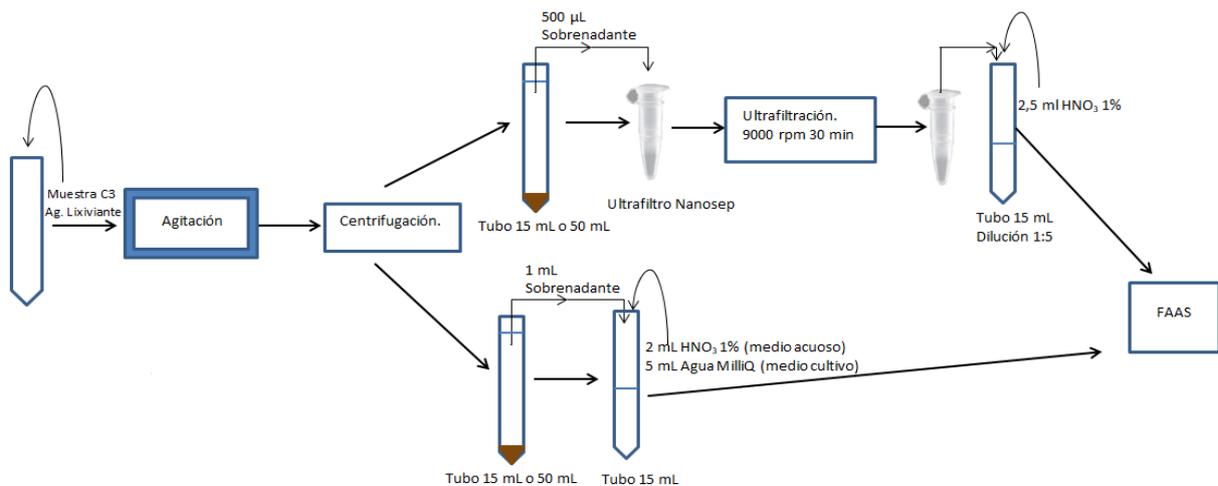


Figura 6: Esquema del procedimiento de ultrafiltración

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los sucesivos apartados se presentan los resultados obtenidos. En primer lugar, coincidiendo con los inicios en el laboratorio, se realizó un estudio comparativo en cuanto a la forma de preparar los patrones de plata para la cuantificación mediante la Espectroscopía de Absorción Atómica en llama (FAAS); en segundo lugar, se muestra un pequeño estudio encaminado a evaluar la estabilidad de los patrones de nanopartículas y posteriormente los ensayos llevados a cabo con la muestra y que son el tema principal de este estudio.

### 4.1. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LA FORMA DE PREPARACION DE LOS SISTEMAS DE CALIBRACIÓN

En todos los casos la cantidad de Ag total y de Ag liberada tras la lixiviación se ha determinado mediante Espectroscopia de Absorción Atómica con Llama (FAAS). Las condiciones instrumentales empleadas han sido:

Lámpara	Cátodo de Ag
Longitud de onda ( $\lambda$ ) (nm)	328
Ranura (mm)	2,7

Caudal aire/acetileno (L/min)	10/2,5
Nº de réplicas	3
Tiempo de integración (s)	1
Tiempo de retraso de lectura (s)	2

Tabla 3: Condiciones instrumentales del FAAS.

El método de calibración elegido fue una calibración directa con patrones acuosos, concretamente en HNO<sub>3</sub> 1%. Siempre se trabajó con 5 patrones de 1, 2, 3, 4 y 5 mg/L de Ag(I). Las disoluciones se preparan por pesada en balanza.

Con el fin de comprobar si existían diferencias significativas por el hecho de enrasar directamente todo con HNO<sub>3</sub> 1% o añadir ácido más concentrado (10%) y al enrasar con agua llegar finalmente a la acidez deseada (1%), se realizó una prueba inicial en la que se compararon los resultados obtenidos a partir de dos rectas preparadas de diferente manera:

1. Patrón de Ag (100 mg/L), HNO<sub>3</sub> 1%
2. Patrón de Ag (100 mg/L), 1mL HNO<sub>3</sub> 10%, H<sub>2</sub>O MilliQ

En el anexo I se muestran detalladamente las tablas y gráficas para cada recta de calibrado.

Comparando los valores de las pendientes de la recta mediante un test estadístico, asumiendo que la probabilidad de que sean diferentes es aleatoria, se pudo observar que la diferencia no es significativa, debido a que la probabilidad es superior al 5%, con una significatividad del 95%, así podemos afirmar que no influye el preparar la recta de calibrado de una manera u otra.

	Valor 1	Valor 2
Magnitud	0,0477	0,0455
Incertidumbre	0,0011	0,0012
Grados de libertad	5	5
Parámetro z o t	1,39	
<b>probabilidad de que la diferencia sea aleatoria:</b>	2 colas	
asumiendo distribución z	<b>16,43%</b>	

Tabla 4: Comparación de pendientes de rectas de calibrado

Se eligió preparar todas las disoluciones de patrones enrasando directamente con HNO<sub>3</sub> 1% en todos los ensayos realizados, ya que el tiempo invertido en preparar las muestras es significativamente menor.

#### 4.2. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LOS PATRONES DE AgNPs.

Antes de abordar el estudio de la muestra se realizó un estudio de los patrones de nanopartículas de plata que se iban a emplear. Es decir, cuantificar si la concentración de plata que indica la etiqueta del reactivo es la que realmente se encuentra en el bote transcurrido un tiempo desde su apertura. Se dispone de patrones de distintos diámetros (10, 20, 40 y 50 nm) y cada uno tiene una concentración etiquetada de Ag.

Tras someter a los patrones al tratamiento de muestra indicado en el apartado 3.2.1 y obtener la concentración de muestra real de los mismos por FAAS, los resultados se muestran en la Tabla 5.

La concentración de los patrones variaba entre 20 y 5000 mg/L y se calculó la diferencia de valores entre la concentración real que figura en la etiqueta y el obtenido al cabo de un tiempo de abierto el reactivo en términos de error relativo, cuya fórmula:

$$\%error = \frac{|C_{obtenida} - C_{real}|}{C_{real}}$$

Tamaño de AgNPs	Conc. etiqueta (mg/L)	Conc. obtenida (mg/L)	% Error relativo
10nm	20	18,24	8,79
20nm	20	23,93	19,6
40nm	20	18,87	5,66
50nm	5000	4873	2,54

Tabla 5: estabilidad de los patrones AgNPs

Los resultados obtenidos en la Tabla 5 indican que, excepto el patrón de 20nm, no se supera un 10% de variación.

Tras esto se realizó un estudio de recuperación en el que se obtuvo la concentración (mg/L) de los patrones solos ( $C_M$ ) y la concentración de los patrones dopados ( $C_{M+A}$ ) con una determinada cantidad de patrón de plata. Se aplicó la siguiente fórmula:

$$\%Recuperación = \frac{C_{M+A} - C_M}{C_A} \times 100$$

La concentración preparada de cada patrón de AgNPs fue de 2 mg/L y se añadió la misma cantidad de patrón de plata. Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

TAMAÑO DE AgNPs	RECUPERACIÓN (%)
20nm	89,5
60nm	109
50nm	99,9

Tabla 6: Estudio de recuperación

Los resultados que observamos en la Tabla 6 indican que los estudios de recuperación dan resultados cercanos al 100% y por tanto la cuantificación está bien.

### 4.3. ESTUDIO DEL pH Y CONDUCTIVIDAD DE LA MUESTRA

El caolín es una arcilla, un silicato que se puede utilizar en distintas aplicaciones, una de las cuales es constituir un suplemento alimentario para los animales. El que se usa aquí es un nanomaterial con base plata; las nanopartículas de plata tienen propiedades bactericidas. Si el animal ingiere caolín recubierto de plata, durante todo el proceso digestivo está en contacto con medios acuosos y la plata adsorbida sobre el sólido es liberada y puede actuar en el organismo con ese poder antimicrobiano, como un antibiótico.

Este trabajo se basa en realizar distintos ensayos para conocer cuanta Ag se libera en distintos medios e investigar cómo se comporta el sistema Caolín-Ag, aditivo alimentario para los animales, durante los procesos digestivos, en contacto con agua y medios de cultivo. Además se han realizado algunos ensayos utilizando Ultrafiltración para intentar separar la nanopartícula de plata respecto de la plata iónica que contiene el material. No hay mucha bibliografía respecto de realizar esta separación por FAAS. En este caso se utiliza la técnica porque se tiene conocimiento de que el nanomaterial contiene niveles de plata del orden de mg. En la bibliografía, Gruszka, J. et al<sup>26</sup> discriminan plata disuelta y AgNPs pero mediante atomización en cámara de grafito.

La muestra objeto de estudio fue caracterizada previamente por otros miembros del grupo investigador (GEAS)<sup>27</sup> y contiene AgNPs de un tamaño comprendido entre 2 y 84 nm, con un tamaño medio de 27 nm. Es una arcilla que en su superficie lleva un recubrimiento de plata. Lo primero que se hizo en este trabajo con la muestra fue comprobar el pH y la conductividad de la muestra sólida puesta en disolución acuosa y en presencia de los 3 medios de cultivo estudiados.

Para ello se prepararon dos réplicas de cada muestra como se explica en el apartado 3.2.2 y se hizo una lixiviación con agua y con cada uno de los medios de cultivo de 1 h. En el caso de C2 se toma como muestra control y sólo se midieron estos parámetros en agua desionizada. Transcurrido ese tiempo se midieron los parámetros, cuyos resultados se reflejan en la Tabla 7.

Muestras	pH	Conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )
Agua MilliQ	5,72	380
C2 + Agua MilliQ	4,88 $\pm$ 0,17	<100
C3 + Agua MilliQ	5,25 $\pm$ 0,21	<100
Medio 1	7,90	-
C3 + Medio 1	7,80 $\pm$ 0,08	-
Medio 2	7,78	-
C3 + Medio 2	7,70 $\pm$ 0,05	-
Medio 3	7,60	-
C3 + Medio 3	7,30 $\pm$ 0,15	-

*Tabla 7: Medidas de pH y Conductividad*

La presencia del caolín, tanto con plata como sin plata, hace que el agua se torne ligeramente más ácida, siendo el decrecimiento del pH menor en el caso del caolín C3 con plata. Ese aumento de la acidez es debido al tratamiento previo del sólido. En el caso de los medios de cultivo celulares el pH también decrece pero en menor medida. Se concluye que el tratamiento del nanomaterial hace ligeramente más ácido al medio líquido.

La conductividad obtenida para el agua ultrapura es de 380  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , un valor lógicamente bajo debido a los pocos iones que contiene, pero la lixiviación de la muestra provoca una disminución de la conductividad, proporcionando valores de conductividad que están por debajo de los valores que mide la sonda utilizada. La migración iónica es muy baja y posiblemente debida al tratamiento anterior que llevan las muestras. En el caso de la conductividad de los medios no pudo ser detectada por la sonda utilizada en todos los casos.

#### 4.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE Ag

En este apartado y en los sucesivos se describen los resultados obtenidos. En los Anexos II y III se muestran algunos ejemplos de tablas que se manejaron durante la determinación.

Esta determinación se llevó a cabo tras un ataque ácido de las muestras de caolín como el que describimos en el apartado 3.2.3. El contenido se cuantificó por FAAS. Los resultados se muestran en la Tabla 8 que contiene el contenido total obtenido tras el ataque a la muestra de Caolín-Ag (C3) en mg/g junto con su incertidumbre. De la muestra C2, al no contener Ag, las señales AA eran próximas a cero y por debajo del límite de detección del método; no se incluyen.

La determinación del contenido total de Ag de las muestras nos da una idea sobre la máxima cantidad de plata que va a poder liberarse en los siguientes ensayos.

	<b>Ag total muestra (mg/g)</b>	<b>% Ag total muestra (% m/m)</b>
Muestra C2	<0,38 (LD)	<0,038 (LD)
Muestra C3	<b>8,42 ± 0,08</b>	<b>0,842 ± 0,008</b>

Tabla 8: Determinación del contenido de Ag total en C3

#### 4.5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE Ag LIBERADA EN AGUA

La liberación de plata procedente de caolín-Ag en contacto con agua se estudió a distintos tiempos, desde 10 minutos hasta 48 h. Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 9, la cual contiene en la primera parte las concentraciones de plata en mg/L junto con su incertidumbre en la muestra C3. En la segunda parte de la tabla se incluye el porcentaje de plata respecto al contenido total de Ag en la muestra.

Si nos fijamos en el Gráfico 1, podemos ver como la cantidad de Ag liberada va aumentando según aumenta el tiempo que tenemos la muestra lixiviándose y cómo también a partir de un cierto tiempo, las 48 h, la cantidad disminuye. Esto puede ser debido a que transcurrido un tiempo mayor de contacto entre el sólido y el agente lixiviante, la cantidad de Ag iónica en disolución ya no es estable. No obstante, se puede comprobar que a partir de 4 h de lixiviación los niveles de Ag(I) encontrados entran dentro de la incertidumbre del método.

<b>Ag total liberada mg/L en el sobrenadante</b>				
<b>10 min</b>	<b>1 h</b>	<b>4 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>
<b>2,60±0,02</b>	<b>2,62±0,19</b>	<b>3,83±0,79</b>	<b>3,96±0,68</b>	<b>3,38±0,64</b>
<b>% Ag total liberada frente a Ag total</b>				
<b>10 min</b>	<b>1 h</b>	<b>4 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>
<b>30,29±1,05%</b>	<b>30,55±1,81%</b>	<b>43,69±9,18%</b>	<b>44,33±5,08%</b>	<b>38,78±6,24%</b>

Tabla 9: Estudio de la cantidad de Ag liberada en agua con el tiempo

La cantidad de plata es similar dejando lixiviar la muestra 10 min o 1 h; rápidamente se extrae la Ag de la muestra. El porcentaje respecto de la plata total sube hasta alrededor de un 40% dejándolo agitar 4 h y después se mantiene prácticamente constante.

Por ese motivo, un tiempo óptimo de lixiviación se considera 4 h, sobre todo el gráfico 1 permite apreciar esta tendencia, donde se puede comprobar que hay un aumento notable de 1 h a 4 h de lixiviación y como después de 4 h a 24 h aproximadamente se libera la misma cantidad de plata.

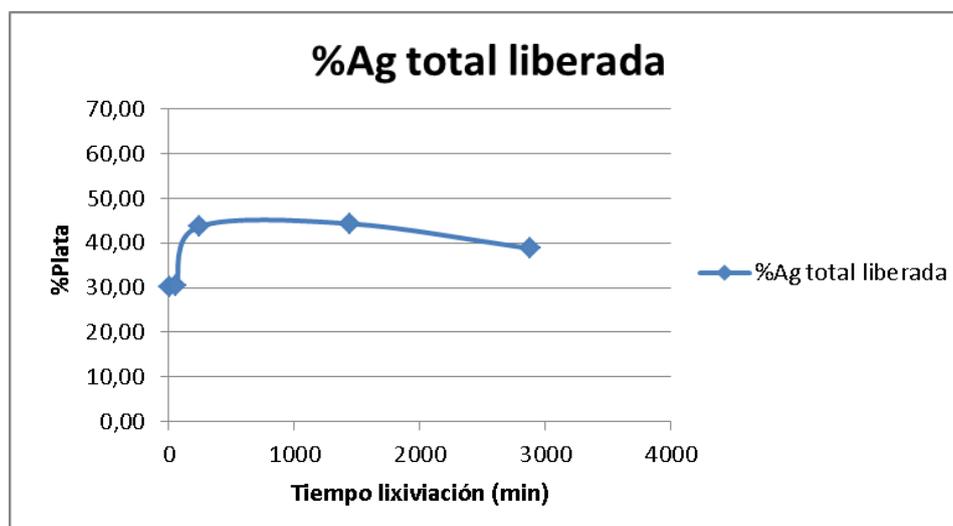


Gráfico 1: Estudio de la cantidad de Ag liberada en agua con el tiempo

#### 4.6. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE Ag LIBERADA EN ÁCIDO NÍTRICO

El ácido nítrico va a oxidar a la plata presente de Ag(0) a Ag(I). Este estudio no es un ataque con ácido en caliente, sino un ensayo para ver cómo evoluciona la cantidad de Ag liberada con ácido diluido, probando a distintos tiempo y sin calentar la mezcla.

Para esta determinación del contenido de Ag se realizó el procedimiento como indica el apartado 3.2.5, cuantificando la cantidad de plata midiendo por FAAS las diluciones preparadas.

La tabla 10 muestra de igual forma que la tabla 9 las concentraciones y los porcentajes obtenidos para cada tiempo de lixiviación.

Se puede observar en la tabla 10 o gráfico 2, cómo la liberación de Ag es gradual con el tiempo; es una forma de ataque mucho más lento, pero es un ataque ya que al cabo de 48 h más del 97% de la plata inicial de la muestra se oxida a forma iónica.

Comparado con los otros gráficos, aquí se observa que la liberación de Ag va progresando hasta alcanzar casi el 100 % de la plata inicial.

Ag total liberada mg/L en el sobrenadante				
10 min	1 h	4 h	24 h	48 h
3,66±0,89	4,06±0,07	4,32±0,17	8,21±0,34	8,31±0,45
% Ag total liberada frente a Ag total				
10 min	1 h	4 h	24 h	48 h
41,40±12,21%	43,98±0,14%	48,63±2,72%	95,77±4,28%	97,22±5,42%

Tabla 10: Estudio de la cantidad de Ag liberada en HNO<sub>3</sub> con el tiempo

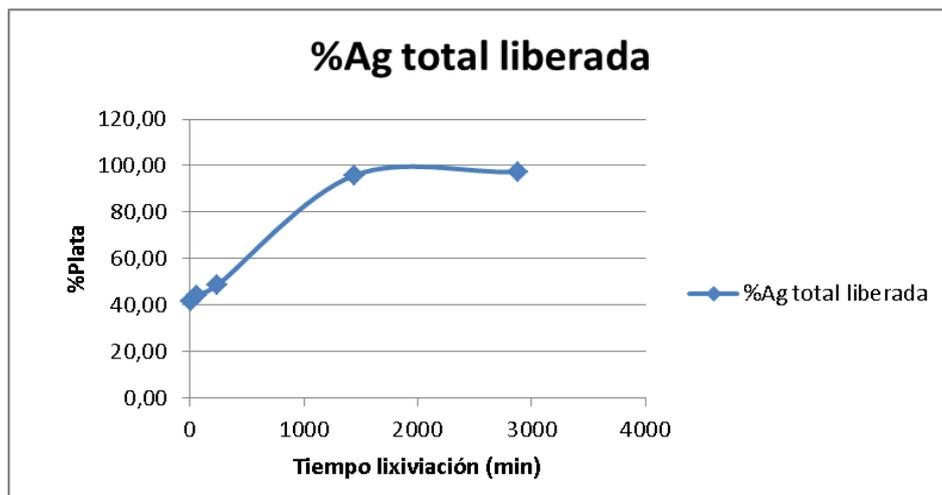


Gráfico 2: Estudio de la cantidad de Ag liberada en HNO<sub>3</sub> con el tiempo

#### 4.7. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE Ag LIBERADA EN MEDIO FOSFATOS

Se realizó el estudio de la posible liberación de Ag a partir de la muestra caolín-plata en un medio de fosfatos cuyo pH inicial era de 8; con el fin de averiguar cómo se comportaría la plata en un medio de pH similar al de los medios de cultivo celulares. No se trabajó con una disolución amortiguadora, sólo se trabajó a un pH 8 proporcionado por esa matriz de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>.

Como la plata tiene una constante de solubilidad con fosfatos de  $K_{ps}=10^{-17}$ , se comprobó que no precipitara en el medio ya que en ese caso estaríamos perdiendo parte de la plata liberada durante la lixiviación. Como se explicaba en el apartado 3.2.6 se realizó una lixiviación de un patrón de Ag de concentración conocida con la disolución preparada de fosfatos.

Se observa que los resultados obtenidos, según muestra la tabla 11, son de aproximadamente un 100% de plata liberada y que por lo tanto, no precipita la plata en el medio de fosfatos preparado.

	Concentración inicial de Ag (mg/L)	Concentración liberada de Ag (mg/L)	% Ag patrón liberada
<b>Réplica 1</b>	9,98	10,21	102%
<b>Réplica 2</b>	10,70	10,83	101%

Tabla 11: Estudio de la posible precipitación de fosfato de calcio

En cuanto al contenido de plata liberado desde la muestra caolín-Ag, C3, en función del tiempo, como muestra la tabla 12 es el caso de lixiviación que hemos visto hasta ahora en el que menor cantidad se libera. A la plata le cuesta más desadsorberse de la superficie del caolín, quizás porque no es un medio adecuado para esa liberación. Pero sigue la misma tendencia que con agua, teniendo la lixiviación de 4 h como la más óptima.

Ag total liberada mg/L en el sobrenadante				
10 min	1 h	4 h	24 h	48 h
2,86±0,05	1,77±0,67	2,85±0,03	2,64±0,12	1,86±0,12
% Ag total liberada				
10 min	1 h	4 h	24 h	48 h
30,38±0,47%	20,06±7,06%	32,26±2,37%	28,11±0,50%	20,74±2,61%

Tabla 12: Estudio de la cantidad de Ag liberada en medios fosfatos con el tiempo

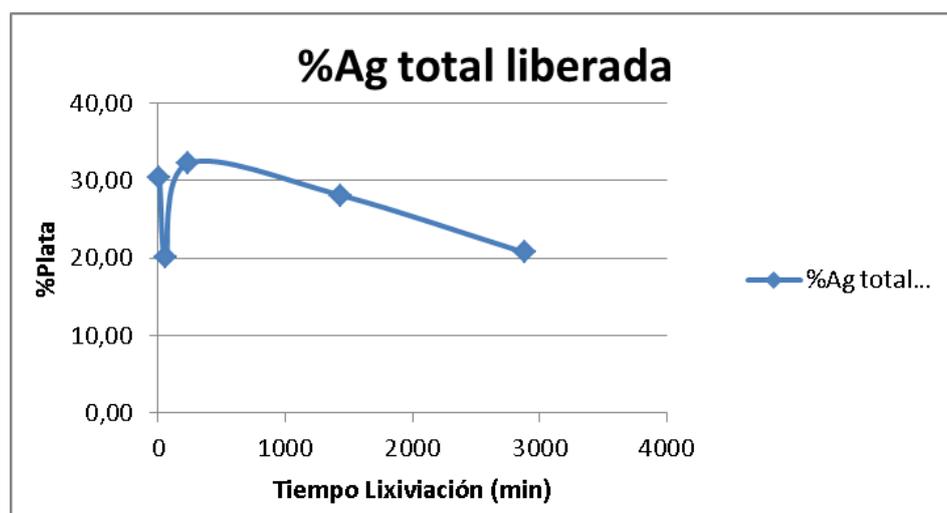


Gráfico 3: Estudio de la cantidad de Ag liberada en medio fosfatos con el tiempo

#### 4.8. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE Ag LIBERADA EN MEDIO TRIS

Este ensayo se realiza con el mismo propósito que con los fosfatos, para ver cómo actúa la plata en un medio de pH parecido al de los medios de cultivo. En este caso, sí se trata de una disolución amortiguadora, Tris(hidroximetil)aminometano, de la cual se midió el pH y era de 8,0. El procedimiento para llevar a cabo la determinación es el que aparece en el apartado 3.2.7.

Los contenidos de plata obtenidos aparecen en la tabla 13. No se estudió el comportamiento de Ag tras 48 horas de lixiviación porque los resultados de 48 h con los otros medios no aportaban una mejora.

El comportamiento es similar al de la presencia de fosfatos, ya que los porcentajes de plata liberada son en ambos casos menores respecto a la lixiviación con agua. La presencia de iones extraños en la matriz líquida puede influir en la liberación de plata desde el sólido. Y en este caso además se observa que la variable tiempo no afecta en gran medida, ya que la cantidad de Ag liberada oscila entre un 25 y 29% ya prácticamente desde los diez primeros minutos.

Ag total liberada mg/L sobrenadante			
10 min	1 h	4 h	24 h
2,17±0,06	2,46±0,09	2,38±0,14	2,55±0,01
% Ag total liberada			
10 min	1 h	4 h	24 h
25,08±0,34%	26,78±2,22%	28,01±1,42%	28,91±0,30%

Tabla 13: Estudio de la cantidad de Ag liberada en medio tris con el tiempo

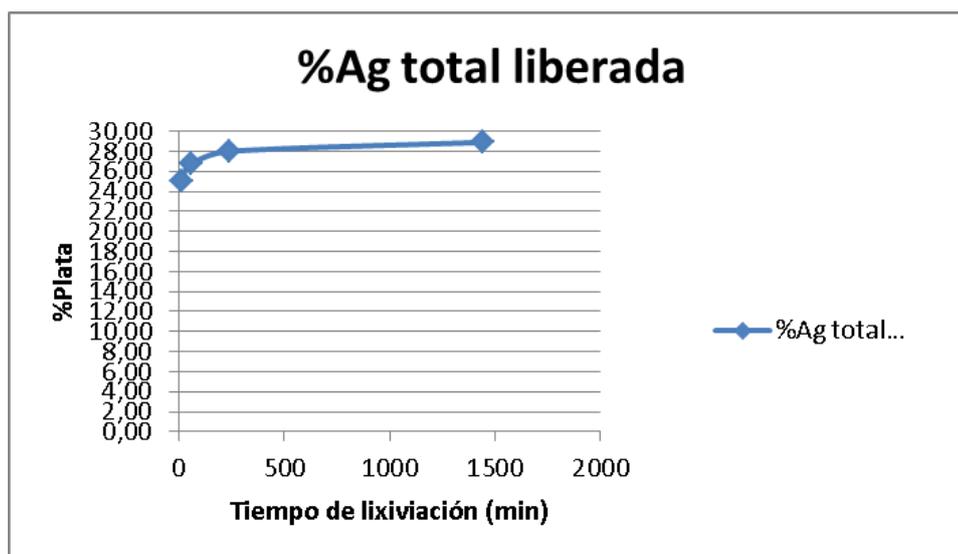


Gráfico 4: Estudio de la cantidad de Ag liberada en medio tris con el tiempo

Por último en el siguiente gráfico (Gráfico 5) tenemos todos los resultados en porcentaje de las lixivaciones para observarlas juntas. Y como podemos ver en el que más plata se libera es en la lixiviación de Nítrico para cualquier tiempo ya que al hacerlo con ácido nítrico durante 24 h o 48 h la plata se oxida a plata iónica. Los demás resultados están entre un 20 y un 40% de plata que se libera.

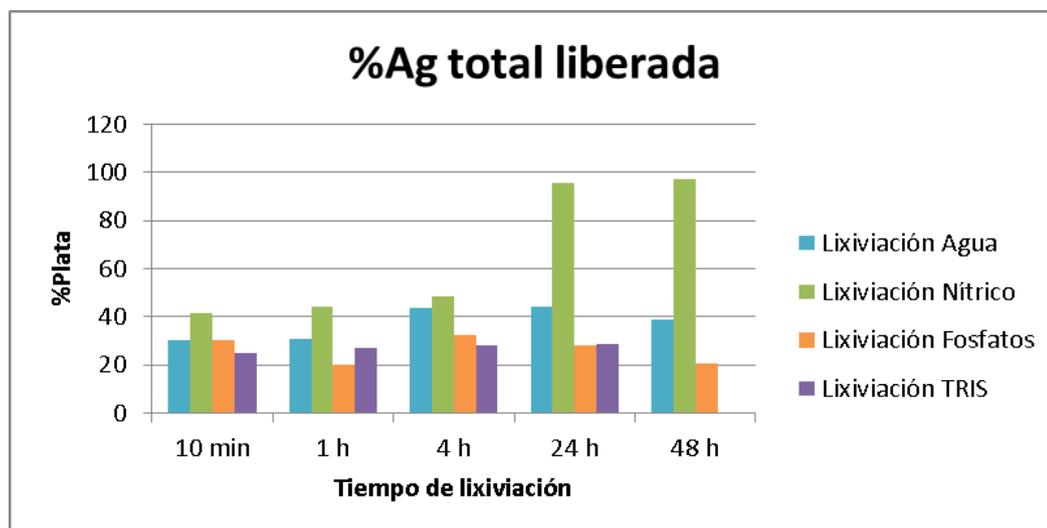


Gráfico 5: Comparación Lixivaciones

#### 4.9. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE Ag LIBERADA EN MEDIOS DE CULTIVO

Se muestran los resultados obtenidos para una lixiviación de 24 h. Se observa en la tabla 14 cómo se produce una disminución de la concentración de plata liberada según disminuye la cantidad de suero bovino fetal (FBS) en el medio. Es un efecto que habrá que seguir estudiando. La composición del FBS afecta ya que debe haber algún tipo de interacción con la Ag.

Ag total liberada mg/L sobrenadante		
MEDIO 1 (10 % BFS)	MEDIO 2 (5 % BFS)	MEDIO3 (0 % BFS)
20,41±4,30	10,61±2,80	1,09
% Ag total liberada		
MEDIO 1	MEDIO 2	MEDIO3
19,33±3,64%	9,99±2,91%	1,03%

Tabla 14: Liberación de Ag en medios de cultivo con distinto contenido en BFS (24 h)

#### 4.10. SEPARACIÓN DE PLATA IÓNICA Y DE NANOPARTICULAS DE PLATA MEDIANTE ULTRAFILTRACIÓN

Al utilizar filtros de un determinado tamaño de membrana para ultrafiltrar, por ese filtro únicamente pasa la plata disuelta, la plata iónica. El objetivo de este estudio es saber cuánta plata es accesible, se extrae a un medio acuoso, en forma de Ag(I). Se realizaron ensayos utilizando agua y los tres medios de cultivo como agente lixivante y a una fracción se sometió a ultrafiltración. Son unos estudios orientativos para saber cuánta plata se libera en forma de plata iónica.

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos de la ultrafiltración tras una lixiviación con agua. Como es de esperar, la concentración de plata iónica es menor que la de la plata total liberada, ya que suponemos que la única forma de plata presente en el medio que puede atravesar la membrana de los ultrafiltros 3 kDa es la plata iónica.

Se observa que la mayor parte de la plata liberada es en forma iónica, un 97 %, lo cual indica que de la plata que se libera, y que sería accesible al animal, trasladando este estudio a los procesos de digestión, hay muy poca plata en forma de nanopartícula.

Ag total liberada mg/L	Ag iónica mg/L UF	%Ag iónica frente a Ag liberada
2,00±0,18	1,94±0,69	97%
%Ag total liberada	% Ag iónica UF	
23,71±2,10%	23,02±8,11%	

Tabla 15: Cuantificación de plata iónica liberada en agua por caolín-plata. Ultrafiltración

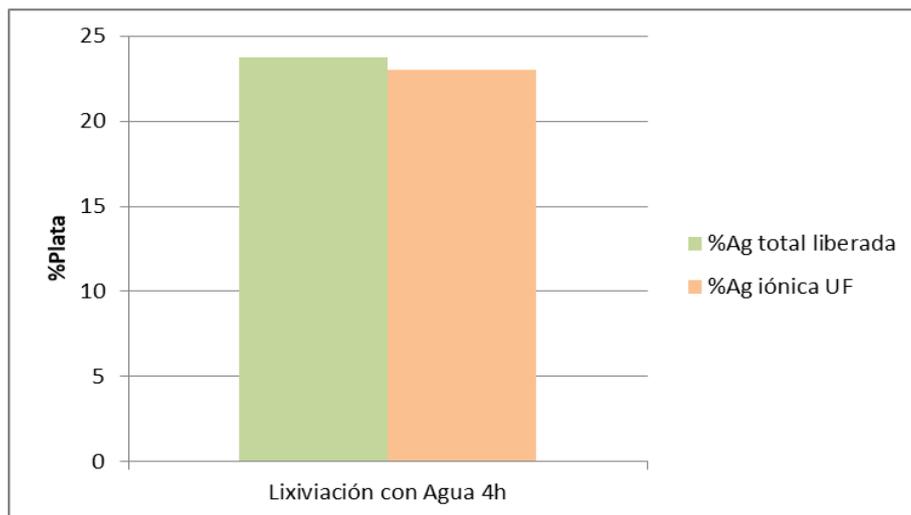


Gráfico 6: Cuantificación de plata iónica liberada en agua por caolín-plata. Ultrafiltración

Se expone además una prueba de ultrafiltración realizada con los tres medios de cultivo. En las siguientes tablas se muestran los resultados alcanzados:

Ag iónica mg/L UF		
MEDIO 1 (10 % BFS)	MEDIO 2 (5 % BFS)	MEDIO3 (0 % BFS)
1,92	0,55±0,01	0,05±0,00
% Ag iónica UF		
MEDIO1	MEDIO 2	MEDIO3
0,71±1,61%	0,51±0,01%	0,05±0,00%

Tabla 16: Cuantificación de plata iónica liberada en medios de cultivo por caolín-plata. Ultrafiltración

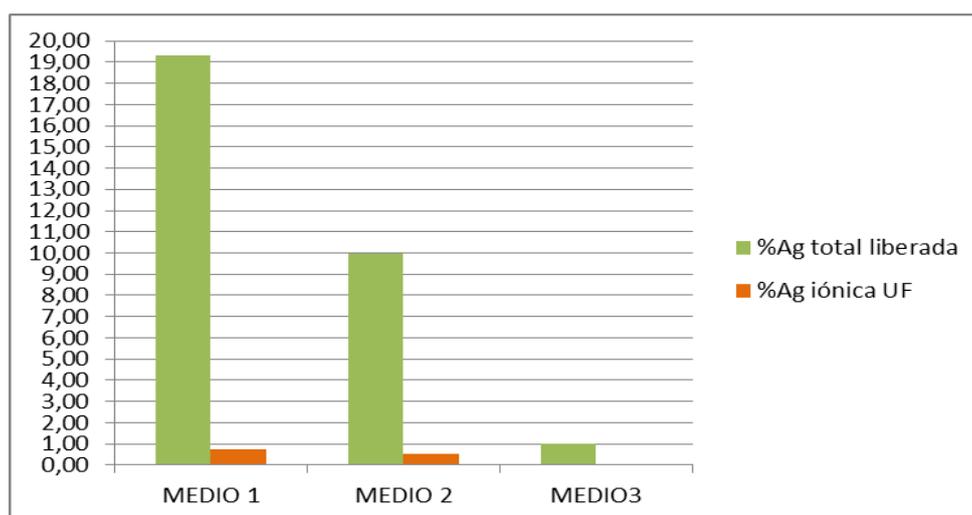


Gráfico 7: Cuantificación de plata iónica liberada en medios de cultivo por caolín-plata. Ultrafiltración

En principio estos ensayos deberán ser realizados de nuevo y de forma más exhaustiva; se observa que el comportamiento es diferente que en agua, ya que la cantidad de plata iónica encontrada es mucho menor; parece que de la plata liberada la mayor parte se queda en forma de

AgNPs. Lo que sí se observa es una tendencia, y es que cuanto mayor es la cantidad de suero bovino fetal presente, la cantidad de plata iónica ultrafiltrada es mayor. Puede que haya algún tipo de interacción con la matriz.

## 5. CONCLUSIONES

A partir de todos los resultados obtenidos en el trabajo se puede concluir que:

- La comparación de distintas formas de preparación de los patrones para realizar la calibración y detección de plata por FAAS indica que no hay diferencias significativas entre los dos métodos probados. Se eligió la forma de preparar la recta que consumía menor tiempo de preparación de la misma.
- Se ha realizado un estudio sobre la estabilidad de patrones de AgNPs empleados y se concluye que son estables después de un cierto tiempo de abiertos los envases; la variación de concentración es inferior al 10% y las recuperaciones cercanas al 100%
- Los estudios de pH y de conductividad realizados al poner en contacto la muestra sólida con agua indican que el pH es ligeramente inferior al del agua desionizada. Mientras que la conductividad disminuye y es menor que la sensibilidad del instrumento empleado. La ligera acidificación y la caída de la conductividad son debidas al tipo de tratamiento al que se somete al caolín.
- La cantidad de plata total que contiene la muestra estudiada es del 0,84%, y se obtuvo mediante ataque con ácido nítrico en caliente y en vaso abierto de teflón.
- Para simular el comportamiento del nanomaterial al ser suministrado a los animales en cuanto a la posible liberación de plata, se concluye que la cantidad de plata liberada en agua aumenta hasta aproximadamente un 40% al cabo de 4 horas de lixiviación y a partir de ahí se mantiene en ese rango de porcentajes. A partir de 4 horas de lixiviación en agua la cantidad de plata liberada se estabiliza.
- Se realizan estudios con otros medios acuosos para comprobar las posibles diferencias en cuanto a la cantidad de plata liberada. Con un medio ácido diluido casi toda la plata se libera; con medio fosfatos en los primeros 10 minutos se libera un 30% de plata, luego decrece. Con medio tamponado y de carácter orgánico (Tris) la tendencia es similar, un 25% se libera en los primeros 10 minutos y luego se mantiene ciertas fluctuaciones.
- Los estudios de liberación de plata se han llevado a cabo en distintos medios estudiando la variable tiempo de lixiviación y se observa que en el caso de agua, la mayor cantidad de plata liberada se produce a las 4 h siendo el tiempo óptimo, mientras que para los otros medios se libera la plata rápidamente y pasado el tiempo no aumenta ostensiblemente la liberación del analito.
- El estudio de liberación de plata en medios de cultivo que contienen suero bovino fetal (FBS), muestra una correlación positiva entre la cantidad de plata liberada y la cantidad de FBS del medio de cultivo. Esta tendencia se ha estudiado para un tiempo de lixiviación de 24 h.
- Se han llevado a cabo estudios de separación de plata iónica y nanopartículas de plata mediante ensayos de ultrafiltración, resultando que la mayor parte de la plata liberada en agua es plata iónica, y que la mayor parte de la plata liberada es en forma de nanopartícula en el caso de medios de cultivo. No obstante, este estudio debe continuar y ampliarse en posteriores estudios.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Gómez, M. Nanomateriales, nanopartículas y síntesis verde. *Repertorio de Medicina y Cirugía*, **2018**, 27(2), 75-80.
2. Claudia, D., López, M., Elia, D., & Múzquiz, M. Nanopartículas : aplicaciones actuales y futuras en la industria alimentaria. *CienciaCierta*, **2016**, (48), 1-9.
3. Shehzad, A., Qureshi, M., Jabeen, S., Aljafary, M. A., & Al-suhaimi, E. Synthesis, characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles using *Rhazya stricta*. *PeerJ*, **2018**, 1-15.
4. Hill, E. K., & Li, J. Current and future prospects for nanotechnology in animal production. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, **2017**, 8(1), 1-13.
5. Wu, W., Zhang, R., McClements, D. J., Chefetz, B., Polubesova, T., & Xing, B. Transformation and Speciation Analysis of Silver Nanoparticles of Dietary Supplement in Simulated Human Gastrointestinal Tract. *Environmental Science & Technology*, **2018**, 52, 8792-8800.
6. Roman, M., Rigo, C., Castillo-michel, H., Munivrana, I., Vindigni, V., Mi, I. Hydrodynamic chromatography coupled to single-particle ICP-MS for the simultaneous characterization of AgNPs and determination of dissolved Ag in plasma and blood of burn patients. *Anal Bioanal Chem*, **2016**, 408, 5109-5124.
7. Fröhlich, E. E., & Fröhlich, E. Cytotoxicity of Nanoparticles Contained in Food on Intestinal Cells and the Gut Microbiota. *International Journal of Molecular Sciences*, **2016**, 17.
8. Singh, M., Singh, S., Prasad, S., Gambhir, I.S. Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, **2008**, 3(3), 115-122.
9. Bakowski, M., Kiczorowska, B., Samolinska, W., Klebaniuk, R. & Lipiec, A. Silver and Zinc nanoparticles in animal nutrition. *Ann. Anim. Sci.*, **2018**, 18(4), 879-898.
10. Unión Europea. Reglamento N° 1831/2003, De 22 de septiembre de 2003, sobre los aditivos en la alimentación animal. Diario oficial de la Unión Europea, 18 de octubre de 2003.
11. Fondevila, M, Herrer, R., Casallas, M. C., Abecia, L., & Duchá, J. J. Silver nanoparticles as a potential antimicrobial additive for weaned pigs. *Animal Feed Science and Technology*, **2009**, 150, 259-269.
12. Laborda, F., Bolea, E., Cepriá, G., Gómez, M. T., Jiménez, M. S., Pérez-arantegui, J., & Castillo, J.R. Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples. *Analytica Chimica acta*, **2016**, 904, 5-33.

13. Rautela, A., Rani, J. & Debnath, M. Green synthesis of silver nanoparticles from *Tectona grandis* seeds extract: characterization and mechanism of antimicrobial action on different microorganisms. *Journal of Analytical Science and Technology*, **2019**, *10*, 1-10.
14. Sadik, O. A., Du, N., Kariuki, V., Okello, V., & Bushlyar, V. Current and Emerging Technologies for the Characterization of Nanomaterials. *ACS Sustainable Chem. Eng.*, **2014**, *2*, 1707-1716.
15. Cuadros-Moreno, A., Casañas, R., y San Martín-Martínez, E. Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Lat. Am. J. Phys. Educ.*, **2014**, *8*(4), 1-5.
16. Vidmar, J., Buerki-Thurnherr, T. & Loeschner, K. Comparison of the suitability of alkaline or enzymatic sample pre-treatment for characterization of silver nanoparticles in human tissue by single particle ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **2018**, *33*, 752-761.
17. Gallegos, W., Vega, M., Noriega, P. Espectroscopía de absorción atómica con llama y su aplicación para la determinación de plomo y control de productos cosméticos. *La Granja, Revista de ciencias de la vida*, **2012**, *15*(1), 18-25.
18. Wu, H.Z., Meng, L. F. Flame atomic absorption spectrometry determination of silver nanoparticles in environmental waters using dispersive liquid-liquid microextraction. *Applied Ecology and Environmental Research*, **2018**, *16*(5), 5705-5714.
19. Choleva, T.G., Tsogas, G.Z. & Giokas, D.L. Determination of silver nanoparticles by atomic absorption spectrometry after dispersive suspended microextraction followed by oxidative dissolution back-extraction. *Talanta*, **2019**, *196*, 255-261.
20. Sirirat, N., Kornrawee, T. & Siripinyanond, A. Application of thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry for investigation of silver nanoparticles. *Anal Bional Chem*, **2017**, *409*, 1887-1894
21. Panyabut, T. et al. Use of electrothermal atomic absorption spectrometry for size profiling of gold and silver nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, **2018**, *100*, 75-84.
22. Hernandez, D., Cepriá, G., Laborda, F. y Castillo, J.R. Detection and determination of released ions in the presence of nanoparticles: Selectivity or strategy?. *Electroanalysis*, **2019**, *31*(2), 405-410.
23. Li, J. et al. Anti-bacterial properties of ultrafiltration membrane modified by graphene oxide with nano-silver particles. *Journal of Colloid and Interfaces Science*, **2016**, *484*, 107-115.
24. Lopez-Sanz, S., Rodríguez, N., Rodríguez, R.C. y Ríos, A. Analytical strategy based on asymmetric flow field flow fractionation hyphenated to ICP-MS and complementary

techniques to study gold nanoparticles transformations in cell culture medium, *Analytica Chimica Acta*, **2019**, *1053*, 178-185.

25. Meisterjahn, B., Wagner, S., Von der Kammer, F. & Hofmann, T. Silver and gold nanoparticle separation using asymmetrical flow-field flow fractionation: Influence of run conditions and of particle and membrane charges. *Journal of Chromatography A*, **2016**, *1440*, 150-159.
26. Gruszka, J., Zambrzycka-Szelewa, E., Kulpa, K.S. & Godlewska-Zylkiewicz, B. Discrimination between ionic silver and silver nanoparticles in consumer products using graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **2018**, *33*(12), 2133-2142.
27. Trujillo, C. *Ensayos de bioaccesibilidad de nanocompuestos a base de plata* (Trabajo de fin de master). Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España. **2017**

## Anexo I

### Comparación de las Rectas de calibrado según método de preparación.

Recta calibrado 1						
Concentración (mg/L)	Patrón Ag(I) de 100mg/L (g)	HNO <sub>3</sub> 1% (g) *	Concentración obtenida (mg/L)	Promedio	SD	% DSR
0	0,0000	10,0347	0,00	0,000	0,0000	-
1	0,1040	10,0013	1,03	0,049	$8,50 \cdot 10^{-18}$	$1,73 \cdot 10^{-14}$
2	0,2087	10,0221	2,07	0,087	0,0015	1,75
3	0,2926	10,3458	2,81	0,134	0,0006	0,43
4	0,4540	10,0108	4,50	0,212	0,0015	0,72
5	0,5146	10,0319	5,09	0,243	0,0006	0,24

Tabla 1.1. Recta de calibrado enrasando con HNO<sub>3</sub> al 1%

Recta calibrado 2							
Concentración (mg/L)	Patrón Ag(I) de 100mg/L (g)	HNO <sub>3</sub> 10% (g) **	H <sub>2</sub> O (g) ***	Concentración obtenida (mg/L)	Promedio	SD	% DSR
0	0,0000	1,0353	10,0181	0,00	0,002	0,0000	0,00
1	0,1115	1,1202	10,0587	1,10	0,055	0,0000	0,00
2	0,2023	1,2928	10,0464	2,00	0,097	0,0010	1,03
3	0,3136	1,3183	10,0276	3,11	0,149	0,0006	0,39
4	0,4099	1,3776	10,0328	4,06	0,180	0,0015	0,85
5	0,5227	1,5794	10,0081	5,19	0,243	0,0011	0,47

Tabla 1.2. Recta de calibrado empleando HNO<sub>3</sub> 10% y enrasando con H<sub>2</sub>O

\* Cantidad total tras añadir HNO<sub>3</sub> 1 %. Son los gramos totales contando el patrón.

\*\* No es la cantidad de HNO<sub>3</sub> 10% añadida, sino la cantidad que hay tras ello, se tiene en cuenta los gramos de patrón.

\*\*\* Es la cantidad total que obtenemos de la disolución tras añadir agua milliQ.

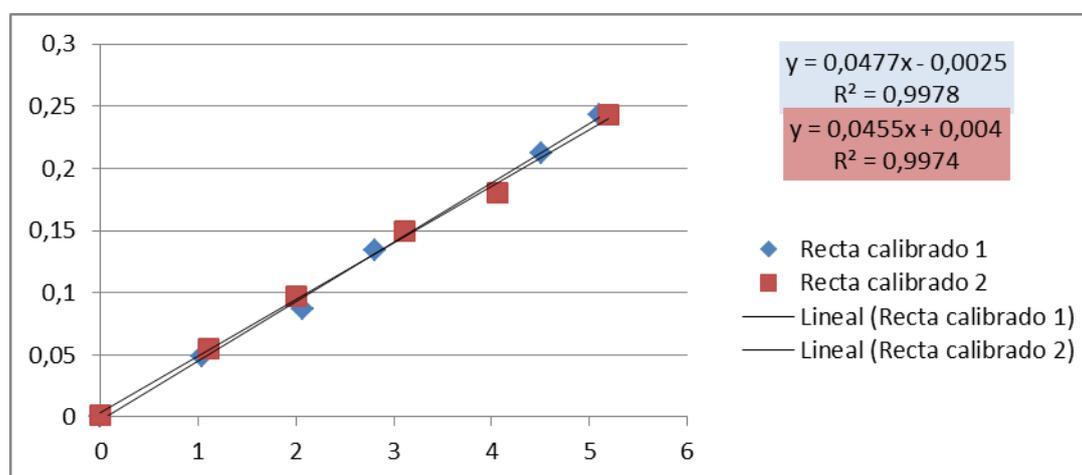


Gráfico 1.1. Comparación de las rectas de calibrado

## Anexo II

*Preparación de muestras para la determinación del contenido total. Medida por FAAS.*

Muestras	Caolín (g)	HNO <sub>3</sub> 50% (g)
B1	-	3,0092
B2	-	3,0001
R1 C2	0,1042	3,1131
R2 C2	0,1027	3,1098
R1 C3	0,1015	3,1135
RC C3	0,1041	3,1068

*Tabla 2.1. Preparación de las muestras en los vasos de Teflón*

Concentración (mg/L)	Patrón Ag 100mg/L (g)	V TOTAL HNO <sub>3</sub> (g)	Concentración obtenida (mg/L)	Promedio	SD	% DSR
Blanco	-	10,0204	0,00	0,000	0,0005	226,40
1	0,1125	10,0165	1,12	0,030	0,0013	4,30
2	0,2284	10,0258	2,27	0,063	0,0003	0,50
3	0,3166	10,0258	3,14	0,087	0,0015	1,70
4	0,4133	10,023	4,10	0,114	0,0016	1,40
5	0,5211	10,0213	5,17	0,144	0,0024	1,70

*Tabla 3.2. Preparación Recta de calibrado y sus correspondientes medidas por absorbancia*

	Concentración obtenida (mg/L)	Concentración en sobrenadante	Miligramos	mg/g
B1	0,02	0,85	0,0051	-
B2	0,05	2,62	0,0262	-
R1 C2	-	-	-	-
R2 C2	-	-	-	-
R1 C3	1,77	86,05	0,8605	8,48
R2 C3	1,81	87,09	0,8709	8,37
			<b>PROMEDIO</b>	<b>8,42</b>

*Tabla 2.3. Resultados obtenidos del contenido total de Ag*

## Anexo III

### *Ejemplo de preparación de muestras para la liberación de plata a distintos tiempos en agua. Medidas por FAAS.*

En este anexo se muestran las tablas que se han manejado para la preparación de disoluciones a distintos tiempos y con el agua como agente lixivante. De igual forma se realizaron para los demás ensayos de lixiviación.

Tiempo lixiviación	Caolín (g)	H <sub>2</sub> O (g)
10 min		
R1	0,0519	50,0033
R2	0,0501	50,0150
1 h		
R1	0,0503	50,0134
R2	0,0515	50,0192
4 h		
R1	0,0519	50,0018
R2	0,0522	50,0246
24 h		
R1	0,0550	50,0129
R2	0,0507	50,0177
48 h		
R1	0,0507	50,0325
R2	0,0527	50,0274

Tabla 3.1. Preparación de muestras con agente lixivante Agua por pesada

	Sobrenadante (g)	HNO <sub>3</sub> 1% (g) *
10 min		
Blanco	1,0199	3,0296
R1	1,0315	3,0722
R2	1,0058	3,0372
1 h		
Blanco	1,0221	3,0214
R1	1,0119	3,0139
R2	1,0283	3,0283
4 h		
Blanco	1,0105	3,1459
R1	1,0050	3,0576
R2	1,0567	3,0313
24 h		
Blanco	1,2199	3,3137
R1	1,0719	3,0882
R2	1,0016	3,0266

48 h		
Blanco	-	-
R1	1,0235	3,0169
R2	1,0325	3,0276

*Tabla 3.2. Dilución de las muestras tras la centrifugación*

\* El peso que muestra la columna de HNO<sub>3</sub> 1% no es la cantidad de nítrico añadida, sino el peso total tras ello.

En el caso de los medios de cultivo en vez de HNO<sub>3</sub> 1% sería agua milliQ, realizando una dilución 1:5, y no 1:2 como en el resto de los caso.

Si se tratara de las muestras que se van a ultrafiltrar la tabla 3.2. sería igual, lo único que encontraríamos valores de Sobrenadante alrededor de 0,500g, para que la dilución fuese 1:5 en HNO<sub>3</sub> al 1%.

	Concentración obtenida (mg/L)	Concentración Sobrenadante (mg/L)	Miligramos	% Plata
10 min				
Blanco	-	-	-	-
R1	0,87	2,58	0,1291	29,55
R2	0,87	2,62	0,1310	31,04
1 h				
Blanco	0,03	0,08	-	-
R1	0,83	2,48	0,1240	29,26
R2	0,94	2,76	0,1381	31,83
4 h				
Blanco	0,23	0,72	0,0362	-
R1	1,44	4,39	0,2193	50,18
R2	1,14	3,27	0,1635	37,20
24 h				
Blanco	0,14	0,37	-	-
R1	1,54	4,44	0,2220	47,93
R2	1,15	3,48	0,1740	40,74
48 h				
R1	0,99	2,93	0,1468	34,37
R2	1,31	3,83	0,1917	43,19

*Tabla 3.3. Resultados obtenidos de la plata total liberad*