



Departamento de
Química Analítica
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado

Estudio del comportamiento de nanomateriales en suplementos alimenticios mediante Cromatografía Hidrodinámica

Marina Teresa García Atance

Dirección: María Sierra Jiménez García-Alcalá
Departamento de Química Analítica, Laboratorio GEAS
Universidad de Zaragoza, 2019



Abreviaturas empleadas

NP: Nanopartícula

AgNPs: Nanopartículas de plata

EAA-llama: Espectroscopia de Absorción Atómica en llama

FM: Fase móvil

HDC: Cromatografía hidrodinámica

ICP-MS: Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente

PA: Penicilamina

PI: Patrón interno

tr: tiempo de retención

LD: Límite de detección

LC: Límite de cuantificación

SDS: Dodecilsulfato de sodio

SEM: Microscopía electrónica de barrido

ÍNDICE

Resumen	
1. Introducción.....	1
1.1 Caracterización de nanopartículas mediante EAA-llama.....	1
1.2 Caracterización de nanopartículas mediante Cromatografía Hidrodinámica.....	2
1.3 Caracterización de nanopartículas mediante Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente.....	3
2. Objetivos y planteamiento del trabajo.....	4
3. Parte experimental.....	4
3.1 Instrumentación: Aparatos y materiales.....	4
3.2 Reactivos, disoluciones patrón y muestras.....	4
3.3 Procedimientos.....	6
4. Resultados y discusión.....	10
4.1 Determinación y caracterización de especies de Ag por EAA-llama e ICP-MS.....	10
4.1.1 <i>EAA-llama</i>	
4.1.1.1 Patrones AgNPs: Ag total y Ag ⁺ con ultrafiltración.....	11
4.1.1.2 Muestras de suplementos alimenticios: Ag total y Ag ⁺ con ultrafiltración.....	13
4.1.2 <i>ICP-MS</i>	
4.1.2.1 Patrones AgNPs: Ag ⁺ con ultrafiltración.....	14
4.2 Caracterización de AgNPs mediante HDC.....	15
4.2.1 <i>Optimización de la fase móvil</i>	
4.2.1.1 Fase móvil 1.....	15
4.2.1.2 Fase móvil 2.....	17
4.2.1.3 Fase móvil 3.....	17
4.2.1.4 Fase móvil 4.....	18
4.3 Caracterización de AgNPs y Ag ⁺ mediante HDC-ICP-MS.....	19
4.3.1 <i>Optimización de la fase móvil</i>	
4.3.1.1 Fase móvil A.....	20
4.3.1.2 Fase móvil B.....	21
4.3.1.3 Fase móvil C.....	22
4.3.2 <i>Muestras de suplementos alimenticios: cuantificación simultánea de AgNPs y Ag⁺ mediante HDC-ICP-MS.....</i>	23
5. Conclusiones.....	24
6. Bibliografía.....	25
Anexos	

Resumen

En la actualidad, las nanopartículas de plata (AgNPs) son ampliamente comercializadas en el mercado mundial debido a sus diversas propiedades. Entre ellas destaca su actuación como agente antibacteriano, lo que las hace aptas para la desinfección de dispositivos médicos, tratamiento de aguas o recubrimiento de fibras textiles.

Por lo tanto, el estudio y caracterización de las AgNPs y especies derivadas es importante para comprender y controlar su síntesis y aplicaciones; así como para tomar conciencia de posibles efectos tóxicos y/o nocivos para el medioambiente y la salud humana. Además, es interesante conocer la posible transformación de AgNPs en Ag^+ que puede tener lugar en el medioambiente.

En este trabajo se ha utilizado la técnica de Espectroscopia de Absorción Atómica en llama (EAA-llama) para la determinación y caracterización de especies de plata en patrones de AgNPs y en suplementos alimenticios. Para caracterizar las diferentes especies de Ag se ha realizado la separación física de AgNPs y Ag^+ mediante la técnica de ultrafiltración, previamente a su determinación por EAA-llama. Además, se ha llevado a cabo la caracterización de AgNPs de 10, 20, 40 y 60 nm mediante Cromatografía Hidrodinámica (HDC) con detección UV-VIS, y se han optimizado las fases móviles empleadas teniendo en cuenta los parámetros cromatográficos y de recuperación obtenidos. Por último, se ha llevado a cabo la caracterización de AgNPs y Ag^+ directamente mediante HDC-ICP-MS, poniendo interés en conseguir una eficiente separación entre los distintos tamaños de AgNPs y la Ag^+ . En base a estos resultados, se ha procedido a la cuantificación de AgNPs y Ag^+ en suplementos alimenticios mediante HDC-ICP-MS.

Abstract

Nowadays, silver nanoparticles (AgNPs) are widely sold in the market due to their diverse properties. Among them, its performance as an antibacterial agent stands out, which makes them suitable for disinfection of medical devices, water treatment or textile fiber coating.

Therefore, the study and characterization of AgNPs and derived species is important to understand and control their synthesis and applications; as well as to become aware of possible toxic or harmful effects on the environment and human health. In addition, it is interesting to know the possible transformation of AgNPs into Ag^+ that could take place in the environment.

In this work, the Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS) technique has been used for the determination and characterization of silver species in AgNPs patterns and food supplements. To characterize the different species of Ag, the physical separation of AgNPs and Ag^+ has been accomplished using the ultrafiltration technique, prior to its determination by FAAS. Moreover, the characterization of different sizes of AgNPs (10, 20, 40 and 60 nm) has been carried out using Hydrodynamic Chromatography (HDC) with UV-VIS detection, and mobile phases used for that have been optimized taking into account chromatographic and recovery parameters obtained. Finally, the characterization of AgNPs and Ag^+ has been carried out directly using the HDC-ICP-MS technique, putting interest in achieving an efficient separation between the different sizes of AgNPs and Ag^+ . Based on these results, the quantification of AgNPs and Ag^+ in food supplements was performed using HDC-ICP-MS.

1. Introducción

El uso de la Nanotecnología por el ser humano no es nada nuevo, de hecho ésta ya era empleada en tintes para fibras y tejidos alrededor del año 2600 a.C¹. Sin embargo, no sería hasta mucho más tarde, en el año 1959, cuando el científico Richard Feynman comenzaría a suscitar el interés por la Nanotecnología², incluso antes de haberse acuñado dicho término (lo cual sucedería en 1974 gracias al japonés Norio Taniguchi), durante una conferencia llamada “Existe mucho espacio en el fondo”. Aunque este nuevo campo no alcanzaría su máximo potencial hasta 1981, con el desarrollo del microscopio de efecto túnel a manos de Gerd Binnig y Heinrich Rohrer³ (Premio Nobel en Física en el año 1986), el cual permitió observar la materia a nanoescala.

Desde ese momento, el uso de nanopartículas y nanomateriales en productos comerciales se ha incrementado exponencialmente, teniendo numerosas aplicaciones en los campos de aeronáutica, construcción, cosmética, automovilística, medicina, ingeniería, electrónica⁴... El motivo de ello son sus singulares propiedades físicas y químicas, tales como su elevada relación área superficial-volumen, su alta resistencia mecánica y su efecto de confinamiento cuántico⁵.

Pero, ¿a qué llamamos nanomateriales? Según la Comisión Europea, un Nanomaterial es todo aquel material natural, secundario o fabricado que contiene partículas en estado disperso o en forma de agregado o aglomerado, y en el que al menos un 50% de las partículas en la granulometría numérica poseen una o más dimensiones externas en el rango de tamaños comprendido entre 1 nm y 10 nm⁷. Para que sirva como comparación, el diámetro de un átomo de carbono es de aproximadamente de unos 0,25 nm⁴. En casos específicos y justificados por preocupaciones medioambientales, sanitarias, de seguridad o de competitividad, el umbral de la granulometría numérica del 50% puede ser sustituido por un umbral comprendido entre el 1% y el 50%⁶.

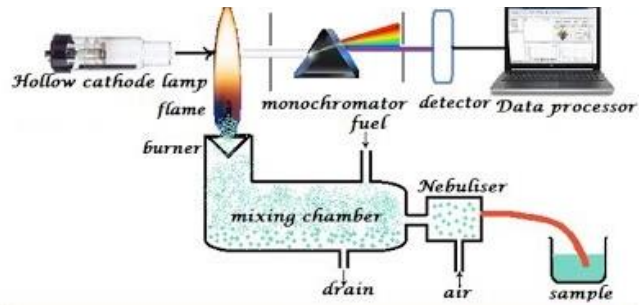
La detección, caracterización y cuantificación de nanomateriales inorgánicos puede llevarse a cabo mediante diversas técnicas. Como técnicas de separación en flujo continuo destacan la Cromatografía Hidrodinámica (HDC), la electroforesis capilar (CE) y en gel (GE), el fraccionamiento en flujo mediante campos (FFF), además de varios tipos de Cromatografía líquida como la de exclusión (SEC), de fase reversa y de intercambio catiónico. Por otro lado, para la cuantificación de NPs se emplean técnicas de espectrometría atómica tales como: Espectroscopía de Absorción Atómica Electrotérmica (ETAAS), Espectroscopia de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-OES) y Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS)⁷.

En este trabajo se pone el foco sobre las nanopartículas de plata (AgNPs) debido a su gran presencia en el mercado. Su principal uso es como agente antibacteriano en recipientes para el almacenamiento de comida, recubrimientos textiles, tratamiento de aguas, así como en otras aplicaciones medioambientales⁸. En tiendas ecológicas, se comercializan como antimicrobianos, antifúngicos e incluso antibióticos para contribuir a la mejora de las defensas del cuerpo; este es el caso de los tres suplementos alimenticios para consumo humano que van a estudiarse.

1.1 Caracterización de nanopartículas mediante EAA-llama

Esta técnica está basada en la absorción de radiación de los átomos formados en una llama a partir de una muestra líquida. En el atomizador de llama, la muestra se nebuliza mediante un flujo de gas oxidante (acetileno en este trabajo) mezclado con un combustible también gaseoso (aire) y se lleva hacia una llama donde ocurre la atomización⁹. Estos átomos formados son irradiados por la LCH

Fig.1 Esquema del funcionamiento de EAA-llama



(lámpara de cátodo hueco) con luz de una determinada longitud de onda en función del elemento químico que vaya a determinarse, de forma que estos átomos son excitados y la cantidad de radiación que absorben será proporcional a la concentración de analito presente en la muestra líquida.

Para el estudio de Ag en muestras medioambientales se han empleado diversos métodos, entre los que se encuentran técnicas espectrométricas y electroterómicas^{10,11}. Sin embargo, como método rutinario de menor complejidad instrumental y bajo coste destaca la EAA-llama, permitiendo la determinación de iones metálicos. Aunque el análisis directo de trazas puede llegar a ser complicado debido a la baja sensibilidad de esta técnica, y a menudo son necesarios tratamientos previos de preconcentración¹². Un ejemplo de ello es el empleo reciente de la técnica de EAA-llama para la determinación de Ag^+ en muestras medioambientales empleando la extracción en punto de nube (CPE) para su preconcentración¹³. En este trabajo se hace uso de la EAA-llama con LCH de Ag (irradia a $\lambda = 328,07 \text{ nm}$) puesto que va a determinarse la absorción de átomos de Ag^+ .

1.2 Caracterización de nanopartículas mediante Cromatografía Hidrodinámica

La Cromatografía Hidrodinámica (HDC) es una técnica empleada para la separación y determinación del tamaño de partículas, la cual no requiere interacciones físicas o químicas: cada partícula tiene asociado un determinado tiempo de elución de acuerdo a su tamaño efectivo. Conforme el fluido atraviesa la columna empaquetada con partículas no porosas, la velocidad cerca de las paredes es inferior a la existente en la región central¹⁴. Por razones de geometría, las NPs de mayor tamaño estadísticamente se sitúan preferentemente en la región central, por lo que salen antes de la columna mientras que las de menores tamaños se encuentran cercanas a la pared del capilar, se ralentizan y por ello salen más tarde de la columna¹⁵. El mecanismo de separación también puede verse afectado por efectos estéricos, interacciones con la pared y fuerzas externas como la gravedad¹⁶.

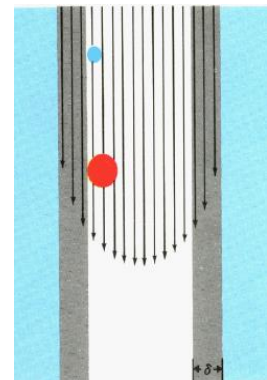


Fig. 2 Separación por tamaños en el interior de la columna

Esta técnica tiene similitudes con la Cromatografía de exclusión, así como con la técnica de Fraccionamiento de flujo de campo. Sus principales ventajas son su capacidad para separar especies de acuerdo únicamente a su tamaño y su sencillez de manejo y equipamiento. Sus desventajas son la baja resolución, la necesidad de corregir la dispersión de los picos cromatográficos y de calibración de la intensidad de la señal según el tamaño.

Posee muchas aplicaciones, como por ejemplo la determinación de Ag disuelta y la simultánea caracterización de AgNPs en la sangre y el plasma de pacientes que sufren de quemaduras empleando HDC-ICP-MS¹⁷. Además, también acoplada a ICP-MS se le ha dado uso para el análisis de AgNPs en aguas superficiales, y de TiO_2NPs y ZnONPs en protectores solares comerciales¹⁸.

El tándem HDC-ICP-MS también ha sido utilizado con éxito para determinar la localización de AgNPs en lodos de depuradora¹⁹.

En este trabajo va a emplearse HDC como técnica de separación para AgNPs de 10, 20, 40 y 60 nm, cuya detección se llevará a cabo con un detector UV-VIS de diodos en array acoplado.

1.3 Caracterización de nanopartículas mediante Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente

La Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) se ha perfeccionado hasta convertirse en una de las técnicas actuales más importantes para el análisis elemental, debido a sus bajos límites de detección para la mayoría de los elementos, su alto grado de selectividad y sus razonablemente buenas precisión y exactitud. En estas aplicaciones, la introducción de la muestra en forma de disolución se realiza mediante un nebulizador (el empleado en este trabajo es de flujo cruzado) y el atomizador e ionizador es una antorcha de plasma acoplado por inducción.

Mediante ICP-MS pueden determinarse más del 90% de los elementos de la tabla periódica y se logran tiempos de medida de 10 segundos por elemento, con límites de detección de 0.1 a 10 ng/mL para la mayoría de ellos⁹.

En los últimos años, el estudio de la distribución de tamaños de NPs se ha llevado a cabo satisfactoriamente empleando la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente en el modo de detección individual de partículas (SP-ICP-MS). Además, se ha demostrado que la técnica SP-ICP-MS puede ser empleada para el análisis de especies de NPs e iones libres metálicos en disolución²⁰. En este estudio, el análisis de AgNPs y Ag^+ se realiza mediante HDC-ICP-MS, que aúna las propiedades de separación de la HDC ya comentadas con la elevada sensibilidad del ICP-MS. Ya había antecedentes de procedimientos similares en el estudio de AuNPs y Au^{3+} , para los que se había empleado la Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplada a ICP-MS^{21,22}.

En este trabajo va a emplearse ICP-MS para la cuantificación de pequeñas concentraciones de Ag^+ en patrones de AgNPs de 10, 20, 40 y 60 nm; separándola previamente de las AgNPs mediante ultrafiltración. El motivo es que la técnica de ICP-MS es capaz de detectar los elementos presentes en una muestra que contiene un nanomaterial, pero no es capaz de proporcionar información acerca del estado físico-químico del elemento (por ejemplo, si se presenta como especie disuelta o en forma de partículas) o información relacionada con las NPs (forma, tamaño, estado de agregación...). Por ello, en diversos estudios se ha combinado la técnica de ICP-MS con métodos de separación previos tales como la ultrafiltración, la extracción en fase sólida, la extracción en punto de nube... con el fin de obtener información adicional acerca de especies solubles o de las NPs²³.

Fig. 3 Esquema de la instrumentación de HDC

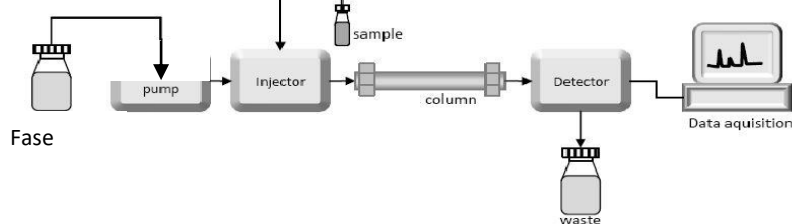
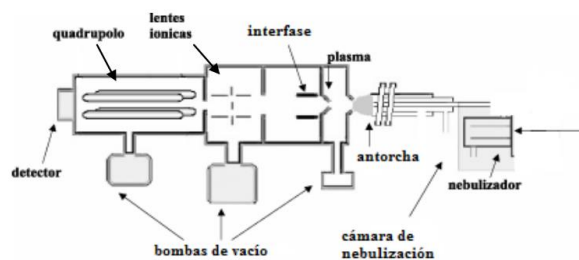


Fig. 4 Esquema de un equipo de ICP-MS



A causa de ello, se estudiarán los parámetros cromatográficos y la recuperación para distintas fases móviles empleadas en la separación de AgNPs de 10, 20, 40 y 60 nm mediante la técnica de HDC acoplada a ICP-MS (HDC-ICP-MS). Con la fase móvil considerada óptima, se procederá a determinar simultáneamente el contenido de AgNPs y Ag⁺ en suplementos alimenticios, así como el tamaño medio de las AgNPs.

2. Objetivos y planteamiento del trabajo

El objetivo fundamental de este trabajo es la caracterización de nanopartículas de plata (AgNPs) de diferentes tamaños y especies derivadas, utilizando diferentes técnicas analíticas (EAA-llama, HDC e ICP-MS) con el fin de determinar las distintas especies en muestras de suplementos alimenticios.

Este objetivo general puede dividirse en los objetivos específicos a continuación descritos:

- Búsqueda de información bibliográfica relacionada con AgNPs así como con NPs en general y su caracterización mediante HDC y diversas técnicas acopladas a ICP-MS, destacando el tándem HDC-ICP-MS.
- Determinación y caracterización de especies de plata mediante EAA-llama (con y sin ultrafiltración como etapa previa) en patrones de AgNPs y suplementos alimenticios, y mediante ICP-MS para patrones de AgNPs. Evaluación estadística de los resultados y comparación intralaboratorio y con valores especificados por el fabricante.
- Caracterización de AgNPs mediante HDC con detección UV-VIS. Valoración de parámetros cromatográficos y recuperaciones, y optimización de distintas fases móviles para la separación de AgNPs de 10, 20, 40 y 60 nm.
- Caracterización de AgNPs y Ag⁺ mediante HDC-ICP-MS. Valoración de parámetros cromatográficos y optimización de distintas fases móviles para una eficiente separación entre las AgNPs de diámetros 10, 20, 40 y 60 nm y la Ag⁺. Aplicación de esos resultados a la cuantificación de AgNPs y Ag⁺ en suplementos alimenticios mediante HDC-ICP-MS.

3. Parte experimental

3.1 Instrumentación: Aparatos y materiales

Los instrumentos, aparatos y materiales empleados para la realización de este trabajo se encuentran descritos en los apartados A.1, A.2 y A.3 de Anexos.

3.2 Reactivos y disoluciones

3.2.1 Patrones

- 10 nm Silver Nanosphere. Nanoxact 0,02 mg/mL, 25 ml (Nanocomposix, San Diego, EE.UU.)
- 20 nm Silver Nanospheres. Nanoxact 0,02 mg/mL 25 mL (Nanocomposix, San Diego, EE.UU.)
- 40 nm Silver Nanospheres, citrate. Nanoxact 0,02 mg/mL, 25 mL (Nanocomposix, San Diego, EE.UU.)
- 60 nm Silver Nanospheres, citrate. Nanoxact 0,02 mg/mL, 25 mL (Nanocomposix, San Diego, EE.UU.)

Estos cuatro estándares de nanopartículas siempre deben sonicarse antes de su uso durante al menos 5 minutos con el fin de evitar su aglomeración.

- Plata estándar para ICP-MS 994 ± 3 mg/L (Sigma-Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania)
- Patrón de Rh para ICP-MS de 1001 ± 6 mg/L (Fluka Analytical, Suiza)

3.2.2 Reactivos

- Ácido nítrico (HNO_3) 69-70% (J.T. Baker, Phillipsburg, EE.UU.)
- Dodecilsulfato de sodio (SDS) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.)
- Formaldehído 35-40% (Probus, Barcelona, España)
- Tiocianato de amonio (NH_4SCN) (PanReac AppliChem, ITW Reagents, Castellar del Vallès, Barcelona, España)
- Hidrogenofosfato de sodio (Na_2HPO_4) (Sigma-Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania)
- D-Penicilamina 96-101% (Sigma-Aldrich Chemie, Stenheim, Alemania)

3.2.3 Muestras

Biovedik²⁴

Según instrucciones del fabricante, esta muestra con un contenido en plata iónica y coloidal de 25 mg/L, se prepara a partir de agua desionizada y plata pura al 99,9%. El método de fabricación emplea baja corriente y bajo voltaje (aproximadamente 30 V), lo cual hace posibles los tamaños muy reducidos de las partículas. Se emplea como antibiótico natural, presuntamente sin efectos secundarios, y se ingiere de forma oral en ayunas. Es distribuido por: Alex Healthy and Natural Pvt Ltd, Puducherry, India



Fig. 5 Botella comercial de Biovedik

High Stability²⁵

Según las especificaciones del fabricante, está constituida por agua ultrapura y plata coloidal de grado médico, con un tamaño de partícula entre 0,6 y 5 nm y una concentración en plata de 10 mg/L. Se produce empleando corriente eléctrica y un método de purificación de agua de 9 pasos. Este spray es antibacteriano, antiviral y antifúngico, además de un potente catalizador antimicrobiano. Se emplea vía tópica u oral. Es producido en: Rivers of Health Ltd, Dorset, UK.



Fig. 6 Botella comercial de High Stability

Wellness²⁶

Según las instrucciones del fabricante, se trata de una suspensión de plata coloidal en agua destilada producida mediante un proceso eléctrico. La concentración especificada de plata de esta muestra es de 30 mg/L y el rango de tamaños de sus AgNPs abarca de 1 a 100 nm. Su función es mejorar las defensas del cuerpo en períodos de estrés físico y se administra vía oral durante períodos de tiempo cortos. Este suplemento es producido por: Source Naturals, California, EE.UU.



Fig. 7 Botella comercial de Wellness

Previamente a su utilización, todo el material de trabajo se sumerge en una disolución al 10% (v/v) de HNO_3 en agua ultrapura (Milli-Q) durante un mínimo de 24h. Transcurrido ese tiempo, se aclara con agua ultrapura y se deja secar al aire antes de darle uso.

Todas las disoluciones empleadas se han preparado a partir de los reactivos y patrones citados anteriormente, utilizando agua ultrapura obtenida a partir de agua tratada con un purificador Millipore (modelo Q-POD, Millipore Corporation, Massachusetts, EE.UU).

Las disoluciones se preparan por pesada en la balanza de precisión para poder calcular concentraciones exactas, puesto que las micropipetas poseen elevadas incertidumbres. Para la densidad de todas las disoluciones se ha supuesto la del agua: 1 g/mL.

3.3 Procedimientos

3.3.1 Caracterización de patrones de AgNPs mediante EAA-llama

Para llevar a cabo la adecuada caracterización, en primer lugar se determinó el **contenido en plata total** de los patrones de AgNPs. De acuerdo con el fabricante, su contenido total de Ag es de 20 mg/L. Para ello, se procedió a oxidar los patrones de los distintos tamaños de AgNPs (10, 20, 40 y 60 nm) con HNO_3 para que toda la plata existente se encontrase en su forma iónica (Ag^+).

Se preparó una recta de calibrado partiendo de un patrón de Ag^+ comercial de concentración 994 ± 3 mg/L. La recta se construyó con concentraciones de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 mg/L de Ag^+ en un volumen 15 mL con HNO_3 al 1%. Primero fue necesaria una dilución intermedia a 100 mg/L de Ag^+ en 5 mL de agua destilada y a partir de ahí se prepararon las disoluciones de la recta tomando volúmenes de 0; 0,15; 0,30; 0,46; 0,60 y 0,76 mL respectivamente de Ag^+ 100 mg/L, a los que se añadieron 0,15 mL de HNO_3 , para luego enrasar hasta un volumen de 15 mL con agua ultrapura Milli-Q.

Para la preparación de las AgNPs, se diluyeron los patrones comerciales de concentración 20 mg/L hasta 3 mg/L para no superar el rango lineal. Además, con esa concentración nos encontramos cerca del centroide de la recta, que es el punto de menor incertidumbre de la misma. El motivo es que la incertidumbre del valor interpolado, según las ecuaciones matemáticas empleadas para su cálculo²⁷, es menor hacia el centro de la recta; además de que extrapolando más allá de los puntos usados para el calibrado, se aumentan la incertidumbre y los riesgos de entrar en una región donde la recta de calibrado ya no sea lineal. Así pues, para la dilución se tomaron 0,75 mL de cada uno de los patrones, se atacaron con un volumen equivalente (0,75 mL) de HNO_3 y se dejaron reposar durante una hora. Después, se enrasó hasta un volumen final de 5 mL.

Por último, se midieron las disoluciones con la técnica de EAA-llama.

Con objeto de comprobar el grado de oxidación de las AgNPs de los patrones comerciales, se procedió a realizar una ultrafiltración, técnica que permite separar Ag^+ y AgNPs; para así poder determinar el **contenido en plata iónica** de los patrones de AgNPs. El procedimiento de preparación de la recta de calibrado fue el mismo que se acaba de mencionar en la determinación del contenido de Ag total: en este caso las concentraciones empleadas fueron 0, 0,5, 1, 2, 3 y 4 mg/L, se preparó una disolución intermedia de Ag^+ de 100 mg/L a partir del patrón comercial y se añadieron respectivamente 0; 0,072; 0,15; 0,30; 0,44 y 0,6 mL de ella, además de 0,15 mL de HNO_3 , para luego enrasar hasta los 15 mL con agua Milli-Q.

Para llevar a cabo la ultrafiltración, en primer lugar se activaron los cartuchos de ultrafiltración llenándolos con agua Milli-Q y sometiéndolos a centrifugación durante 10 minutos a 9000 rpm. Una vez hecho esto, se vació el agua Milli-Q de los cartuchos para evitar la dilución de las muestras y se procedió a llenarlos con las disoluciones patrón de AgNPs de 10, 20, 40 y 60 nm. Se realizó también el proceso de ultrafiltración con un patrón de Ag^+ de 10 mg/L, con objeto de poder calcular la recuperación del proceso de ultrafiltración. Se centrifugaron las disoluciones durante 10 minutos a 9000 rpm, después de este proceso las AgNPs quedan retenidas por la membrana y la Ag^+ (de menor tamaño), pasa a la parte inferior del cartucho.

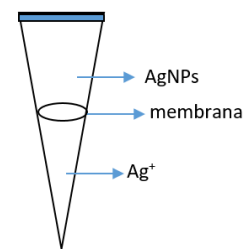


Fig. 8 Cartucho de ultrafiltración

Se tomaron 0,5 mL de la disolución inferior de cada cartucho, se añadieron 0,05 mL de HNO_3 (el ácido debe añadirse después de la ultrafiltración, ya que de lo contrario estropea la membrana del cartucho) y se enrasó a 5 mL. Haciendo la suposición de que todo se filtrase, tomando este volumen se consigue diluir los 20 mg/L de Ag de los patrones de AgNPs como mínimo hasta 2 mg/L y los 10 mg/L de Ag^+ a 1 mg/L, de forma que todas las medidas entren dentro del rango lineal de la recta preparada.

Por último, se midieron las disoluciones con la técnica de EAA-llama. Los parámetros del instrumento empleados en cada una de las medidas se especifican en la Tabla A.1 de Anexos.

3.3.2 Determinación del contenido de AgNPs y Ag^+ en suplementos alimenticios mediante EAA-llama

Para cuantificar las especies de plata de las tres muestras comerciales descritas en el apartado 3.2.3, Biovedik, Wellness y High Stability, se procedió de forma muy similar a la empleada con los patrones de AgNPs. Primero se preparó una recta de calibrado con disoluciones de concentración 0, 1, 2, 3, 4 y 5 mg/L de Ag^+ al 1% de HNO_3 en 15 mL. Para ello se preparó una disolución intermedia de 100 mg/L de Ag^+ y para preparar cada punto se tomaron de ella volúmenes de 0; 0,15; 0,31; 0,47; 0,60 y 0,74 mL, respectivamente.

En cuanto al tratamiento de muestra para la **determinación de plata total**, se tomaron disoluciones de cada suplemento de aproximadamente 3 mg/L de Ag en 5 mL. La concentración especificada por el fabricante de cada suplemento, así como los volúmenes tomados, se reflejan en la Tabla A.2 de Anexos.

La cantidad tomada de cada suplemento se atacó con un volumen equivalente de HNO_3 , se dejó reposar durante una hora y se enrasó con agua Milli-Q hasta llegar al volumen final especificado en la tabla, obteniendo disoluciones de concentración cercana a 3 mg/L.

Tras esto, se llevó a cabo la ultrafiltración de las tres muestras comerciales para separar las especies de Ag y poder llevar a cabo la **determinación de plata iónica**. Primero se activaron los cartuchos como ya se ha comentado, y luego se centrifugaron las muestras comerciales durante 10 minutos a 9000 rpm. También se realizó la ultrafiltración de un patrón de Ag^+ de 20 mg/L para estudiar la recuperación. Tras la ultrafiltración, se llevó a cabo la dilución de las fracciones inferiores (suponiendo que toda la plata se filtrase) para conseguir que la concentración de las muestras fuera como máximo de 3 mg/L, y la de Ag^+ de 2 mg/L con un 1% de HNO_3 , y entrasen dentro del rango de calibración. Puesto que la concentración especificada por el fabricante de cada suplemento era diferente, se tomaron las cantidades especificadas en la Tabla A.3 de Anexos. En último lugar, se midieron en el espectrofotómetro empleando los parámetros que se detallan en la Tabla A.4 de Anexos.

3.3.3 Determinación del contenido de Ag⁺ en patrones de AgNPs mediante ultrafiltración e ICP-MS

Para llevar a cabo esta determinación, se preparó una recta de calibrado de Ag⁺ al 1% de HNO₃ de concentraciones: 0 ; 0,01 ; 0,05 ; 0,08 ; 0,1 y 0,2 mg/L. Para ello, realizó una dilución intermedia a Ag⁺ de 2 mg/L al 1% de HNO₃ a partir del patrón comercial y de esta disolución se tomaron 0; 245; 1.229; 2.011; 2.534 y 5.041 µL, se añadieron 500 µL de HNO₃ en todos los casos y se enrasó hasta los 50 mL con agua Milli-Q.

Una vez preparada la recta, se activó la membrana de los cartuchos de ultrafiltración con agua Milli-Q y después se centrifugaron durante 10 minutos a 9000 rpm los patrones de AgNPs de 20 mg/L de tamaños 10, 20, 40 y 60 nm, además de una disolución de Ag⁺ de 20 mg/L preparada a partir del patrón comercial de 994±3 mg/L para poder estudiar la recuperación obtenida con los cartuchos.

Una vez hecha la ultrafiltración, se tomaron 50 µL de la fracción inferior y se llevaron con agua Milli-Q hasta un volumen de 10 mL; en el caso de Ag⁺ se añadieron además 100 µL de HNO₃ con el fin de asegurar su estabilidad. Por tanto, y suponiendo que toda la Ag se filtrase, la concentración máxima de todas las disoluciones estudiadas sería de 0,1 mg/L y estaría dentro del rango de concentraciones que abarca la recta de calibrado.

Para hacer una determinación con el ICP-MS, es necesaria su previa optimización según las recomendaciones del fabricante. La optimización general se realiza con una disolución recomendada por el fabricante que contiene In, U, Mg, Ba y Ce en concentración de 10 µg/L, para así obtener unos niveles de óxidos e iones divalentes lo más bajos posibles y una mejor sensibilidad. Para controlar esos parámetros, como óxido se mide el CeO y como ion divalente el Ba²⁺, el porcentaje de ambos debe ser inferior al 3% para poder considerar las condiciones como adecuadas.

Posteriormente, se debe seleccionar el elemento a medir (los dos isótopos de plata ¹⁰⁷Ag y ¹⁰⁹Ag) y optimizar el voltaje de la lente con un patrón de Ag⁺ de concentración 10 µg/L al 1% (v/v) de HNO₃, con el fin de focalizar los iones hacia la lente de iones con las menores pérdidas posibles en el paso a través interfase situada entre el plasma y el analizador de masas. Además, con esta disolución también se optimiza el flujo de gas de nebulización.

Para el análisis cuantitativo se empleó un patrón interno de Rh de 0,01 mg/L con el fin de corregir posibles efectos de imprecisión. Su preparación fue a partir de un patrón comercial de 10 mg/L del cual se tomaron 50 µL y se llevaron hasta los 50 mL.

El software *ELAN*, empleado para controlar los ajustes, los parámetros y el funcionamiento del ICP-MS, realizó la recta de calibrado y la interpolación de los valores de intensidad obtenidos para los patrones de AgNPs y Ag⁺.

3.3.4 Caracterización de patrones de AgNPs mediante HDC

La cromatografía hidrodinámica, como ya se ha comentado, resulta muy útil en la separación de nanopartículas en función de su tamaño.

Para llevar a cabo esta caracterización, es necesario como primer paso la preparación de la fase móvil escogida. Para ello se pesan los distintos componentes, se mezclan en la botella de plástico y se llena con agua Milli-Q hasta un volumen de 1 L. Las cantidades pesadas para cada una de las fases móviles empleadas se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 1. Pesadas reales de los componentes de las distintas fases móviles para HDC

	SDS	Formaldehído	Na ₂ HPO ₄	Tritón X-100	NH ₄ SCN	PA
FM 1	0,1380 g	0,5925 g	0,0754 g	0,5256 g	--	--
FM 2	0,1313 g	0,5044 g	0,0701 g	--	--	--
FM 3	0,1317 g	--	--	--	--	--
FM 4	0,1405 g	--	--	--	0,7906 g	--

Después, se ajusta la FM (Fase móvil) a un pH de 7,5 aproximadamente con HCl y/o NaOH. Es necesario filtrar a vacío dos veces la FM para evitar la entrada de sólidos en la columna del cromatógrafo, y sonicarla durante 10 minutos en un baño de ultrasonidos.

Para el estudio de parámetros cromatográficos, se prepararon disoluciones a partir de los patrones de AgNPs de tamaños 10, 20, 40 y 60 nm; para ello se diluyeron las disoluciones comerciales de 20 mg/L hasta 0,5 mg/L, tomando 150 µL de cada patrón y enrasando hasta un volumen de 6 mL. Después, estas disoluciones se trasvasaron a viales de vidrio y se introdujeron directamente al cromatógrafo, puesto que éste posee un muestreador automático.

Antes de realizar medidas con el cromatógrafo, es necesario su acondicionamiento. Para ello se purga el sistema con el fin de eliminar posibles burbujas, se lava y homogeneiza la jeringuilla de inyección (posee un volumen de 20 µL) y finalmente se acondiciona la columna durante un mínimo de 10 minutos con la fase móvil que se vaya a emplear para las mediciones.

Si el cromatógrafo lleva varios días no operativo, se acondiciona durante unos 30-45 minutos con la fase móvil recomendada por el fabricante (llamada FM1 en este trabajo y comercialmente conocida como Agilent), antes de cambiar a la fase móvil que vaya a estudiarse.

En todos los estudios se utiliza un flujo FM de 1,6 mL/min, el recomendado por el fabricante de la columna.

El software *MassLynx* es el empleado para controlar el funcionamiento del cromatógrafo y obtener los datos de los cromatogramas, así como para visualizarlos en tiempo real.

3.3.5 Caracterización de patrones de AgNPs y Ag⁺ mediante HDC-ICP-MS y cuantificación de AgNPs y Ag⁺ en suplementos alimenticios mediante HDC-ICP-MS

El modo de trabajo con el cromatógrafo es idéntico al que se acaba de describir en el apartado 3.3.4. pero en este caso se utiliza como detector, además del detector UV-VIS (diode array) que lleva el cromatógrafo, el ICP-MS. Para ello, se conecta la salida del detector UV-VIS con la entrada al nebulizador del ICP-MS.

Previamente al acoplamiento con el cromatógrafo, se debe realizar la optimización del ICP-MS según las recomendaciones del fabricante, como ya se ha comentado en el apartado 3.3.4. Hay que tener en cuenta que el flujo de la fase móvil debe ser cero cuando se esté acoplando el cromatógrafo.

Para la caracterización simultánea de AgNPs y Ag⁺ se utilizaron las siguientes fases móviles:

Tabla 2. Pesadas reales de los componentes de las distintas fases móviles para HDC-ICP-MS

	SDS	Formaldehído	Na ₂ HPO ₄	Tritón X-100	NH ₄ SCN	PA
FM A	0,1421 g	0,5129 g	0,0870 g	0,5180 g	--	0,1560 g
FM B	0,1350 g	--	--	--	--	0,1516 g
FM C	0,0964 g	--	--	--	--	0,1476 g

La FM A es similar a la FM 1, a excepción de la adición de Penicilamina. La PA es un α -aminoácido y tradicionalmente ha sido empleado como agente estabilizante para iones de metales pesados²⁸. De acuerdo con la teoría ácido-base de Pearson, el grupo tiol se combina con el ion metálico blando para formar un complejo estable²⁰. Por este motivo y como puede observarse, se ha empleado en la preparación de las tres fases móviles para la caracterización simultánea de AgNPs y Ag^+ por HDC-ICP-MS.

Para la preparación de las disoluciones de los patrones de AgNPs de 10, 20, 40 y 60 nm se tomaron 150 μL de patrón comercial con una concentración especificada de 20 mg/L y se diluyeron con agua Milli-Q hasta un volumen de 6 mL, por lo que su concentración final era de aproximadamente 0,5 mg/L. La disolución de Ag^+ empleada fue de 0,25 mg/L y se preparó con un contenido de 1mM PA por la razón de estabilidad que se acaba de comentar. Para su preparación se partió del patrón comercial de 994 ± 3 mg/L, se realizó una dilución intermedia a 10 mg/L y se tomaron 150 μL de ella enrasando hasta 6 mL con agua Milli-Q. Para conseguir un contenido de 1mM PA en un volumen de 6 mL, se pesaron 0,0009 g de PA comercial.

Con la FM C, que es con la que se obtuvieron los resultados más óptimos, se caracterizaron disoluciones de patrones de AgNPs de 0,25 mg/L (75 μL de patrón comercial en 6 mL de agua Milli-Q) además de una disolución de Ag^+ + 1mM PA de también 0,25 mg/L.

Además, con esta fase móvil se procedió a la cuantificación de AgNPs y Ag^+ en suplementos alimenticios. Las tres muestras comerciales: Biovedik, High Stability y Wellness se diluyeron hasta 0,25 mg/L en un volumen final de 7 mL y puesto que las concentraciones especificadas por los fabricantes de estos tres suplementos difieren, se tomaron los volúmenes detallados en la Tabla A.5 de Anexos.

Para cuantificar el contenido de Ag^+ y AgNPs en estos suplementos, una vez separados por HDC-ICP-MS, el área de los picos obtenidos se interpoló en una recta de calibrado construida con concentraciones crecientes de Ag^+ . Dichas concentraciones fueron: 0 mg/L, 0.1 mg/L, 0.25 mg/L y 0.4 mg/L, todas ellas con un contenido 1 mM de PA con el fin de estabilizar la Ag^+ e impedir interacciones con la columna del cromatógrafo. Para ello se llevó a cabo una dilución intermedia del patrón comercial a 50 mg/L y de esta disolución se tomaron los volúmenes: para el primer punto de 0,1 mg/L se pipetearon 16 μL en 8 mL (con 0,0012 g PA) y para los otros dos, 30 μL y 48 μL respectivamente en 6 mL (con 0,0009 g PA), enrasando en todos los casos hasta el volumen final con agua Milli-Q.

La medición de estos patrones de la recta de calibrado se realizó sin columna. Con las tres muestras de suplementos alimenticios, sí se empleó la columna de HDC para conseguir separar la plata iónica de las nanopartículas.

Finalizadas las mediciones, la obtención de gráficas y tratamiento de resultados fue llevado a cabo con el software *Origin Pro 8*.

4. Resultados

4.1 Determinación y caracterización de especies de Ag por EAA-llama e ICP-MS

4.1.1 EAA-llama

4.1.1.1 Patrones AgNPs: Ag total y Ag⁺ con ultrafiltración

Para llevar a cabo la **determinación de Ag total** en los patrones comerciales de AgNPs y comparar con el contenido especificado por el fabricante (20 mg/L para cada uno de los cuatro tamaños), se construyó una recta de calibrado y se oxidaron disoluciones de AgNPs de 10, 20, 40 y 60 nm para pasar toda la plata a estado iónico y posteriormente determinarla por EAA-llama. El procedimiento seguido se ha detallado en el apartado 3.3.1. Tras la medida con EAA-llama, se obtuvo la siguiente recta de calibrado:

$$y = 0,0353x - 0,0045 \quad R^2 = 0,9917$$

Sus parámetros analíticos se especifican en la siguiente tabla:

Tabla 3. Parámetros analíticos de la recta de calibrado para determinación de Ag total

LD*	0,0935 mg/L
LC**	0,3115 mg/L
Rango lineal	De 0,3115 a 5 mg/L

*Límite de detección **Límite de cuantificación

Los cálculos exactos para la preparación de las disoluciones de la recta, los valores de absorbancia obtenidos con el espectrofotómetro y la gráfica de la recta de calibración se encuentran en el apartado B.1 de Anexos y los resultados de Ag total obtenidos para los patrones de AgNPs se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 4. Concentraciones de Ag total obtenidas para los patrones de AgNPs con sus incertidumbres

	Concentración interpolada (mg/L)	Factor de dilución	Concentración Ag total* (mg/L)	S _{total}	S _{calibración}	S _{instrumental}
10 nm	2,874	6,661	19,14	0,4943	0,4884	0,0759
20 nm	2,761	6,761	18,67	0,5159	0,4997	0,1284
40 nm	2,478	7,288	18,06	0,7906	0,5641	0,5539
60 nm	2,648	7,040	18,64	0,6630	0,5278	0,4013

*Para el cálculo de la concentración total de Ag es necesario multiplicar la concentración interpolada por el factor de dilución puesto que las disoluciones medidas mediante EAA-llama son diluciones de las disoluciones comerciales de AgNPs, con el fin de conseguir que entren dentro del rango de concentraciones de la recta de calibrado. El factor de dilución se calcula dividiendo el volumen final (5 mL aproximadamente) entre el volumen de disolución comercial tomado de la fracción sometida a ultrafiltración (0,75 mL aproximadamente).

Como puede apreciarse, las concentraciones obtenidas no difieren demasiado de los 20 mg/L especificados por el fabricante. Se ha realizado un test t para confirmar si las diferencias son o no significativas, los resultados se recogen en las siguientes tablas:

Tabla 5. Comparación mediante test t de concentración de Ag total obtenida frente a la especificada

	Concentración obtenida (mg/L)	SD	Concentración teórica* (mg/L)	Valor t	Prob.de diferencia aleatoria
10 nm	19,14	0,4996	20	1,71	16,18% > 5%
20 nm	18,67	0,5159	20	2,59	6,09% > 5%
40 nm	18,06	0,7906	20	2,46	7,00% > 5%
60 nm	18,64	0,6630	20	2,05	10,96% > 5%

*Al ser un valor de referencia, se ha considerado la incertidumbre despreciable

Las conclusiones de la pregunta de 2 colas (si los valores difieren significativamente o no) se dan en forma de porcentaje en la última columna de la Tabla 5. Si esta probabilidad es superior al 5%, no se puede afirmar que la diferencia sea real y por tanto la diferencia entre ambos valores no es significativa a un nivel de confianza del 95%. Para los cuatro tamaños de AgNPs se obtuvieron porcentajes superiores al 5% como puede observarse, por lo que la diferencia entre la concentración de Ag total especificada por el fabricante y la obtenida mediante la técnica de EAA-llama no es significativa.

Para llevar a cabo la **determinación de plata iónica** en los patrones comerciales de AgNPs se sometieron a ultrafiltración disoluciones de AgNPs de 10, 20, 40 y 60 nm, además de una disolución de Ag⁺ de 10 mg/L para así poder calcular la recuperación de los cartuchos. El procedimiento seguido se ha detallado en el apartado 3.3.1. Tras la medida con EAA-llama, se obtuvo la siguiente recta de calibrado:

$$y = 0,0685x - 0,0020 \quad R^2 = 0,9976$$

Sus parámetros analíticos se especifican en la siguiente tabla:

Tabla 6. Parámetros analíticos de la recta de calibrado para determinación de Ag⁺

LD	0,0139 mg/L
LC	2,025 mg/L
Rango lineal	De 2,025 a 3,822 mg/L

Los cálculos exactos para la preparación de las disoluciones de la recta, los valores de absorbancia obtenidos con el espectrofotómetro y la gráfica de la recta de calibrado se encuentran en el apartado B.2 de Anexos. Los resultados de concentración de plata iónica obtenidos para los patrones de AgNPs se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 7. Concentraciones de Ag⁺ obtenidas para los patrones de AgNPs con sus incertidumbres

	Concentración interpolada (mg/L)	Factor de dilución	Concentración Ag ⁺ (mg/L)	S _{total}	S _{calibración}	S _{instrumental}
10 nm	0,0288	10,35	0,2980	0,6801	0,6801	0,001
20 nm	0,1018	10,21	1,0395	0,6529	0,6529	0,001
40 nm	0,0288	10,27	0,2956	0,6747	0,6747	0,002
60 nm	0,0288	10,28	0,2960	0,6756	0,6756	0,003
Ag ⁺	0,7738	9,78	7,5650	0,4798	0,4798	0,001

Las concentraciones de Ag⁺ de los patrones comerciales de AgNPs son, como era de esperarse, bajas y pueden deberse en parte al tiempo que llevan los botes abiertos. Como son cantidades tan bajas, inferiores al LC de la técnica de EAA-llama, posteriormente (apartado 4.1.2) se realizaría esta misma determinación pero con el ICP-MS como técnica de detección ya que presenta mayor sensibilidad.

En cuanto a la recuperación de la disolución preparada de 9,63 mg/L de Ag⁺, se calcula como sigue:

$$\%Recuperación = \frac{[Ag\ obtenida]}{[Ag\ real\ preparada]} * 100 = \frac{7,565\ ppm}{9,633\ ppm} * 100 = 78,53\%$$

La recuperación del cartucho es aceptable, la mayoría de la Ag⁺ pasa a través de su membrana.

4.1.1.2 Muestras de suplementos alimenticios: Ag total y Ag⁺ con ultrafiltración

Para llevar a cabo la **determinación de Ag total** en los tres suplementos alimenticios: Biovedik, Wellness y High Stability, se construyó una recta de calibrado y se oxidaron disoluciones de estos suplementos para pasar toda la plata a estado iónico y posteriormente determinarla por EAA-llama, como se ha explicado anteriormente en el apartado 3.3.2. Tras la medida con EAA-llama, se obtuvo la siguiente recta de calibrado: $y = 0,0496x + 0,0037$ $R^2 = 0,9993$

Sus parámetros analíticos se especifican en la siguiente tabla:

Tabla 8. Parámetros analíticos de la recta de calibrado para determinación de Ag total en suplementos

LD	0,0255 mg/L
LC	0,0851 mg/L
Rango lineal	De 0,0851 a 4,9077 mg/L

Los cálculos exactos para la preparación de las disoluciones de la recta, los valores de absorbancia obtenidos con el espectrofotómetro y la gráfica de la recta de calibración se encuentran en el apartado C.1 de Anexos. Los resultados de Ag total obtenidos para los patrones de AgNPs se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 9. Concentraciones de Ag total obtenidas para suplementos alimenticios con sus incertidumbres

	Concentración interpolada (mg/L)	Factor de dilución	Concentración Ag total (mg/L)	S _{total}	S _{calibración}	S _{instrumental}
Biovedik	2,649	8,330	22,06	0,2520	0,2405	0,0751
Wellness	3,875	9,699	37,58	0,3859	0,3581	0,1438
High Stability	4,367	3,306	14,44	0,1417	0,1395	0,0249

Las concentraciones obtenidas difieren algo de las especificadas por el fabricante, siendo éstas: Biovedik (25 mg/L), Wellness (30 mg/L) y High Stability (10 mg/L).

Para llevar a cabo la **determinación de plata iónica** de los tres suplementos comerciales, se empleó la misma recta de calibrado que para la determinación de Ag total puesto que ambos experimentos se llevaron a cabo el mismo día y bajo las mismas condiciones. Se sometieron a ultrafiltración los suplementos y una disolución de Ag⁺ de 20 mg/L para así poder calcular la recuperación de los cartuchos. El procedimiento seguido se ha detallado en el apartado 3.3.2. Los resultados de Ag⁺ obtenidos para las disoluciones de suplementos se especifican en la siguiente tabla:

Tabla 10. Concentraciones de Ag⁺ obtenidas para suplementos alimenticios con sus incertidumbres

	Concentración interpolada (mg/L)	Factor de dilución	Concentración Ag ⁺ (mg/L)	S _{total}	S _{calibración}	S _{instrumental}
Biovedik	1,680	8,194	13,77	0,2538	0,2502	0,04267
Wellness	0,0789	9,891	0,7799	0,4556	0,4530	0,04887
High Stability	1,862	6,155	11,46	0,1850	0,1825	0,03041
Ag ⁺	1,741	9,858	17,16	0,2979	0,2979	0,01284

La recuperación de Ag⁺ en este caso fue de: $\%Recuperación = \frac{17,16 \text{ ppm}}{19,65 \text{ ppm}} * 100 = 87,36\%$

Debido a que las concentraciones de Ag total diferían en cierta medida de las especificadas por el fabricante, se procedió a comparar los resultados obtenidos con los de otro miembro del equipo de investigación (Tabla C.1 de Anexos) y se llegaron a las siguientes conclusiones: En ningún caso son

significativas las diferencias, por lo que los resultados obtenidos con su intervalo de confianza por ambos analistas no difieren estadísticamente; con la excepción de la Ag⁺ en el suplemento Biovedik, para el cual se ha obtenido un valor ligeramente inferior.

4.1.2 ICP-MS

4.1.2.1 Patrones AgNPs: Ag⁺ con ultrafiltración

Como ya se ha comentado en el apartado 4.1.1.1, las concentraciones de Ag⁺ de los patrones comerciales de AgNPs obtenidas mediante EAA-llama son muy bajas, por debajo del LC. Por esta razón se ha repetido la misma determinación empleando el ICP-MS como técnica de detección. El procedimiento experimental ya se ha comentado en el apartado 3.3.3. De los dos isótopos de Ag, el que proporcionó la recta con mayor coeficiente de correlación fue el ¹⁰⁹Ag sin PI y por tanto fue la recta que se empleó para la interpolación de los valores de intensidad de las AgNPs. En la Tabla D.2 de Anexos se muestran las rectas con y sin PI para los dos isótopos de Ag. La recta de calibrado escogida fue:

$$y = 19912x + 274,9 \quad R^2 = 1$$

El patrón de 200 mg/L se salía de escala a causa de la elevada sensibilidad del equipo y no fue incluido.

Los parámetros de la recta fueron:

Tabla 11. Parámetros analíticos de la recta de calibrado para determinación de Ag⁺ en patrones de AgNPs mediante ICP-MS

LD	0,1084 µg/L
LC	0,3613 µg/L
Rango lineal	De 0,3613 a 100 µg/L

En la Tabla D.1 de Anexos se encuentran los datos exactos de las concentraciones de la recta de calibrado.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la Tabla 12. Se ha calculado el porcentaje de Ag⁺ de los patrones de AgNPs con respecto al contenido de Ag total determinado por EAA-llama.

Tabla 12. Concentraciones de Ag⁺ obtenidas para los patrones de AgNPs mediante ICP-MS y contenido Ag total mediante EAA-llama para el cálculo del % Ag⁺

	Concentración interpolada (µg/L)	Factor de dilución	Concentración Ag ⁺ (mg/L)	Concentración Ag total EAA-llama	% Ag ⁺
10 nm	4,236	225,2	0,9540	19,14	4,983
20 nm	0,7660	214,3	0,1642	18,67	0,8796
40 nm	1,214	216,9	0,2633	18,06	1,458
60 nm	0,7050	216,1	0,1523	18,64	0,8172
Ag ⁺	78,53	216,7	17,01	-	-

Se concluye que las AgNPs de 10 nm son las que más contenido en Ag⁺ poseen ya que debido a su diámetro más pequeño se oxidan con mayor facilidad.

Para el patrón de Ag⁺ de concentración conocida sometido a ultrafiltración se obtuvo la siguiente recuperación:

$$\%Recuperación = \frac{17,01 \text{ ppm}}{19,13 \text{ ppm}} * 100 = 88,92\%$$

4.2 Caracterización de AgNPs mediante HDC

4.2.1 Optimización de la fase móvil

Se ha estudiado el efecto de 4 fases móviles diferentes (ver Tabla 13) en la separación de AgNPs de tamaños de 10, 20, 40 y 60 nm. La FM 1 ha sido ampliamente usada en la bibliografía por sus buenos resultados^{29,30}. Por otro lado, con la FM 4 se esperaba que gracias a la presencia del ion tiocianato, éste fuera capaz de formar complejos con la Ag^+ y así separarla de las AgNPs, evitando aglomeraciones³¹.

Cada uno de los componentes de las FM posee una función diferente: el SDS es un surfactante aniónico empleado para conseguir una baja fuerza iónica y se ha demostrado que mejora la línea base, la resolución de los picos y la reproducibilidad al trabajar con columnas capilares. A su vez, el Triton X-100 es un surfactante no iónico que impide la aglomeración, el formaldehído impide la contaminación por bacterias y el Na_2HPO_4 contribuye a mantener constante la fuerza iónica¹⁵.

Tabla 13. Composición de las fases móviles estudiadas mediante HDC

Fase móvil	Composición	pH
Fase móvil 1	0,5 mM de Na_2HPO_4 , 0,013% de SDS, 0,05% de Formaldehído y 0,05% de Triton X-100	7,8
Fase móvil 2	0,5 mM de Na_2HPO_4 , 0,013% de SDS y 0,05% de Formaldehído	7,2
Fase móvil 3	SDS 0,013%	7,7
Fase móvil 4	SDS 0,013% y 10 mM de Tiocianato de amonio	7,3

Además de la FM 1 que es la recomendada por el fabricante de la columna, la FM 2 y la FM 3 habían sido utilizadas previamente por el grupo de investigación, obteniéndose buenos resultados^{32,33}.

Se ha trabajado con disoluciones de 0,5 mg/L de los patrones de AgNPs de los cuatro tamaños, preparadas como se ha comentado en el apartado 3.3.4.

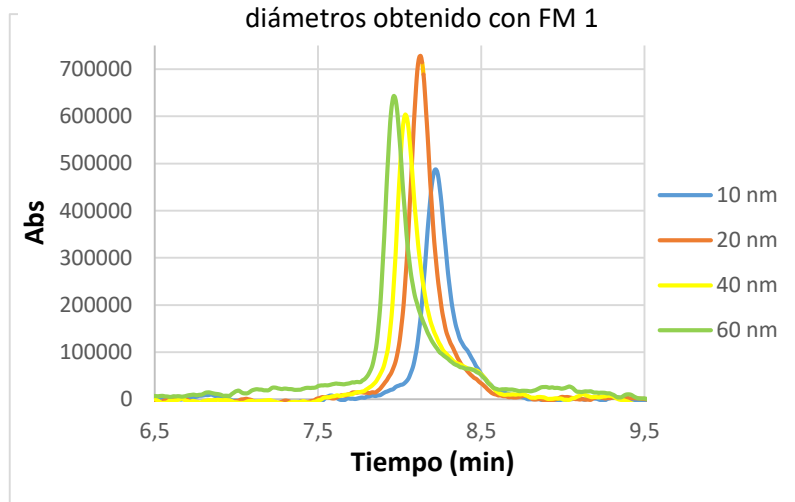
Con todas las FM se ha mantenido la presión de trabajo de la columna en el rango de 1400-1750 psi, inferior a la presión máxima que soporta la columna para un correcto funcionamiento (2200 psi). Las medidas se han realizado en isocrático, es decir empleando una única FM a un caudal constante.

4.2.1.1 Fase móvil 1

El cromatograma obtenido empleando esta fase móvil se muestra ampliado en la Gráfica 1 para poder distinguir los distintos picos y su separación. En el apartado E.1 de Anexos se muestra el cromatograma completo, así como las tablas con los valores numéricos obtenidos para Área y Alturas de cada pico con y sin columna.

Los tiempos de retención (t_r) obtenidos para las AgNPs de 10, 20, 40 y 60 nm son de 8,22 ; 8,14 ; 8,04 y 7,97 min respectivamente. Como era de esperar, las AgNPs de mayor tamaño (60 nm) poseen un menor t_r , es decir, atraviesan la columna con mayor rapidez que las AgNPs de diámetro inferior³⁴. El motivo de este fenómeno es que el flujo laminar en el interior de la columna conduce a un perfil parabólico de velocidades, donde la mayor velocidad se encuentra en el centro del capilar. Por razones de

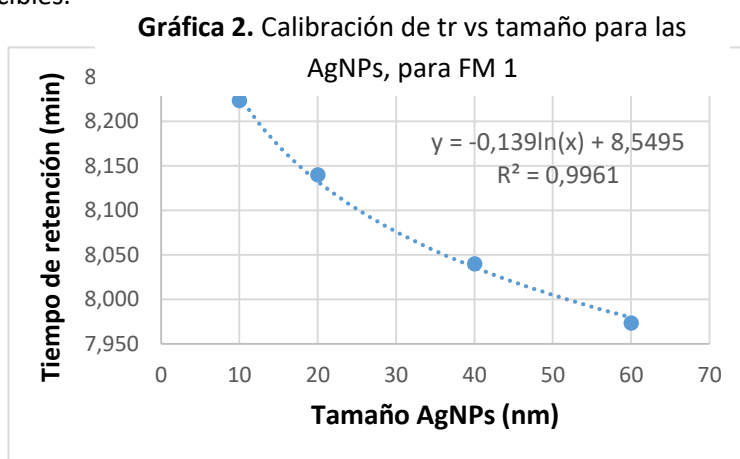
Gráfica 1. Cromatograma ampliado de las AgNPs de distintos diámetros obtenido con FM 1



geometría, las NPs de mayor tamaño estadísticamente se sitúan preferentemente en la región central, mientras que las de menores tamaños se encuentran cercanas a la pared del capilar¹⁵ y por ello salen más tarde de la columna.

En este caso se cumple con lo esperado ya que las AgNPs de 10 nm poseen el mayor tr y las de 60 nm, el menor tr. El % de desviación estándar relativa (%DSR) es muy baja (ver Tabla E.1.2) ya que no supera el 0.3%, por lo que los resultados son muy reproducibles.

Además, se ha realizado una gráfica del tr frente al tamaño de la AgNPs con el fin de obtener una calibración por tamaños, para la que se ha obtenido una buena correlación con el ajuste logarítmico. Los resultados se muestran en la siguiente figura:



Otro parámetro cromatográfico a tener en cuenta

es la resolución entre dos picos consecutivos; si ésta es elevada permite su correcta diferenciación, así como una posible cuantificación empleando área y/o altura de cada pico. Su cálculo se realiza mediante la expresión:

$$R_{ij} = 2 * \frac{(tr_i - tr_j)}{(W_i + W_j)}$$

Siendo W_i y W_j las anchuras de cada pico respectivamente. Los datos de anchuras se presentan en la Tabla E.1.2 de Anexos. Los resultados obtenidos para la Resolución con esta FM son:

Tabla 14. Valores de Resolución entre picos consecutivos de AgNPs, empleando FM 1

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Media
Resolución 10nm-20nm	0,107	0,106	0,104	0,106
Resolución 20nm-40nm	0,178	0,106	0,110	0,131
Resolución 40nm-60nm	0,079	0,078	0,081	0,080

La resolución es pobre en todos los casos, lo cual era de esperar ya que la baja resolución es un punto débil de la técnica de HDC²⁹. Por otro lado, uno de sus puntos fuertes son las elevadas recuperaciones para las NPs obtenidas en HDC en comparación con otras técnicas como AF4 (Asymmetric flow field flow fractionation), lo que significa que las NPs apenas quedan retenidas en el interior de la columna una vez realizada la separación, es decir, no hay pérdidas de NPs. Estos resultados de recuperación se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 15. Valores de Recuperaciones de las AgNPs, empleando FM 1

	10 nm	20 nm	40 nm	60 nm
Recuperación (1)	82,46	101,2	103,0	92,70
Recuperación (2)	108,2	72,11	100,8	84,38
Recuperación (3)	110,6	103,8	102,2	101,9
Media	100,4	92,41	102,1	93,01
SD	15,61	17,64	1,093	8,795
%DSR	15,54	19,08	1,071	9,462

Como se refleja en la tabla, la recuperación de las AgNPs ha sido próxima al 100% en todos los casos. El cálculo de la recuperación se realiza de acuerdo a la siguiente expresión empleada en la bibliografía²⁹:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Señal CON columna}}{\text{Señal SIN columna}} * 100$$

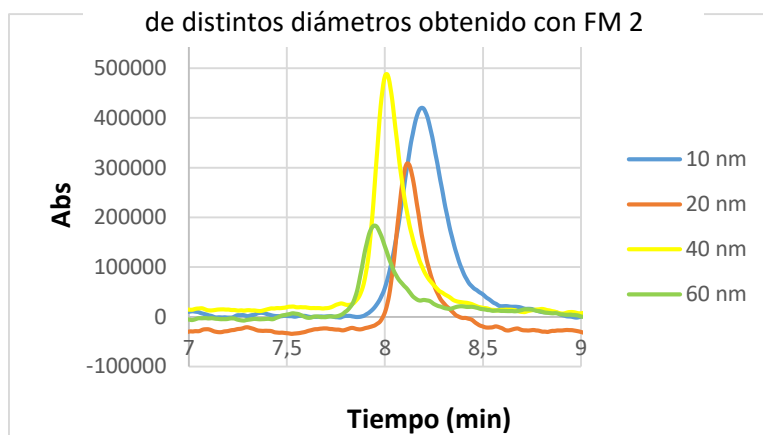
Se ha elegido el cálculo con la señal de las áreas ya que suele ser más reproducible, pero también puede realizarse el cálculo de la recuperación con las alturas.

4.2.1.2 Fase móvil 2

Esta fase móvil es similar a la FM 1, pero se ha eliminado el surfactante no iónico Triton X-100. Según la bibliografía, el Triton X-100 actúa formando micelas alrededor de las NPs gracias a su gran número de grupos oxietileno, y es además un agente reductor y estabilizante frente a AuNPs, por lo que es de suponer un comportamiento similar con AgNPs³⁵. El cromatograma obtenido empleando esta FM 2 se muestra ampliado en la Gráfica 3. En el apartado E.2 de Anexos se muestra el cromatograma completo, así como las tablas con los valores numéricos obtenidos para Área, Altura de cada pico con y sin columna, la anchura y la resolución entre pares de AgNPs para esta FM.

Los tr para las AgNPs de 10, 20, 40 y 60 nm fueron de 8,20 ; 8,11 ; 8,00 y 7,95 min respectivamente, con lo que han disminuido muy ligeramente con respecto a los obtenidos con la FM 1 y sigue habiendo entre ellos aproximadamente la misma diferencia. Esta disminución de los tr se debe a que en esta FM disminuye la fuerza iónica y puesto que las AgNPs tienen carga negativa, son menos retenidas por la doble capa eléctrica que se genera en el relleno de la columna³⁴.

Gráfica 3. Cromatograma ampliado de las AgNPs de distintos diámetros obtenido con FM 2



En cuanto a la calibración por tamaños (Gráfica E.2.2 de Anexos), el ajuste logarítmico es también aceptable, siendo la ecuación: $y = -0,142 \ln(x) + 8,5302$, $R^2 = 0,9976$

La resolución (Tabla E.2.3 de Anexos) entre pares de AgNPs es muy baja como era de esperar (entre 0,08 y 0,18) y similar a la obtenida con la FM 1, existiendo la peor resolución entre las AgNPs de 40 y 60 nm. En cuanto a los valores de recuperación (Tabla E.2.4 de Anexos), se observa que han empeorado bruscamente con la eliminación del surfactante Triton X-100 y en el mejor de los casos se ha obtenido un 58% para las AgNPs de 40 nm, mientras que las de 10 y 60 nm no superan el 30%. Esto era de esperar puesto que sin el efecto estabilizante del Triton X-100, es más probable que las AgNPs hayan quedado retenidas en la columna y por eso las pérdidas son mayores.

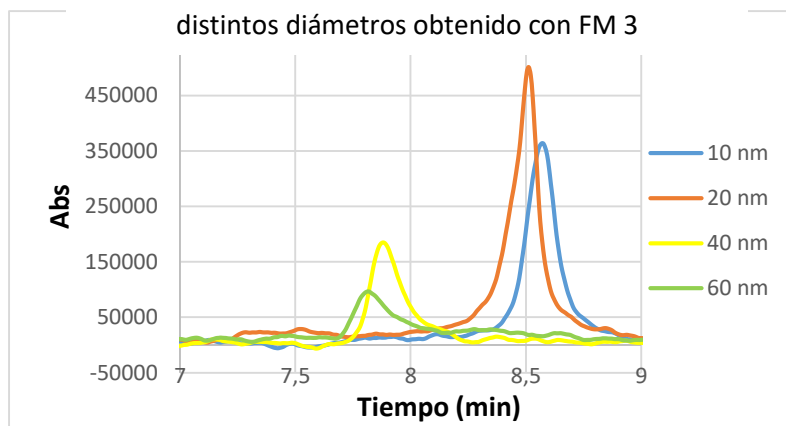
4.2.1.3 Fase móvil 3

Esta FM contiene únicamente 0,013% SDS, que es un componente fundamental en la separación de AgNPs mediante HDC, puesto que se ha demostrado que los surfactantes iónicos como el SDS rodean los núcleos metálicos e impiden su aglomeración gracias a la repulsión electrostática entre las NPs³⁶.

Se ha comparado en estudios el efecto estabilizante para AgNPs del SDS frente a otros surfactantes tradicionales como el DTAB, obteniéndose mejores resultados para el primero³⁷. El cromatograma obtenido empleando la FM 3 se muestra ampliado en la Gráfica 4. En el apartado E.3 de Anexos se muestra el cromatograma completo, así como las tablas con los valores numéricos obtenidos para Área, Altura de cada pico con y sin columna, la anchura y la resolución entre pares de AgNPs para esta FM.

Los t_r para las AgNPs de 10, 20, 40 y 60 nm fueron de 8,05 ; 7,98 ; 7,88 y 7,81 min respectivamente, por lo que han disminuido con respecto a las otras dos FM estudiadas anteriormente debido a que esta FM también posee menor fuerza iónica, teniendo menor capacidad de retención para las AgNPs.

Gráfica 4. Cromatograma ampliado de las AgNPs de distintos diámetros obtenido con FM 3



El ajuste logarítmico del t_r frente al tamaño de las AgNPs proporciona una curva con buen coeficiente de correlación, siendo su ecuación: $y = -0,131 \ln(x) + 8,3595$, $R^2=0,9907$. La gráfica correspondiente se encuentra en el apartado E.3 de Anexos.

En cuanto a la resolución (Tabla E.3.3 de Anexos), ha empeorado considerablemente entre las AgNPs de 10 y 20 nm (de 0,13 a 0,087) y se ha obtenido el mejor resultado hasta el momento para el par de AgNPs de 40 y 60 nm (0,11).

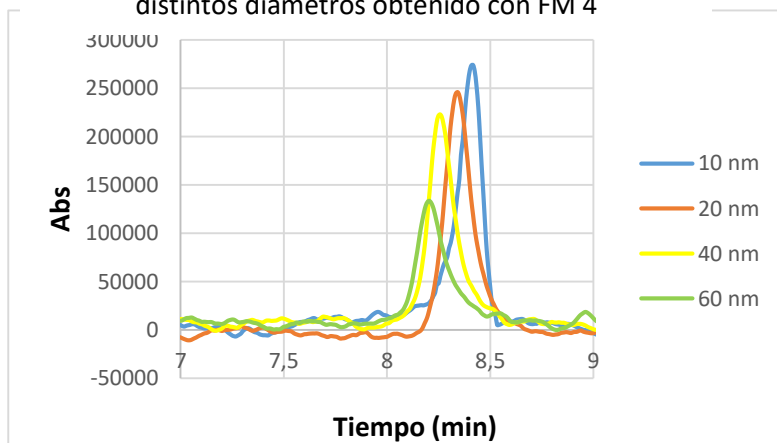
Por otro lado, la recuperación (Tabla E.3.4 de Anexos) para 10 y 20 nm son aceptables (en torno al 75-80%) mientras que para los tamaños superiores son demasiado bajas (inferiores al 30%).

4.2.1.4 Fase móvil 4

Para preparar esta FM se empleó, además de SDS, tiocianato de amonio (NH_4SCN), puesto que un estudio³¹ reveló que el ion tiocianato es capaz de formar complejos con la Ag^+ con lo que se conseguiría evitar aglomeraciones y separarla de las AgNPs. Antes de estudiar esta FM para la separación y caracterización de Ag^+ y AgNPs mediante HDC-ICP-MS (apartado 4.3.1) se estudió su comportamiento frente a las AgNPs empleando únicamente HDC acoplada al detector de UV-VIS.

El cromatograma obtenido empleando la FM 4 se muestra ampliado en la Gráfica 5. Además, en el apartado E.4 de Anexos se muestra el cromatograma completo, así como las tablas con los valores numéricos obtenidos para Área, Altura de cada pico con y sin columna, la anchura y la resolución entre pares de AgNPs para esta fase móvil.

Gráfica 5. Cromatograma ampliado de las AgNPs de distintos diámetros obtenido con FM 4



Los tr para las AgNPs de 10, 20, 40 y 60 nm fueron de 8,38 ; 8,34 ; 8,25 y 8,21 min respectivamente. Se observa han aumentado drásticamente con respecto a las tres FM que ya se han estudiado; este hecho, como se explicará en el siguiente apartado 4.3.1, impedirá en la mayoría de casos una correcta separación de AgNPs y Ag⁺ dado que se solaparían sus tr. Por ello se desecha el uso de tiocianato de amonio para futuros estudios.

La calibración por tamaños (Gráfica E.4.2 de Anexos) proporciona una recta con un coeficiente de correlación peor a los obtenidos anteriormente: $y = -0,098\ln(x) + 8,615$, $R^2=0,9759$

Además, los valores de resolución (Tabla D.4.3 de Anexos) han empeorado considerablemente (no alcanzan el 0,07) y solo entre el par de 20-40 nm se mantienen en la línea de los obtenidos anteriormente. Los valores de recuperación (Tabla E.4.4 de Anexos) para las AgNPs están en el rango del 20-40% siendo insuficientes como para considerar la FM 4 como una buena fase móvil para la separación de AgNPs mediante HDC.

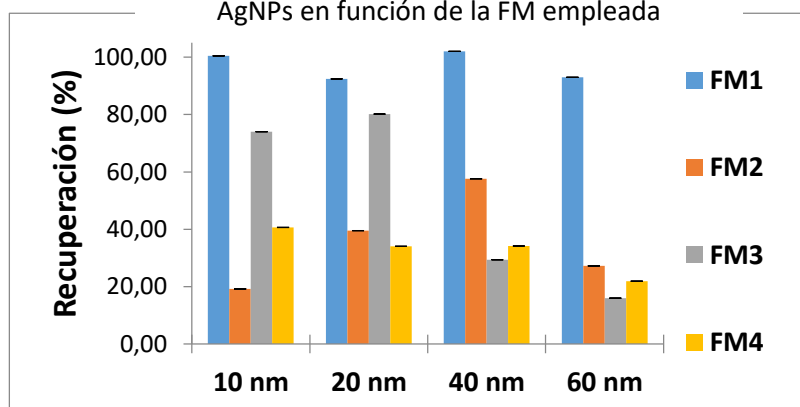
En la Tabla 16 se muestra un resumen de los tr obtenidos para las distintas FM y en la Figura 5 un resumen con las recuperaciones para cada tamaño de AgNPs en función de la FM.

Tabla 16. Resumen de los tr obtenidos para cada tamaño de AgNPs con las FM estudiadas

	tr AgNPs 10 nm (min)	tr AgNPs 20 nm (min)	tr AgNPs 40 nm (min)	tr AgNPs 60 nm (min)
FM1	8,22	8,14	8,04	7,97
FM2	8,20	8,11	8,00	7,95
FM3	8,05	7,98	7,88	7,81
FM4	8,38	8,34	8,25	8,21

Se observa que la fase móvil con mejores recuperaciones es la FM 1, pero puesto que el objetivo fundamental es poder diferenciar entre AgNPs y Ag⁺, en el apartado siguiente se discutirá esta separación.

Figura 9. Porcentajes de Recuperación para las AgNPs en función de la FM empleada



4.3 Caracterización de AgNPs y Ag⁺ mediante HDC-ICP-MS

4.3.1 Optimización de la fase móvil

Acoplando el ICP-MS al cromatógrafo se tiene como objetivo la separación y caracterización de AgNPs y Ag⁺ puesto que empleando el ICP-MS como técnica de detección (a diferencia de cuando se emplea el detector UV-VIS de diodos en array) es posible determinar la Ag⁺. Se ha estudiado el efecto de 3 fases móviles diferentes (ver Tabla 17) en la separación de AgNPs de tamaños de 10, 20, 40 y 60 nm.

Tabla 17. Composición de las fases móviles estudiadas mediante HDC-ICP-MS

Fase móvil	Composición	pH
Fase móvil A	0,5 mM de Na ₂ HPO ₄ , 0,013% de SDS, 0,05% de Formaldehído, 0,05% de Tritón X-100 y 1 mM PA	7,1
Fase móvil B	SDS 0,013% + 1 mM PA	7,5
Fase móvil C	SDS 0,009% + 1 mM PA	7,6

Como puede observarse en la tabla anterior, en estas FM estudiadas se utilizó un contenido 1mM en PA. La adición de PA sirve para estabilizar la Ag⁺ e impedir que quede retenida en la columna, como ya se ha comentado en el apartado 3.3.5. Esta adición de PA ya había sido empleada para la separación de AgNPs y Ag⁺ por electroforesis capilar e ICP-MS²⁰ y por este grupo de investigación para la separación de Au y AuNPs³⁸.

El modo de trabajo es casi idéntico al usado para la caracterización de AgNPs mediante HDC y se ha descrito en el apartado 3.3.5. Se han empleado disoluciones de AgNPs de concentración 0,5 mg/L y de Ag⁺ de 0,25 mg/L, esta última con un contenido 1mM de PA para asegurar la estabilidad.

4.3.1.1 Fase móvil A

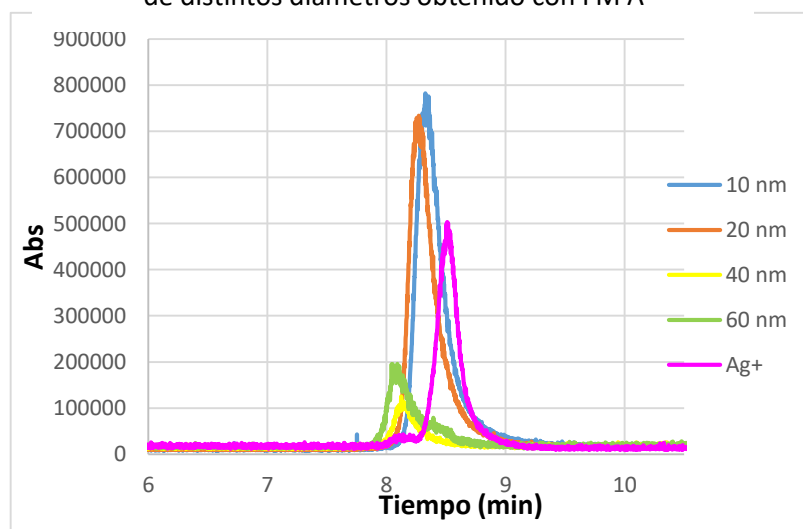
Esta FM es análoga a la FM 1 con la excepción de la adición de PA. El cromatograma obtenido empleando esta FM A se muestra ampliado en la Gráfica 6. En el apartado F.1 de Anexos se muestra el cromatograma completo, así como las tablas con los valores numéricos obtenidos para Área, Altura de cada pico con y sin columna, la anchura y la resolución entre pares de AgNPs y entre las AgNPs de 10nm y la Ag⁺, que es fundamental para una correcta separación de las AgNPs y la Ag⁺. La Ag⁺ tiene un diámetro inferior al de todas las AgNPs, por lo que posee el tr más elevado y en ocasiones su pico puede solaparse con el pico de las AgNPs de menor tamaño estudiadas, las de 10 nm.

Los tr para las AgNPs de 10, 20, 40 y 60 nm fueron de 8,33 ; 8,27 ; 8,14 y 8,08 min respectivamente y para la Ag⁺ es de 8,51 min por lo que, como se puede ver en la Gráfica 7, los picos de las AgNPs de 10 nm y Ag⁺ se encuentran en parte solapados a causa de sus anchuras y sin la ampliación realizada apenas se aprecia su separación. Matemáticamente esto se pone de manifiesto en la mala resolución existente entre las AgNPs de 10 nm y la Ag⁺, de tan solo 0,0890 (Tabla F.1.3 de Anexos). Las resoluciones entre pares de AgNPs no son buenas como ya se ha discutido previamente.

Por otro lado, la calibración por tamaños (Gráfica F.1.2 de Anexos) da como resultado la siguiente ecuación logarítmica: $y = -0,136 \ln(x) + 8,6386$, $R^2 = 0,9988$, obteniéndose un buen coeficiente de correlación.

Los porcentajes de recuperaciones (Tabla F.1.4 de Anexos) son cercanos al 60-80% para la Ag⁺ y las AgNPs de 10 y 20 nm y pésimos para las AgNPs de 40 y 60 nm (menores del 15%). Esto es debido a la

Gráfica 6. Cromatograma ampliado de Ag⁺ y las AgNPs de distintos diámetros obtenido con FM A



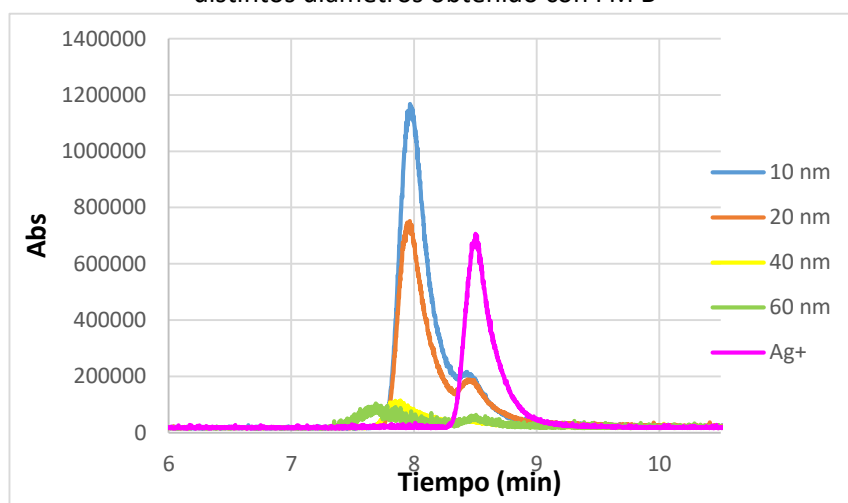
presencia de PA, que empeora la recuperación para las NPs de tamaños más grandes. Así pues, con un incremento en la concentración de PA se produce un aumento del área y la altura de los picos correspondientes a Ag iónica, lo cual indica una buena estabilización de la misma. Pero por otro lado, es necesario buscar un equilibrio en la adición de PA a la FM puesto que un aumento de su concentración produce la disminución del tamaño de los picos de las NPs³⁹, sobre todo para las de mayor tamaño como se ha observado en este caso con las AgNPs, lo que implica que éstas son disueltas o bien permanecen en la columna.

4.3.1.2 Fase móvil B

Esta FM es análoga a la FM 3 pero se ha añadido 1mM de PA para estabilizar la Ag⁺. Se ha empleado esta FM con el objetivo de adelantar los tr de las AgNPs, ya que al tener una menor fuerza iónica será capaz de mejorar la separación entre AgNPs y Ag⁺. El cromatograma obtenido empleando esta FM B se muestra ampliado en la Gráfica 7. En el apartado F.2 de Anexos se muestra el cromatograma completo, así como las tablas con los valores numéricos obtenidos para Área, Altura de cada pico con y sin columna, la anchura y la resolución entre pares de AgNPs y entre las AgNPs de 10nm y la Ag⁺.

Los tr para las AgNPs de 10, 20, 40 y 60 nm fueron de 7,97 ; 7,96 ; 7,88 y 7,67 min respectivamente. Para la Ag⁺ el tr es de 8,50 min, por lo que es casi el mismo que el obtenido con la FM A y al haber disminuido la fuerza iónica de esta FM (sólo contiene SDS y PA), tal y como se había previsto, los tr de las AgNPs han disminuido con respecto a los obtenidos para la FMA y la separación entre los picos de Ag⁺ y AgNPs ha aumentado, como puede apreciarse en la Gráfica 7. En esta gráfica también se observa la existencia de una impureza en las AgNPs de 10 y 20 nm, que aparece en forma de "hombro" a la derecha de cada pico.

Gráfica 7. Cromatograma ampliado de Ag⁺ y las AgNPs de distintos diámetros obtenido con FM B



La resolución entre las AgNPs de 10 nm y la Ag⁺ ha mejorado, alcanzando un valor de 0,233 (ver Tabla F.2.3 de Anexos).

Por otra parte, la calibración por tamaños obtenida representando tr frente al tamaño de las AgNPs (Gráfica F.2.2 de Anexos) ha dado mal resultado por primera vez. La ecuación logarítmica obtenida es la siguiente: $y = -0,154 \ln(x) + 8,3716$, $R^2 = 0,7464$, su coeficiente de correlación es tan bajo que no se podría considerar esta calibración como válida.

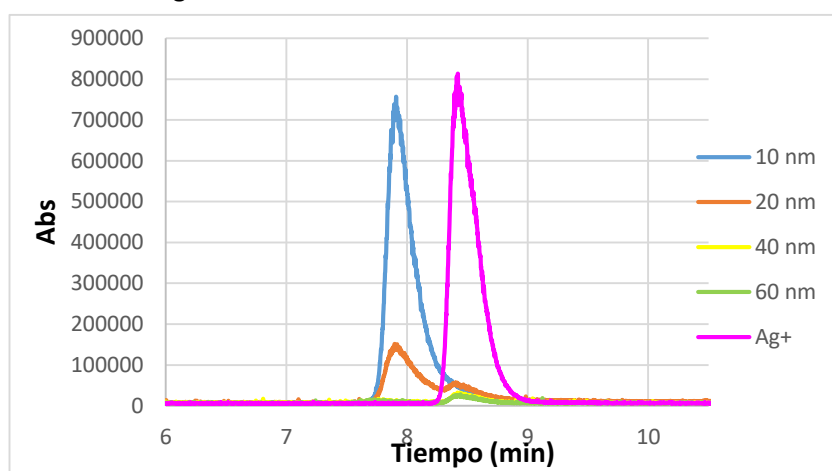
Para esta FM B, los porcentajes de recuperación (Tabla F.2.4 de Anexos) son muy buenos para las AgNPs de 20 nm (aproximadamente del 80%), excelentes para las AgNPs 10 nm y la Ag⁺ (superiores al 100%) pero demasiado bajos para las AgNPs de 40 y 60 nm (menores del 15%) como ya sucedía con la anterior FM.

4.3.1.3 Fase móvil C

Para esta FM se ha disminuido el contenido en SDS del 0,013% al 0,009%, disminuyendo así la fuerza iónica. El cromatograma obtenido empleando esta FM C se muestra ampliado en la Gráfica 8. En el apartado F.3 de Anexos se muestra el cromatograma completo, así como las tablas con los valores numéricos obtenidos para Área, Altura de cada pico con y sin columna, la anchura y la resolución entre pares de AgNPs y entre las AgNPs de 10nm y la Ag⁺.

Gráfica 8. Cromatograma ampliado de Ag⁺ y las AgNPs de distintos diámetros obtenido con FM C

Los tr para las AgNPs de 10, 20, 40 y 60 nm fueron de 7,91 ; 7,80 ; 7,69 y 7,60 min respectivamente, mientras que el tr para la Ag⁺ ha disminuido ligeramente a 8,42 min. Al haber disminuido la fuerza iónica de la FM, las AgNPs han disminuido ligeramente sus tr. En la Gráfica 8 vuelve a aparecer una impureza en las AgNPs de 20 nm en forma de “hombro” a la derecha del pico. Además, el pico de las AgNPs de 40 nm está solapado al de las de 60 nm y no se aprecia en la gráfica.



La resolución entre las AgNPs de 10 nm y la Ag⁺ ha sido la mejor obtenida hasta el momento (0,337). Aun así, las resoluciones entre pares de AgNPs (10nm-20 nm, 20nm-40nm y 40nm-60nm) se mantienen bajas y siguen sin alcanzar el 0,1 (ver Tabla F.3.3 de Anexos).

En este caso, la calibración por tamaños (Gráfica F.3.2 de Anexos) ha dado un buen resultado y la ecuación del ajuste logarítmico es: $y = -0,173 \ln(x) + 8,3188$, $R^2 = 0,9966$

Por último, los porcentajes de recuperación (Tabla F.3.4 de Anexos) están en la línea de los obtenidos con la FM B, siendo algo mejores para las AgNPs de 20 nm (alrededor del 85%) y excelentes para las AgNPs de 10 nm y la Ag⁺ (próximos al 100%). Aunque siguen siendo demasiado bajos para las AgNPs de 40 y 60 nm y en este caso no superan el 5%.

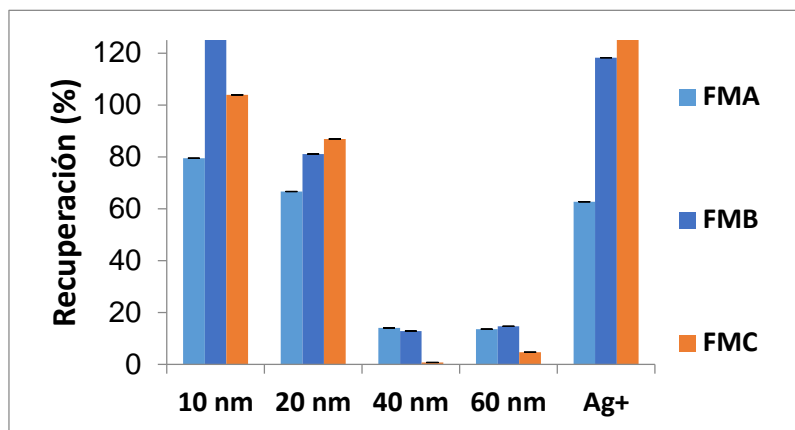
Como resumen final, en la Tabla 18 se muestran todos los tr obtenidos y en la Figura 6 se representan las recuperaciones para cada tamaño de AgNPs y para la Ag⁺ en función de la FM.

Tabla 18. Resumen de los tr obtenidos para las AgNPs y para la Ag⁺ con las FM estudiadas

	tr AgNPs 10 nm (min)	tr AgNPs 20 nm (min)	tr AgNPs 40 nm (min)	tr AgNPs 60 nm (min)	tr Ag ⁺ (min)
FMA	8,325	8,266	8,143	8,080	8,508
FMB	7,972	7,960	7,876	7,669	8,497
FMC	7,915	7,802	7,689	7,600	8,422

En vista de los resultados obtenidos, se eligió la FM C para la cuantificación directa de AgNPs y Ag⁺ en suplementos alimenticios debido a su buen coeficiente de correlación entre tr y tamaños (lo cual es necesario para poder determinar tamaños de AgNPs desconocidos, como se hará a continuación en el apartado 4.3.2), a sus buenas recuperaciones para las AgNPs de 10 y 20 nm y a que con esta FM se obtiene la mejor resolución entre la Ag⁺ y las AgNPs de 10 nm.

Figura 10. Porcentajes de Recuperación para la Ag⁺ y las AgNPs en función de la FM empleada



4.3.2 Muestras de suplementos alimenticios: cuantificación simultánea de AgNPs y Ag⁺ mediante HDC-ICP-MS

Se ha utilizado la FM C para la cuantificación de AgNPs y Ag⁺ en tres muestras comerciales; los suplementos alimenticios Biovedik, High Stability y Wellness. Su preparación, así como la preparación de las disoluciones de la recta de calibrado se ha detallado en el apartado 3.3.5.

Para cuantificar las diferentes especies de Ag de estos suplementos, una vez separados por HDC-ICP-MS, el área de los picos obtenidos se interpoló en una recta de calibrado (Gráfica F.4.1 de Anexos) construida con concentraciones crecientes de Ag⁺. La ecuación de la recta de calibrado es la siguiente: $y = 804,66x - 29965$, $R^2 = 0,9695$. Los cromatogramas de los tres suplementos alimenticios con la media de tres réplicas para los valores de tr, Área, Altura y anchura se encuentran junto a las Gráficas de F.4.2 a F.4.4 de Anexos. Los resultados de concentración obtenidos en la interpolación de las áreas de cada pico en la recta de calibrado se muestran en la Tabla 19 junto a los obtenidos anteriormente (apartado 4.1.1.2) mediante ultrafiltración y EAA-llama. Las concentraciones determinadas empleando cada técnica técnicas son similares entre sí, a excepción del suplemento Biovedik para el que difieren los valores en mayor medida:

Tabla 19. Resultados de concentración de AgNPs y Ag⁺ en suplementos alimenticios

	HDC-ICP-MS		EAA-llama	
	Concentración AgNPs (mg/L)	Concentración Ag ⁺ (mg/L)	Concentración Ag ⁺ (mg/L)	Concentración Ag total (mg/L)
Biovedik	4,319 ± 1,203	11,98 ± 3,990	13,77 ± 0,2538	22,06 ± 0,2520
High Stability	-	10,92 ± 2,591	11,46 ± 0,1850	14,44 ± 0,1417
Wellness	27,82 ± 4,780	4,583 ± 1,964	0,7799 ± 0,4556	37,58 ± 0,3859

Al observar los Gráficos F.4.2 a F.4.4 de Anexos en los que aparecen dos picos, el de la izquierda corresponde a las AgNPs (menores tr) y el de la derecha a la Ag⁺ (mayores tr). Además, para el suplemento de High Stability únicamente aparece un pico cercano al tr típico de Ag⁺, con lo que se concluye que su contenido de AgNPs es depreciable.

En la Tablas F.4.1 y F.4.2 de Anexos aparecen además de los resultados finales de concentración, el valor de las Áreas, el factor de dilución y la incertidumbre de los resultados obtenidos para cada suplemento.

Además, gracias a la curva de calibración de tr frente a tamaño (Gráfica F.3.2 de Anexos, con la ecuación $y = -0,173\ln(x) + 8,3188$, $R^2 = 0,9966$) fue posible interpolar los tr de las dos muestras comerciales que contienen AgNPs y obtener el tamaño aproximado de las mismas. Para el suplemento Biovedik el tamaño obtenido fue de 24,1 nm y para Wellness se obtuvo un tamaño superior, de 45,1 nm. El tamaño de las AgNPs calculado para la muestra Biovedik se puede comparar con el obtenido

por microscopía electrónica de barrido (SEM), que se muestra en la Figura F.4.1 de Anexos y que dio como resultado para las AgNPs un tamaño mayoritario de 25 nm. Sin embargo, la muestra Wellness no fue posible medirla por SEM.

5. Conclusiones

Las conclusiones que se extraen de este estudio son las siguientes:

- La determinación de la concentración de Ag total en los patrones comerciales de AgNPs mediante EAA-llama ha conducido a resultados que no difieren estadísticamente de los 20 mg/L especificados por el fabricante de los mismos.
- A causa del reducido contenido de Ag⁺ en los patrones de AgNPs (por debajo del límite de cuantificación de la técnica de EAA-llama), se ha empleado la técnica de ICP-MS para su determinación puesto que presenta una mayor sensibilidad. Se concluye que el contenido de Ag⁺ en los patrones de AgNPs es pequeño (inferior a 0,9 mg/L) y puede explicarse por el tiempo que llevan los envases abiertos. Las AgNPs de 10 nm, debido a su menor tamaño presentan una mayor tendencia a la oxidación, por lo que su contenido de Ag⁺ (5%) es el mayor obtenido.
- La determinación de Ag total y Ag⁺ en los suplementos alimenticios Biovedik, High Stability y Wellness mediante EAA-llama lleva a resultados reproducibles (bajas desviaciones estándar, inferiores a 0,5) y que no difieren estadísticamente de los obtenidos por otros miembros del equipo de investigación.
- La caracterización de AgNPs mediante HDC con detección UV-VIS empleando distintas FM y la evaluación de los parámetros cromatográficos obtenidos para cada una ha llevado a reafirmar que la FM 1 (cuya composición es 0,5 mM de Na₂HPO₄, 0,013% de SDS, 0,05% de Formaldehído y 0,05% de Tritón X-100) es la fase móvil más adecuada para la caracterización de AgNPs con tamaños de 10, 20, 40 y 60 nm. El motivo es que proporciona valores de recuperación en el rango de 92-100% para todas las AgNPs, una buena calibración de tr frente a tamaño ($R^2=0,9961$) y aunque los valores de resolución entre pares de AgNPs sean bajos al estar comprendidos entre 0,08 y 0,13, siguen siendo superiores a los obtenidos con las demás FM.
- Evaluando los resultados obtenidos en la caracterización de AgNPs y Ag⁺ mediante HDC-ICP-MS se puede afirmar que la FM C (que contiene 0,009% de SDS y 1mM de PA) es la más eficiente para la separación de AgNPs y Ag⁺, puesto que la resolución entre el pico de las AgNPs de 10 nm (las de mayor tr debido a su menor tamaño) y el correspondiente a Ag⁺ es de 0,34, siendo posible diferenciarlas claramente en la representación gráfica. Los valores de recuperación para las AgNPs de 40 y 60 nm son pésimos para las tres FM estudiadas, siendo óptimos (entre 88-100%) para las AgNPs de 10 y 20 nm y la Ag⁺ con la FM C. Además, empleando esta FM C, la calibración en función del tamaño da lugar a un alto coeficiente de correlación ($R^2=0,9966$).
- Empleando la FM C para la cuantificación directa de AgNPs y Ag⁺ en los suplementos alimenticios Biovedik, High Stability y Wellness mediante HDC-ICP-MS se llega a resultados similares a los obtenidos mediante EAA-llama, con algunas pequeñas diferencias para la muestra Wellness. Además, se ha podido determinar el tamaño de las AgNPs presentes en la muestra de Wellness (45,1 nm) y de Biovedik (24,1 nm), siendo comparable el resultado de Biovedik al obtenido con las medidas realizadas con SEM.

6. Bibliografía

¹ Feynman, RP. There's plenty of room at the bottom. An invitation to enter a new field of physics. *Caltech 1959*, February 5, 1960.

² Binnig, G.; Rohrer, H. Scanning tunnelling microscopy. *Helv Physics, Acta* 1982, vol 55-56, pp. 726-735.

³ Dolez, PI. Nanomaterials definitions, classifications and applications. En *Nanoengineering. Global approaches to health and safety issues*. Elsevier, 2015, pp. 3-40.

⁴ Abdo Saleh, T.; Kumar Gupta, V. Synthesis, classification and properties of nanomaterials. En *Nanomaterial and polymer membranes: Synthesis, characterization and applications*. Elsevier, 2016, pp. 83-133.

⁵ Barhoum, A.; Hamdy Makhoul, A.S. Nanomaterials history, classification, unique properties, production and market. En *Emerging Applications of Nanoparticles and Architecture Nanostructures. Current Prospects and Future Trends*. Elsevier, 2018, pp. 341-384.

⁶ L. Verde, A. L. P. Europeo, A. L. Comité, E. Y. Social, and E. Y. Al. Segunda revisión de la normativa sobre los nanomateriales. Comunicación de la comisión al parlamento europeo, al consejo y al comité económico y social europeo. 2012, pp. 1-14.

⁷ 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, vol. 904, pp. 10-32.

⁸ Chernousova, S.; Epple, M. Silver as antibacterial agent: Ion, nanoparticle and metal. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, vol. 52, pp. 1636-1653.

⁹ Skoog, D.A; Holler, F.M; Crouch, S.R. Espectroscopía atómica y Espectrometría de masas atómica. En *Principios de Análisis Instrumental*. Cengage Learning, 2008, pp. 230-231.

¹⁰ Resano, M.; Aramendía, M.; García-Ruiz, E.; Crespo, C.; Belarra, M.A. Solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry for the direct determination of silver at trace and ultratrace levels, *Analytica Chimica Acta*, 2006, vol. 571, pp. 142-149.

¹¹ Javanbakht, M.; Divsar, F.; Badiei, A.; Fatollahi, F.; Khaniani, Y.; Ganjali, M.R.; Norouzi, P.; Chaloosi, M.; Mohammadi Ziarani, G. Determination of picomolar silver concentrations by differential pulse anodic stripping voltammetry at a carbon paste electrode modified with phenylthioureafunctionalized high ordered nanoporous silica gel. *Electrochimica Acta*, 2009, vol. 54, pp. 5381-5386.

¹² Karimia, M.A; Mohammadia, S.Z., Mohadesia, A.; Hatefi-Mehrjardi, A.; Mazloun-Ardakanid, M.; Sotudehnia Korania, L.; Askarpour Kabir, A. Determination of silver(I) by flame atomic absorption spectrometry after separation/preconcentration using modified magnetite nanoparticles. *Scientia Iranica*, 2011, vol. 18, pp. 790-796.

¹³ Yang, X.; Jia, Z.; Yang, X.; Liao, X. Cloud point extraction-flame atomic absorption spectrometry for pre-concentration and determination of trace amounts of silver ions in water samples. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2017, vol. 24, pp. 589-594.

- ¹⁴ Striegel, A.M; Brewer, A.K. Hydrodynamic chromatography. *Annu. Rev. Anal. Chem*, 2012, vol. 5, pp. 15–34.
- ¹⁵ Revillon, A. Hydrodynamic Chromatography. *Handbook of Methods and Instrumentation in Separation Science*, 2000, pp. 307-321.
- ¹⁶ Shendruk, T.N.; Tahvildari, R.; Catafard, N.M. ; Andrzejewski, L.; Gigault, C.; Todd, A.; Gagne-Dumais, L.; Slater, G.W., Godin, M.bField-Flow Fractionation and Hydrodynamic Chromatography on a Microfluidic Chip. *Analytical Chemistry*, 2013, vol. 85, pp. 5981-5988.
- ¹⁷ Roman, M.; Rigo, C., Castillo-Michel, H.; Munivrana, I.; Vindigni, V.; Micetic, I.; Benetti, F.; Manodori, L.; Cairns, W.R.L. 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, vol. 408, pp. 5109-5124.
- ¹⁸ Philippe, A.; Schaumann G.E. Evaluation of Hydrodynamic Chromatography coupled with UV-Visible, Fluorescence and Inductively Coupled Plasma Mass detectors for sizing and quantifying colloids in environmental media. *Plos One*, 2014, vol. 9, nº2.
- ¹⁹ Tiede, K.; Boxall, A.B.A.; Tiede, D.; Tear, S.P.; David, H.; Lewis, J. A robust size-characterization methodology for studying nanoparticle behaviour in ‘real’ Environmental samples, using hydrodynamic chromatography coupled to ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2009, vol. 24, pp. 964-972.
- ²⁰ Franze, B.; Engelhard, C. Fast separation, characterization and speciation of gold and silver nanoparticles and their ionic counterparts with micellar Electrokinetic Chromatography coupled to ICP-MS. *Analytical Chemistry*, 2014, vol. 86, pp. 5713-5720.
- ²¹ López-Sanza, S.; Rodríguez Fariñas, N.; Serrano Vargas, R.; Rodríguez Martín-Doimeadios, R. del C.; Ríos, A. Methodology for monitoring gold nanoparticles and dissolved gold species in culture medium and cells used for nanotoxicity tests by liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Talanta*, 2017, vol. 164, pp. 451-457.
- ²² Yuan Yanga; Li Luo; Hai-Pu Li; Qiang Wang; Zhao-Guang Yang; Zhi-Peng Qu; Ru Ding. Analysis of metallic nanoparticles and their ionic counterparts in complex matrix by reversed-phase liquid chromatography coupled to ICP-MS. *Talanta*, 2018, vol. 182, pp. 156-163.
- ²³ Abad-Álvaro, I.; Bolea, E.; Laborda, F.; Castillo, J.R. An ICP-MS based platform for release studies on silver-based nanomaterials. *J. Anal. At. Spectrom*, 2017, vol. 32, pp. 1101
- ²⁴ La Boutique Bio (Bergerac, Francia) http://www.la-boutique-bio.com/product_info.php?currency=USD&products_id=1342&language=en (Agosto 2019)
- ²⁵ Índigo Herbs (Glastonbury, UK) <https://www.indigo-herbs.co.uk/shop/buy/rivers-of-health-colloidal-silver-spray> (Agosto 2019)
- ²⁶ Vitacost (Florida, EE.UU.) <https://www.vitacost.com/source-naturals-wellness-colloidal-silver> (Agosto 2019)
- ²⁷ Harris, D.C. Métodos de calibrado. En *Análisis químico cuantitativo*, 3ª edición. Reverté, 2007, pp. 87.
- ²⁸ Eyring, E. J.; Engleman, E. P.; Hopper, J.; Dushkin, M.; Lee, J.C. Renal lesions associated with gold therapy: Light and electron microscopy studies. *Arthritis and Rheumatology*, 1965, vol. 8, pp. 1-13.

- ²⁹ Gray, E.P.; Bruton, T.A.; Higgins, C.P.; Halden, R.U.; Westerhoff, P.; Ranville, J.F.; Analysis of gold nanoparticle mixtures: a comparison of hydrodynamic Chromatography (HDC) and asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) coupled to ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2012, vol. 27, pp. 1532.
- ³⁰ Malejko, J.; Świerżewska, N.; Bajguz, A.; Godlewska-Żyłkiewicz, B. Method development for speciation analysis of nanoparticle and ionic forms of gold in biological samples by high performance liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 2018, vol. 142, pp. 1-7.
- ³¹ López-García, I.; Vicente-Martínez, Y.; Hernández-Córdoba, M. Speciation of silver nanoparticles and Ag(I) species using cloud point extraction followed by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 2014, vol. 101, pp. 93-97.
- ³² Bakir, M. Caracterización de nanopartículas metálicas por cromatografía hidrodinámica. Trabajo Fin de Grado, Universidad de Zaragoza, 2017.
- ³³ De la Llana, P. Caracterización de nanopartículas de plata en muestras medioambientales por cromatografía hidrodinámica. Trabajo Fin de Grado, Universidad de Zaragoza, 2018.
- ³⁴ Small, H.; Langhorst, M.A. Hydrodynamic Chromatography. *Analytical Chemistry*, 1982, vol. 54, pp. 892-898.
- ³⁵ Spirin, M.G.; Brichkin, S.B.; Razumov, F.V. Studies on absorption spectra of uniform gold nanoparticles prepared in Triton X-100 reverse micelles. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 2008, vol. 196, pp. 174-179.
- ³⁶ Fu-Ken, L.; Fu-Hsiang, K.; Pei-Wen, H.; Chien-Hou, W.; Tieh-Chi, C. Studying the size/shape separation and optical properties of silver nanoparticles by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 2005, vol. 1062, pp. 139-145.
- ³⁷ Naderi, O.; Nyman, M.; Amiri, M.; Sadeghi, R. Synthesis and characterization of silver nanoparticles in aqueous solutions of surface active imidazolium-based ionic liquids and traditional surfactants SDS and DTAB. *Journal of Molecular Liquids*, 2019, vol. 273, pp. 645-652.
- ³⁸ Isábal, D. Cromatografía hidrodinámica para la caracterización de nanopartículas de oro y otras nanopartículas metálicas. Trabajo Fin de Máster, Universidad de Zaragoza, 2017.
- ³⁹ Sötebiera, C.A.; Weidner, S.M.; Jakubowska, N.; Pannea, U.; Bettmerc, J. Separation and quantification of silver nanoparticles and silver ions using reversed phase high performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry in combination with isotope dilution analysis. *Journal of Chromatography A*, 2016, vol. 1468, pp. 102-108.

ANEXOS

A) Parte experimental

A.1 Instrumentación

- Balanza de precisión PL2001-L, precisión de $\pm 0,1$ mg
- Medidor de pH micropH 2001 (Crison, Barcelona, España)
- EAA-llama:
 - Espectrofotómetro de absorción atómica: Perkin Elmer 2380 (Perkin Elmer, Massachusetts, EE.UU.)
 - Espectrofotómetro de absorción atómica: Perkin Elmer Analyst 200 (Perkin Elmer, Massachusetts, EE.UU.)
- HDC:
 - Cromatógrafo: Waters 2796 Bioseparations Module (Waters Corporation, Milford, EE.UU.)
 - Columna: PL-PSDA Type 1 (5-300 nm)
 - Detector de diodos en array: Waters 996 Photodiode Array Detector (Waters Corporation, Milford, EE.UU.)
- ICP-MS
 - ICP-MS Elan DRC-e Perkin Elmer (Perkin Elmer, Massachusetts, EE.UU.)

A.2 Aparatos

- Micropipetas 50-200 μ L (Bibby Sterilin, Stone, Reino Unido)
- Baño de Ultrasonidos (JP Selecta S.A., Barcelona, España)
- Sistema de filtración de PTFE con filtro de membrana de nylon 0,45 μ m Filter Lab (Filtros Anovia, Barcelona, España)
- Centrífuga Multifuge X1R (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE.UU.)

A.3 Materiales

- Tubos tipo Falcon de 15 y de 50 mL
- Espátulas de laboratorio
- Vasos de precipitados, botes de plástico y recipientes de plástico de distintos volúmenes
- Cuentagotas de plástico
- Tubos eppendorf de 2 mL
- Viales de vidrio
- Jeringuillas de plástico de 2 mL
- Frasco lavador de plástico
- Cartuchos para ultrafiltración Omega 100 con tamaño de poro de 3 kDa (Pall Corporation, Nueva York, EE.UU.)

Tabla A.1. Parámetros empleados en la medida con EAA-llama para determinar Ag total y Ag⁺

Parámetros EAA-llama para Ag total		Parámetros EAA-llama para Ag ⁺	
λ	328,07 nm	λ	328,07 nm
W (Anchura rendija)	0,8 nm	W (Anchura rendija)	0,7 nm
Ganancia	65	Ganancia	72
Llama aire : acetileno	10 : 2,5 L/min	Llama aire : acetileno	40 : 15 u.a*
t integración	1 seg	t integración	1 seg
t respuesta	5 seg	t respuesta	3 seg
nº réplicas muestras	5	nº réplicas muestras	3
nº réplicas blanco	10	nº réplicas blanco	10
modelo	Perkin Elmer AAnalyst 200	modelo	Perkin Elmer 2380

*u.a: unidades arbitrarias

Tabla A.2. Determinación de Ag total: Concentración y volúmenes tomados de las muestras comerciales

Suplemento	Concentración fabricante	Volumen tomado	Volumen final
High Stability	10 mg/L	1,5126 mL	5,0779 mL
Wellness	30 mg/L	0,5181 mL	5,0261 mL
Biovedik	25 mg/L	0,5987 mL	4,9871 mL

Tabla A.3. Determinación de Ag⁺: Concentración y volúmenes tomados de las muestras comerciales

Suplemento	Concentración fabricante	Volumen tomado	Volumen final
High Stability	10 mg/L	0,5026 mL	3,0935 mL
Wellness	30 mg/L	0,5064 mL	5,0089 mL
Biovedik	25 mg/L	0,6136 mL	5,0277 mL
Ag ⁺ 20 mg/L	-	0,5116 mL	5,0435 mL

Tabla A.4. Parámetros empleados en la medida con EAA-llama para determinar Ag total y Ag⁺ en suplementos alimenticios

Parámetros EAA-llama para Ag total y Ag ⁺	
λ	328,07 nm
W (Anchura rendija)	0,7 nm
Ganancia	84
Llama aire : acetileno	40 : 15 u.a*
t integración	1 seg
t respuesta	3 seg
nº réplicas muestras	3
nº réplicas blanco	10
modelo	Perkin Elmer 2380

*u.a: unidades arbitrarias

Tabla A.5 Determinación de Ag⁺ y AgNPs: Concentración y volúmenes tomados de las muestras comerciales para la obtención de disoluciones de 0,25 mg/L

Suplemento	Concentración fabricante	Volumen tomado	Volumen final
High Stability	10 mg/L	0,1722 mL	6,9748 mL
Wellness	30 mg/L	0,0571 mL	7,0202 mL
Biovedik	25 mg/L	0,0688 mL	6,9885 mL

B) Determinación de Ag total y Ag⁺ en patrones de AgNPs mediante EAA-llama

B.1) Ag total

Tabla B.1.1 Concentraciones reales de la recta de calibrado

Concentración (mg/L)	Volumen calculado (mL)	Cantidad pesada (g)	Volumen final (mL)	Concentración real (mg/L)
1	0,15	0,1524	15,0543	0,9879
2	0,30	0,3054	15,067	1,978
3	0,45	0,4584	15,0953	2,963
4	0,60	0,6052	15,0621	3,921
5	0,75	0,7573	15,0285	4,917

Estos volúmenes se toman de una disolución de Ag⁺ de concentración exacta 97,58 mg/L.

Los cálculos realizados para preparar la dilución intermedia de 100 mg/L de Ag⁺, a modo de ejemplo para los realizados en el resto del trabajo, fueron los siguientes:

- Se decide el volumen total que va a prepararse: 5 mL
- Se usa en los cálculos la concentración del patrón especificada por el fabricante: 994 mg/L Ag⁺

$$100 \frac{mg}{L} * \frac{1 L}{1000 mL} * 5 mL = 0,5 mg Ag^+ \text{ se deben tomar del patrón comercial}$$

Por tanto el volumen a tomar será $0,5 mg * \frac{1L}{994 mg} * \frac{1000 mL}{1 L} = 0,503 mL$ de patrón comercial de Ag⁺

- Masa real tomada del patrón comercial de 994 mg/L: 0,5061 g
- Volumen final: 5,1552 g

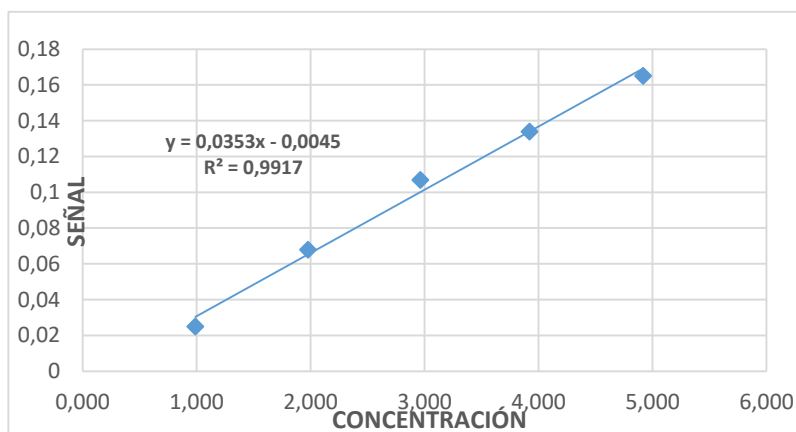
$$994 \frac{mg}{L} * \frac{1 L}{1000 mL} * 0,5061 mL = 0,5031 mg Ag^+$$

$$0,5031 mg Ag * \frac{1000 mL}{1 L} * 5,1552 mL = 97,58 mg/L = 97,58 mg/L Ag^+$$

Tabla B.1.2 Valores de Absorbancia proporcionados por el espectrofotómetro mediante EAA-llama

	Abs promedio	SD	% DSR
Blanco	0,001	0,0011	84,9
1 mg/L	0,025	0,0032	12,7
2 mg/L	0,068	0,0068	10
3 mg/L	0,107	0,0029	2,7
4 mg/L	0,134	0,0022	1,6
5 mg/L	0,165	0,0027	1,6
Blanco	-0,002	0,0006	31,4
10 nm	0,097	0,0009	1,5
20nm	0,093	0,0015	2,2
40 nm	0,083	0,006	1,2
60 nm	0,089	0,001	1,8

Gráfica B.1.1 Recta de calibrado



Incertidumbre pendiente (L/mg)	Incertidumbre ordenada (mg/L)
0,00186	0,00608

B.2) Ag⁺ por ultrafiltración

Tabla B.2.1 Concentraciones reales de la recta de calibrado

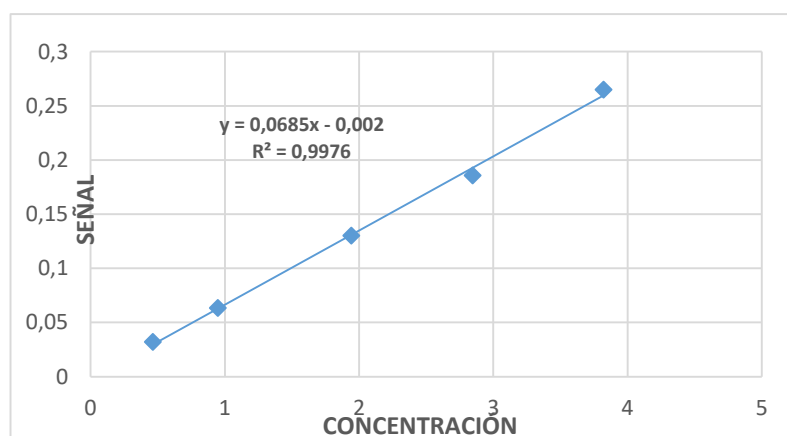
Concentración (mg/L)	Volumen calculado (mL)	Cantidad pesada (g)	Volumen final (mL)	Concentración real (mg/L)
0,5	0,075	0,0722	15,0881	0,4652
1	0,15	0,1472	15,0108	0,9484
2	0,30	0,3018	15,0266	1,9424
3	0,45	0,4455	15,1349	2,8468
4	0,60	0,5980	15,1314	3,8222

Estos volúmenes se toman de una disolución de Ag⁺ de concentración exacta 96,71 mg/L.

Tabla B.2.2 Valores de Absorbancia proporcionados por el espectrofotómetro mediante EAA-llama

	Abs promedio	SD	% DSR
Blanco	0,001	0,0003162	28,46
0,5 mg/L	0,032	0	0
1 mg/L	0,0634	0,0005	0,8639
2 mg/L	0,1302	0,0004	0,3435
3 mg/L	0,1858	0,0004	0,2407
4 mg/L	0,265	0	0
Blanco	0,002	0	0
Ag ⁺	0,053	0,0005733	1,274
10 nm	0,002	0	0
20 nm	0,007	0	0
40 nm	0,002	0	0
60 nm	0,002	0	0

Gráfica B.2.1 Recta de calibrado



Incertidumbre pendiente (L/mg)	Incertidumbre ordenada (mg/L)
0,00193	0,00454

C) Determinación de Ag total y Ag⁺ en suplementos alimenticios mediante EAA-llama

C.1) Ag total

Tabla C.1.1 Concentraciones reales de la recta de calibrado

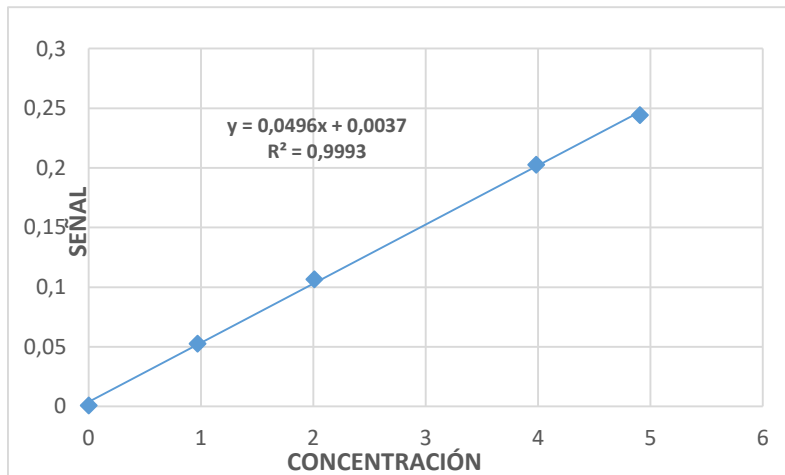
Concentración (mg/L)	Volumen calculado (mL)	Cantidad pesada (g)	Volumen final (mL)	Concentración real (mg/L)
1	0,15	0,1459	15,0623	0,9699
2	0,30	0,3092	15,4048	2,010
3	0,45	0,4816	15,0746	3,199
4	0,60	0,5970	15,0041	3,984
5	0,75	0,7427	15,1535	4,908

Estos volúmenes se toman de una disolución de Ag⁺ de concentración exacta 100,13 mg/L.

Tabla C.1.2 Valores de Absorbancia proporcionados por el espectrofotómetro mediante EAA-llama

	Abs promedio	SD	% DSR
Blanco	0,0008	0,00042164	52,7046277
1 mg/L	0,0526	0,00054772	1,04129764
2 mg/L	0,1066	0,00054772	0,51381103
3 mg/L	0,1924	0,00114018	0,59260677
4 mg/L	0,2028	0,00130384	0,64291937
5 mg/L	0,2442	0,00148324	0,60738726
Blanco	0,0023	0,0005	22,2222222
Biovedik	0,1350	0,001	0,74074074
Wellness	0,1958	0,00164317	0,83920719
High Stability	0,2202	0,00083666	0,3799546

Gráfica C.1.1 Recta de calibrado



Incertidumbre pendiente (L/mg)	Incertidumbre ordenada (mg/L)
0,00077	0,00232

C.2) Ag⁺ por ultrafiltración

La recta de calibrado es la misma que la de determinación de Ag total puesto que ambas determinaciones se hicieron el mismo día.

Tabla C.2.1 Valores de Absorbancia de los suplementos, proporcionados por el espectrofotómetro mediante EAA-llama

Biovedik	0,019	0,001	3,039
Wellness	0,0076	0,001	7,207
High Stability	0,0226	0,001	2,424
Ag ⁺	0,019	0	0

Tabla C.1 Resultados de la comparación intralaboratorio de los contenidos de Ag total y Ag⁺ mediante EAA-llama

	Biovedik		High Stability		Wellness	
	Ag total	Ag ⁺	Ag total	Ag ⁺	Ag total	Ag ⁺
Operario 1	21,3 ± 2,1	16,8 ± 0,5	12,0 ± 1,6	11,5 ± 1,0	37,5 ± 0,8	1,74 ± 0,6
Operario 2	22,1 ± 0,25	13,8 ± 0,25	14,4 ± 0,14	11,5 ± 0,45	37,6 ± 0,38	0,77 ± 0,18
test t, 2 colas	72,44% > 5%	0,582% < 5%	20,94% > 5%	100% >> 5%	91,55% >> 5%	19,64% > 5%
Conclusión	Diferencia NO significativa	Diferencia significativa	Diferencia NO significativa	Diferencia NO significativa	Diferencia NO significativa	Diferencia NO significativa

Se han asumido varianzas no comparables y n^o grados de libertad = 4

D) Determinación de Ag⁺ en patrones de AgNPs mediante ICP-MS

Tabla D.1 Concentraciones reales de la recta de calibrado

Concentración (µg/L)	Volumen calculado (mL)	Cantidad pesada (g)	Volumen final (mL)	Concentración real (µg/L)
10	0,25	0,2459	49,9826	9,568469504
50	1,25	1,2298	50,0743	47,76638708
80	2,00	2,0111	49,9803	78,25959558
100	2,50	2,5349	50,0854	98,43178113
200	5,00	5,0419	50,0231	195,5353

Tabla D.2 Rectas de calibrado obtenidas para ¹⁰⁷Ag y ¹⁰⁹Ag con y sin PI de Rhodio

	sin Patrón Interno	con Patrón Interno
¹⁰⁷ Ag	$y = 19885x + 291,6$, $R^2 = 0,9988$	$y = 0,0684x + 0,562$, $R^2 = 0,9793$
¹⁰⁹ Ag	$y = 19912x + 274,9$, $R^2 = 1$	$y = 0,1026x - 0,087$, $R^2 = 0,9902$

E) Caracterización de AgNPs mediante HDC

E.1) Fase móvil 1

Gráfica E.1.1 Cromatograma completo de AgNPs de distintos diámetros, empleando FM 1

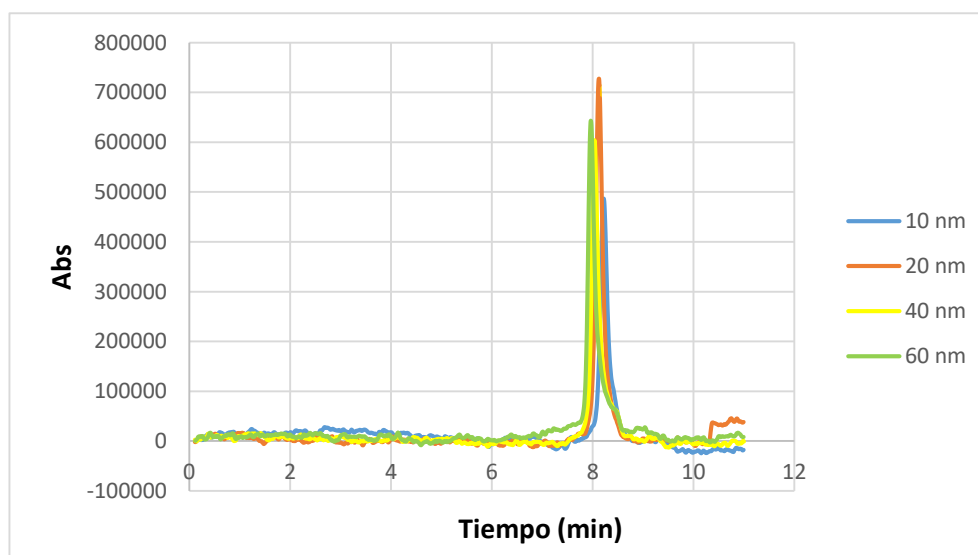


Tabla E.1.1 Valores de tr, Áreas, y Alturas sin Columna para las AgNPs, empleando FM 1

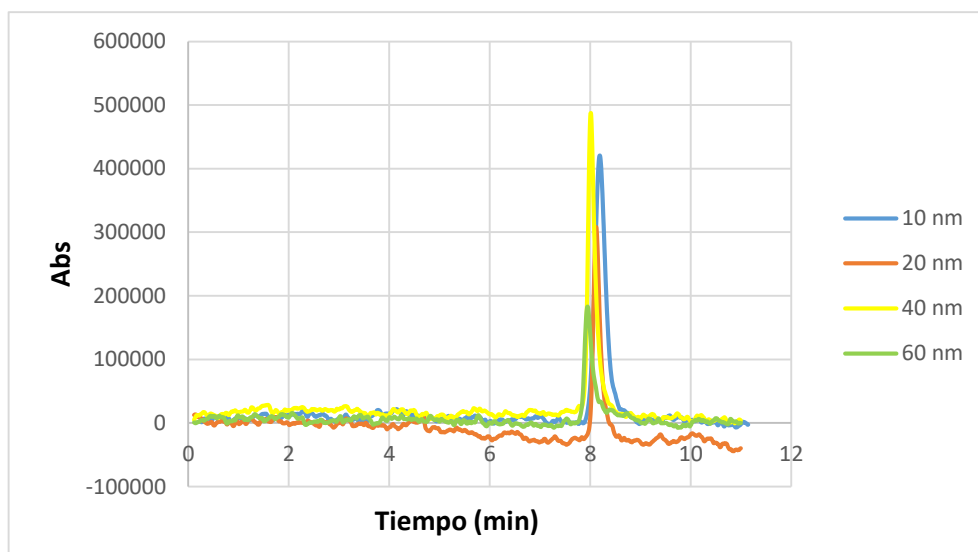
	10 nm	20 nm	40 nm	60 nm
Área (1)	109147,39	130205	113488,62	120289,77
Área (2)	98954,43	130211,63	111662,77	122250,31
Área (3)	98889,45	130856,46	113537,75	126841,28
Media	102330,42	130424,36	112896,38	123127,12
SD	5903,76	374,22	1068,62	3362,61
%DSR	5,769	0,2869	0,9465	2,731
Altura(1)	1023115	1283739	1113061	1217204
Altura(2)	967070	1275321	1110957	1227013
Altura(3)	960419	1270571	1125114	1251455
Media	983534	1276543	1116377	1231890
SD	34438,51	6668,60	7638,96	17638,78
%DSR	3,500	0,5224	0,6843	1,432

Tabla E.1.2 Valores de tr, Áreas, y Alturas obtenidas con Columna para las AgNPs, empleando FM 1

	10 nm	20 nm	40 nm	60 nm
tr (1)	8,23	8,16	8,04	7,98
tr(2)	8,22	8,13	8,04	7,97
tr(3)	8,22	8,13	8,04	7,97
Media	8,223	8,140	8,040	7,973
SD	0,00577	0,01732	0	0,00577
%DSR	0,07021	0,21278	0	0,07241
Área (1)	90006,62	131816,42	116897,04	111507,42
Área (2)	107071,48	93890,84	112618,62	103156,47
Área (3)	109408,26	135953,16	116135,32	129331,80
Media	102162,12	120553,47	115216,99	114665,22
SD	10591,61	23182,97	2282,26	13370,33
%DSR	10,37	19,23	1,982	11,66
Altura(1)	463159	756613	261998	152100
Altura(2)	488406	600033	451083	500159
Altura(3)	562902	716127	591649	624133
Media	504822	690924	434910	425464
SD	51858,35	81275,49	165419,53	244720,85
%DSR	10,27	11,76	38,04	57,52
Anchura (1)	0,733	0,575	0,775	0,742
Anchura (2)	0,917	0,783	0,908	0,883
Anchura (3)	0,975	0,759	0,883	0,842
Media	0,875	0,706	0,855	0,822
SD	0,1263	0,1138	0,07068	0,07253
%DSR	14,44	16,13	8,267	8,822

E.2) Fase móvil 2

Gráfica E.2.1 Cromatograma completo de AgNPs de distintos diámetros, empleando FM 2



Gráfica E.2.2 Calibración de tr vs tamaño para las AgNPs, empleando FM 2

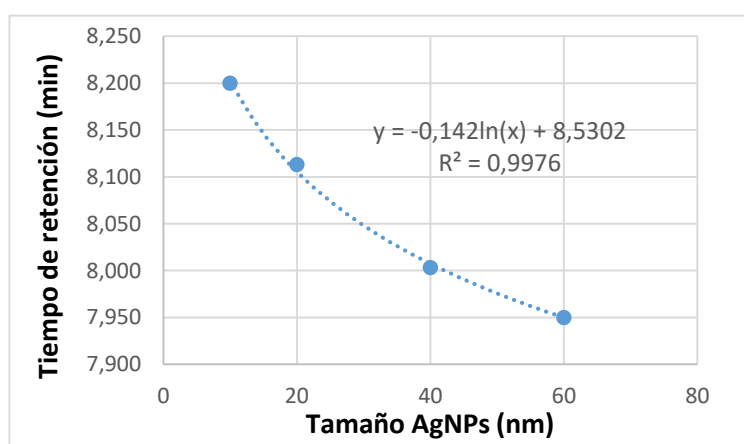


Tabla E.2.1 Valores de tr, Áreas, y Alturas sin Columna para las AgNPs, empleando FM 2

	10 nm	20 nm	40 nm	60 nm
Área (1)	132167,23	135670,81	125708,71	120808,24
Área (2)	133547,23	135387,05	127626,70	122384,15
Área (3)	135633,73	132227,58	126480,81	121680,20
Media	133782,73	134428,48	126605,41	121624,20
SD	1745,21	1911,31	965,05	789,45
%DSR	1,305	1,421	0,762	0,649
Altura(1)	1319578	1350846	1287827	1256871
Altura(2)	1340812	1358224	1285865	1274677
Altura(3)	1361786	1339190	1286277	1243960
Media	1340725	1349420	1286656	1258502
SD	21104,13	9596,79	1034,544	15423,36
%DSR	1,574	0,7111	0,08041	1,226

Tabla D.E.2 Valores de tr, Áreas, y Alturas obtenidas con Columna para las AgNPs, empleando FM 2

	10 nm	20 nm	40 nm	60 nm
tr (1)	8,20	8,11	8	7,95
tr(2)	8,20	8,11	8	7,95
tr(3)	8,20	8,12	8,01	7,95
Media	8,200	8,113	8,003	7,950
SD	0	0,00577	0,00577	0
%DSR	0	0,0712	0,0721	0
Área (1)	23665,59	57826,65	65340,2	33542,98
Área (2)	26123,41	54006	74705,12	33949,33
Área (3)	27180,26	47701,65	78911,48	31990,45
Media	25656,42	53178,10	72985,60	32969,89
SD	1803,27	5113,02	6947,12	1033,82
%DSR	7,031	9,612	9,524	3,143
Altura(1)	128924	330589	388986	175635
Altura(2)	148424	295468	370345	176784
Altura(3)	163246	278197	460017	175799
Media	146864	301418	406449	176072
SD	17214,05	26697,98	47317,99	621,47
%DSR	11,72	8,861	11,64	0,3536
Anchura (1)	0,533	0,608	0,517	0,917
Anchura (2)	0,741	0,659	0,933	0,558
Anchura (3)	0,85	0,566	0,558	0,75
Media	0,708	0,611	0,669	0,742
SD	0,1611	0,0466	0,2293	0,1796
%DSR	22,75	7,621	34,25	24,22

Tabla E.2.3 Valores de Resolución entre picos consecutivos de AgNPs, empleando FM 2

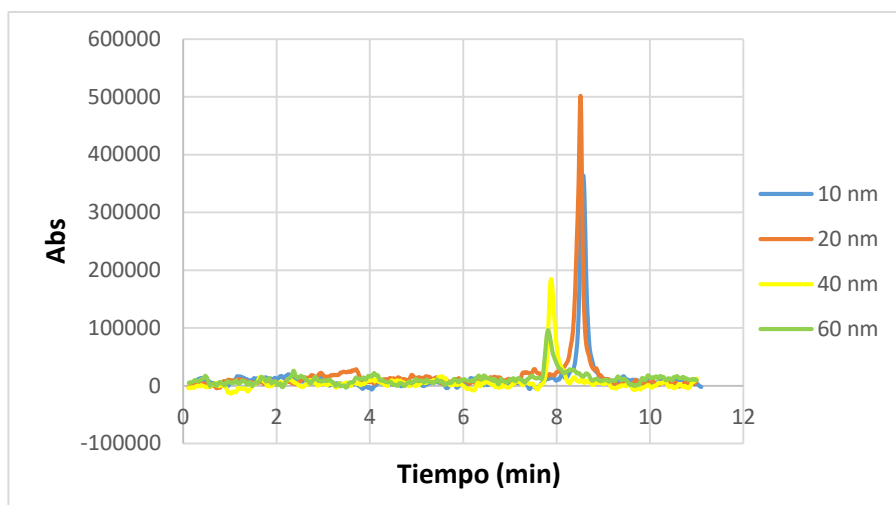
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Media
Resolución 10nm-20nm	0,158	0,129	0,113	0,133
Resolución 20nm-40nm	0,196	0,138	0,196	0,177
Resolución 40nm-60nm	0,0697	0,0671	0,0917	0,0762

Tabla E.2.4 Valores de Recuperaciones de las AgNPs, empleando FM 2

	10 nm	20 nm	40 nm	60 nm
Recuperación (1)	17,91	42,62	51,98	27,77
Recuperación (2)	19,56	39,89	58,53	27,74
Recuperación (3)	20,04	36,08	62,39	26,29
Media	19,17	39,53	57,63	27,27
SD	1,120	3,289	5,264	0,8443
%DSR	5,841	8,319	9,134	3,096

E.3) Fase móvil 3

Gráfica E.3.1 Cromatograma completo de AgNPs de distintos diámetros, empleando FM 3



Gráfica E.3.2 Calibración de tr vs tamaño para las AgNPs, empleando FM 3

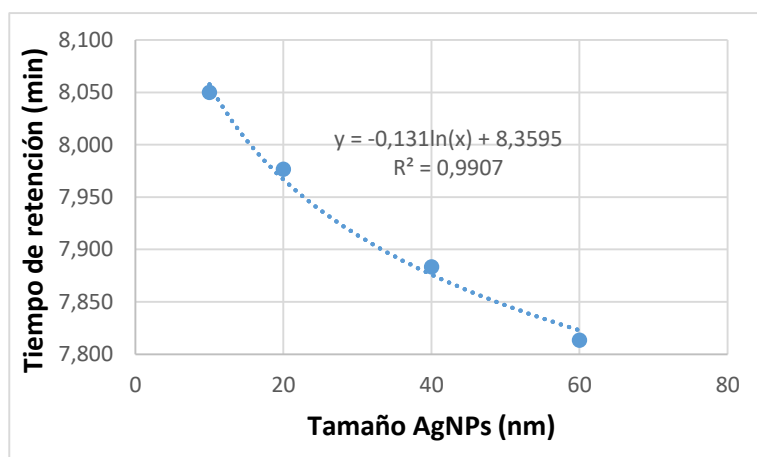


Tabla E.3.1 Valores de tr, Áreas, y Alturas sin Columna para las AgNPs, empleando FM 3

	10 nm	20 nm	40 nm	60 nm
Área (1)	108989,58	154299,53	119799,06	123646,76
Área (2)	111111,75	143536,89	119452,51	121767,67
Área (3)	111797,44	144251,77	108504,53	123358,6
Media	110632,92	147362,73	115918,70	122924,34
SD	1463,8906	6018,0694	6423,1972	1012,0173
%DSR	1,323	4,084	5,541	0,8233
Altura(1)	1075277	1526835	1213369	1251237
Altura(2)	1099979	1434932	1200692	1241848
Altura(3)	1094233	1442060	1069331	1223584
Media	1089830	1467942	1161131	1238890
SD	12926,30	51126,92	79753,12	14061,86
%DSR	1,186	3,483	6,869	1,135

Tabla E.3.2 Valores de tr, Áreas, y Alturas obtenidas con Columna para las AgNPs, empleando FM 3

	10 nm	20 nm	40 nm	60 nm
tr (1)	8,05	7,98	7,88	7,81
tr(2)	8,04	7,98	7,89	7,81
tr(3)	8,06	7,97	7,88	7,82
Media	8,05	7,98	7,88	7,81
SD	0,0100	0,00577	0,00577	0,00577
%DSR	0,1242	0,0724	0,0732	0,0739
Área (1)	74455,18	121017,81	36049,25	17929,51
Área (2)	82358,96	121017,81	33712,42	22043,48
Área (3)	89152,42	112147,35	32265,8	18688
Media	81988,85	118060,99	34009,16	20365,74
SD	7355,607	5121,362	1909,100	2189,342
%DSR	8,971	4,338	5,613	10,75
Altura(1)	430915	701383	188367	96326
Altura(2)	460816	701383	181246	100922
Altura(3)	476285	662926	175312	81580
Media	456005	688564	181642	92943
SD	23064,39	22203,16	6536,49	10105,12
%DSR	5,058	3,225	3,599	10,87
Anchura (1)	0,658	0,867	0,600	0,705
Anchura (2)	0,800	0,867	0,567	0,650
Anchura (3)	1,033	0,808	0,783	0,509
Media	0,830	0,847	0,650	0,621
SD	0,189331279	0,03406367	0,11635721	0,101095664
%DSR	22,80184014	4,02010219	17,901109	16,27076142

Tabla E.3.3 Valores de Resolución entre picos consecutivos de AgNPs, empleando FM 3

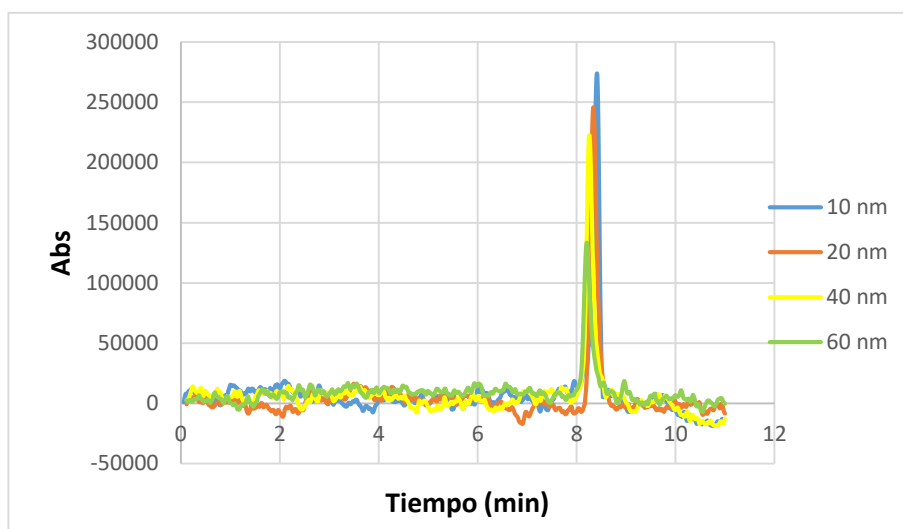
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Media
Resolución 10nm-20nm	0,0918	0,0720	0,0978	0,0872
Resolución 20nm-40nm	0,136	0,126	0,113	0,125
Resolución 40nm-60nm	0,107	0,131	0,0929	0,111

Tabla E.3.4 Valores de Recuperaciones de las AgNPs, empleando FM 3

	10 nm	20 nm	40 nm	60 nm
Recuperación (1)	68,31	78,43	30,09	14,50
Recuperación (2)	74,12	84,31	28,22	18,10
Recuperación (3)	79,74	77,74	29,74	15,15
Media	74,06	80,16	29,35	15,92
SD	5,716	3,610	0,9927	1,920
%DSR	7,717	4,503	3,382	12,06

E.4) Fase móvil 4

Gráfica E.4.1 Cromatograma completo de AgNPs de distintos diámetros, empleando FM 4



Gráfica E.4.2 Calibración de tr vs tamaño para las AgNPs, empleando FM 4

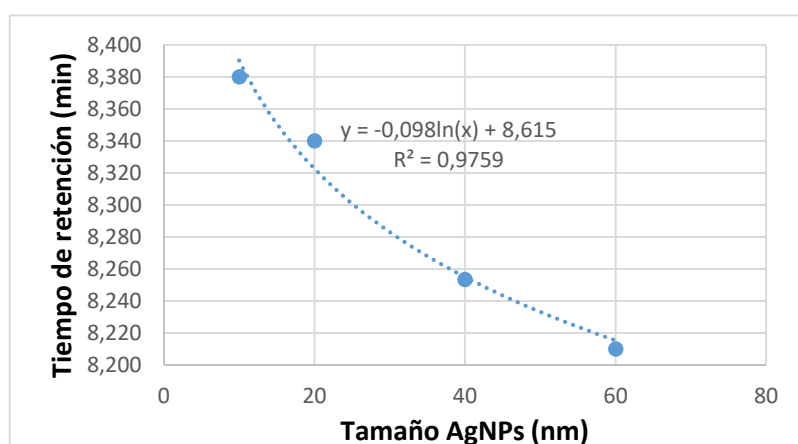


Tabla E.4.1 Valores de tr, Áreas, y Alturas sin Columna para las AgNPs, empleando FM 4

	10 nm	20 nm	40 nm	60 nm
Área (1)	95514,79	132697,16	117221,13	110685,22
Área (2)	87254,29	131185,06	111206,44	103911,72
Área (3)	88446,36	131478,16	118178,87	107226,23
Media	90405,15	131786,79	115535,48	107274,39
SD	4465,04	801,91	3779,52	3387,01
%DSR	4,939	0,6085	3,271	3,157
Altura(1)	939982	1324844	1157912	1131892
Altura(2)	891199	1284155	1105993	1085502
Altura(3)	893456	1287582	1144572	1100233
Media	908212	1298860	1136159	1105876
SD	27536,47	22567,66	26962,56	23704,17
%DSR	3,032	1,737	2,373	2,143

Tabla E.4.2 Valores de tr, Áreas, y Alturas obtenidas con Columna para las AgNPs, empleando FM 4

	10 nm	20 nm	40 nm	60 nm
tr (1)	8,39	8,34	8,25	8,21
tr(2)	8,37	8,34	8,25	8,21
tr(3)	8,38	8,34	8,26	8,21
Media	8,38	8,34	8,25	8,21
SD	0,01	0	0,00577	0
%DSR	0,1193	0	0,06995	0
Área (1)	36817,92	47993,55	46067,9	28219,34
Área (2)	37787,6	43524,57	35155,61	21202,77
Área (3)	35397,78	43265,25	37413,68	21132,31
Media	36667,77	44927,79	39545,73	21167,54
SD	1201,965	2658,190	5760,099	4071,511
%DSR	3,278	5,917	14,57	19,23
Altura(1)	22657	256160	269524	148243
Altura(2)	34808	231870	218274	126247
Altura(3)	18868	251959	218246	122771
Media	25444	246663	235348	132420
SD	8327,53	12982,17	29597,29	13812,61
%DSR	32,73	5,263	12,58	10,43
Anchura (1)	0,467	0,717	0,7	0,85
Anchura (2)	0,642	0,683	0,625	0,792
Anchura (3)	0,467	0,683	0,675	0,675
Media	0,525	0,694	0,667	0,772
SD	0,101	0,0196	0,0382	0,0891
%DSR	19,23	2,827	5,728	11,54

Tabla E.4.3 Valores de Resolución entre picos consecutivos de AgNPs, empleando FM 4

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Media
Resolución 10nm-20nm	0,0845	0,0453	0,0696	0,0664
Resolución 20nm-40nm	0,127	0,138	0,118	0,127
Resolución 40nm-60nm	0,0516	0,0565	0,0741	0,0607

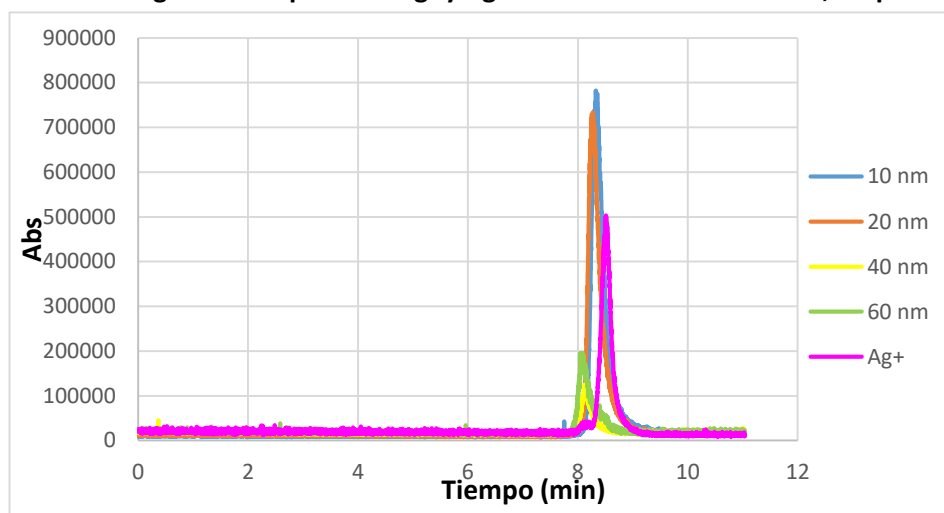
Tabla E.4.4 Valores de Recuperaciones de las AgNPs, empleando FM 4

	10 nm	20 nm	40 nm	60 nm
Recuperación (1)	38,55	36,17	39,30	25,50
Recuperación (2)	43,31	33,18	31,61	20,40
Recuperación (3)	40,02	32,91	31,66	19,71
Media	40,63	34,08	34,19	21,87
SD	2,437	1,810	4,425	3,159
%DSR	5,999	5,309	12,94	14,45

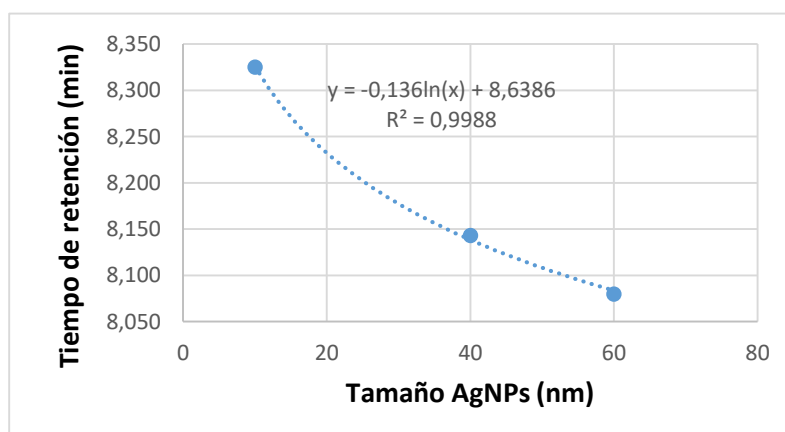
F) Caracterización de AgNPs y Ag⁺ mediante HDC-ICP-MS

F.1) Optimización de la FM: Fase móvil A

Gráfica F.1.1 Cromatograma completo de Ag⁺ y AgNPs de distintos diámetros, empleando FM A



Gráfica F.1.2 Calibración de tr vs tamaño para las AgNPs, empleando FM A



*se ha eliminado el punto correspondiente al tamaño de 20nm porque empeoraba considerablemente el ajuste logarítmico

Tabla F.1.1 Valores de tr, Áreas, y Alturas sin Columna para Ag⁺ y AgNPs, empleando FM A

	10 nm	20 nm	40 nm	60 nm	Ag ⁺
Área (1)	255273,04	308694,24	253022,69	249860,73	168771,40
Área (2)	256466,77	276324,04	246366,89	263361,83	142046,12
Área (3)	261705,364	266526,225	249697,93	258478,79	155408,76
Media	257815,06	283848,17	249695,84	257233,79	155408,76
SD	3421,5647	22067,957	3327,9013	6836,1148	13362,638
%DSR	1,327	7,775	1,333	2,658	8,598
Altura(1)	1972490	1907470	1957480	1959430	1330530
Altura(2)	1948800	1947470	1923800	1977980	1175300
Altura(3)	1952960	1927370	1948420	1933420	1252915
Media	1958083	1927437	1943233	1956943	1252915
SD	12648,73	20000,08	17428,76	22383,83	77615,0
%DSR	0,6460	1,038	0,8969	1,144	6,195

Tabla F.1.2 Valores de tr, Áreas, y Alturas obtenidas con Columna para Ag⁺ y AgNPs, empleando FM A

	10 nm	20 nm	40 nm	60 nm	Ag ⁺
tr (1)	8,337	8,272	8,164	8,092	8,505
tr(2)	8,327	8,266	8,143	8,084	8,510
tr(3)	8,312	8,261	8,123	8,063	8,508
Media	8,325	8,266	8,143	8,080	8,508
SD	0,01241	0,005300	0,02033	0,01472	0,002698
%DSR	0,1490	0,06411	0,2496	0,1821	0,03171
Área (1)	199284,07	195989,54	48785,07	47389,68	89561,71
Área (2)	211188,07	188288,46	34761,86	34068,18	102585,27
Área (3)	204172,14	182063,72	21817,70	23214,68	97606,09
Media	204881,43	188780,57	35121,54	28641,43	100095,68
SD	5983,6141	6975,9408	13487,28	12108,48	6571,6244
%DSR	2,921	3,695	38,40	42,28	6,565
Altura(1)	693149	718270	181300	173733	392101
Altura(2)	764366	718663	139798	139716	489263
Altura(3)	814342	714902	108406	111429	378619
Media	757286	717278	143168	141626	419994
SD	60905,6	2066,98	36564,0	31196,1	60366,4
%DSR	8,043	0,2882	25,54	22,03	14,37
Anchura (1)	1,90	1,80	1,14	1,69	2,56
Anchura (2)	2,60	1,57	0,800	0,92	1,76
Anchura (3)	2,09	1,95	1,03	1,44	1,56
Media	2,20	1,77	0,991	1,35	1,96
SD	0,364	0,191	0,173	0,390	0,532
%DSR	16,56	10,78	17,50	28,92	27,13

Tabla F.1.3 Valores de Resolución entre picos consecutivos de AgNPs y AgNPs 10nm-Ag⁺, empleando FM A

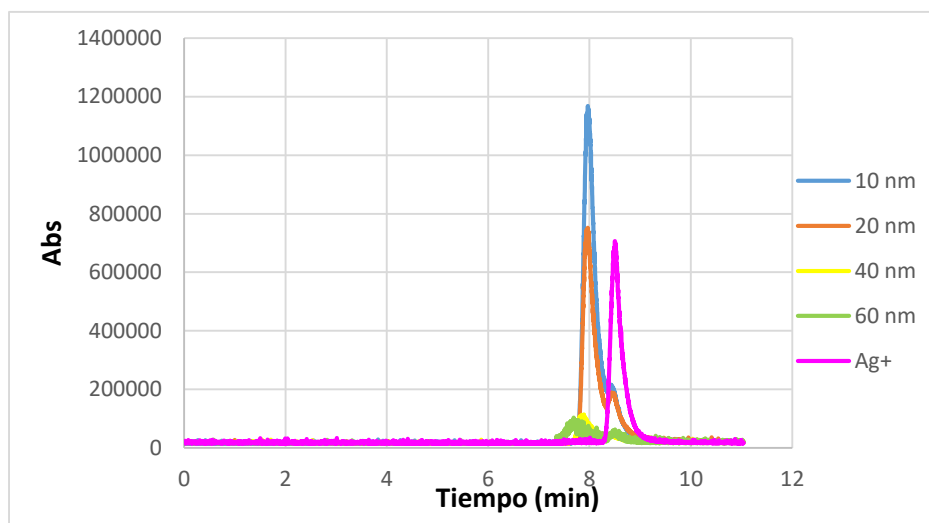
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Media
Resolución 10nm-20nm	0,0353	0,0288	0,0254	0,0298
Resolución 20nm-40nm	0,0732	0,104	0,0926	0,0901
Resolución 40nm-60nm	0,0513	0,0677	0,0486	0,0559
Resolución Ag ⁺ -10nm	0,0752	0,0842	0,108	0,0890

Tabla F.1.4 Valores de Recuperaciones de Ag⁺ y AgNPs, empleando FM A

	10 nm	20 nm	40 nm	60 nm	Ag ⁺
Recuperación (1)	78,07	63,49	19,28	18,97	53,07
Recuperación (2)	82,35	68,14	14,11	12,94	72,22
Recuperación (3)	78,02	68,31	8,738	8,981	62,81
Media	79,48	66,65	14,04	13,63	62,70
SD	2,485	2,735	5,272	5,028	9,577
%DSR	3,127	4,104	37,54	36,90	15,27

F.2) Optimización de la FM: Fase móvil B

Gráfica F.2.1 Cromatograma completo de Ag⁺ y AgNPs de distintos diámetros, empleando FM B



Gráfica F.2.2 Calibración de tr vs tamaño para las AgNPs, empleando FM B

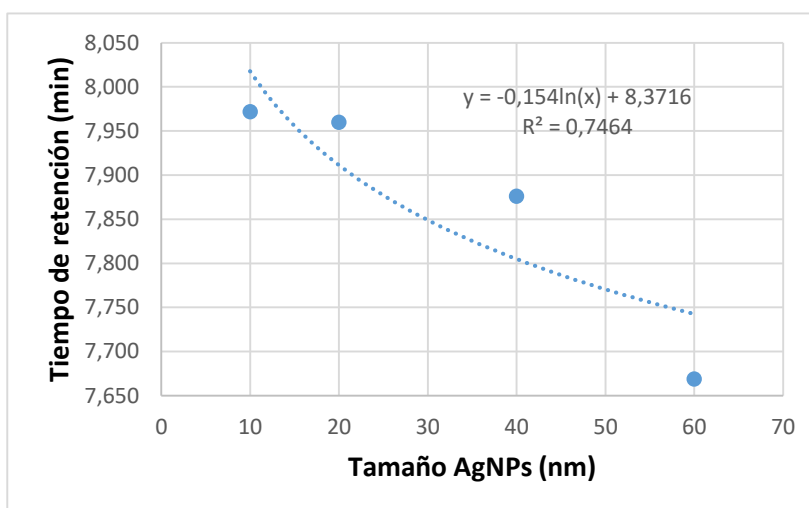


Tabla F.2.1 Valores de tr, Áreas, y Alturas sin Columna para Ag⁺ y AgNPs, empleando FM B

	10 nm	20 nm	40 nm	60 nm	Ag ⁺
Área (1)	287270,246	307409,8138	244908,399	239416,458	118838,536
Área (2)	289459,711	305131,7052	263822,1291	242352,614	120208,424
Área (3)	277388,167	304967,161	277900,818	239075,883	121302,959
Media	284706,041	305836,2267	262210,449	240281,652	120116,640
SD	6431,3220	1365,2476	16555,1522	1801,5719	1234,7723
%DSR	2,259	0,4464	6,314	0,7498	1,028
Altura(1)	1951830	1937960	1945100	1953900	653913,558
Altura(2)	1963890	1881840	1945290	1965220	665986,539
Altura(3)	1953760	1698724	1965440	1942560	664956,617
Media	1956493	1839508	1951943	1953893	661619
SD	6477,981	125109,810	11688,842	11330,001	6692,866
%DSR	0,3311	6,801	0,5988	0,5799	1,012

Tabla F.2.2 Valores de tr, Áreas, y Alturas obtenidas con Columna para Ag⁺ y AgNPs, empleando FM B

	10 nm	20 nm	40 nm	60 nm	Ag ⁺
tr (1)	7,970	7,966	7,890	7,689	8,501
tr(2)	7,968	7,957	7,881	7,717	8,500
tr(3)	7,978	7,956	7,857	7,600	8,489
Media	7,972	7,960	7,876	7,669	8,497
SD	0,005687	0,005465	0,01740	0,06083	0,006685
%DSR	0,07133	0,06865	0,2209	0,7932	0,07868
Área (1)	369262,30	264435,55	36499,44	39842,99	190237,45
Área (2)	375912,86	251976,66	33084,51	36260,83	147687,77
Área (3)	355546,21	227204,67	30611,79	30441,03	137850,49
Media	366907,13	247872,29	33398,58	33350,93	142769,13
SD	10385,578	18951,752	2956,362	4745,150	27843,732
%DSR	2,831	7,646	8,852	14,23	19,50
Altura(1)	1195810	732521	83757	85715	689802
Altura(2)	1150570	686258	73758	69450	517411
Altura(3)	1073220	606494	74293	67368	486359
Media	1139867	675091	77269	74177	564524
SD	61991,9	63751	5625	10046	109599
%DSR	5,439	9,443	7,279	13,54	19,41
Anchura (1)	1,79	3,20	3,41	3,91	2,91
Anchura (2)	2,31	3,13	3,32	3,73	1,93
Anchura (3)	3,36	3,16	2,14	2,85	1,24
Media	2,49	3,16	2,95	3,50	2,03
SD	0,800	0,035	0,710	0,570	0,840
%DSR	32,18	1,122	24,03	16,29	41,45

Tabla F.2.3 Valores de Resolución entre picos consecutivos de AgNPs y AgNPs 10nm-Ag⁺, empleando FM B

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Media
Resolución 10nm-20nm	0,001404	0,003891	0,006863	0,004053
Resolución 20nm-40nm	0,02299	0,02358	0,03760	0,02805
Resolución 40nm-60nm	0,05505	0,04660	0,1028	0,06816
Resolución Ag ⁺ -10nm	0,2263	0,2506	0,2220	0,2330

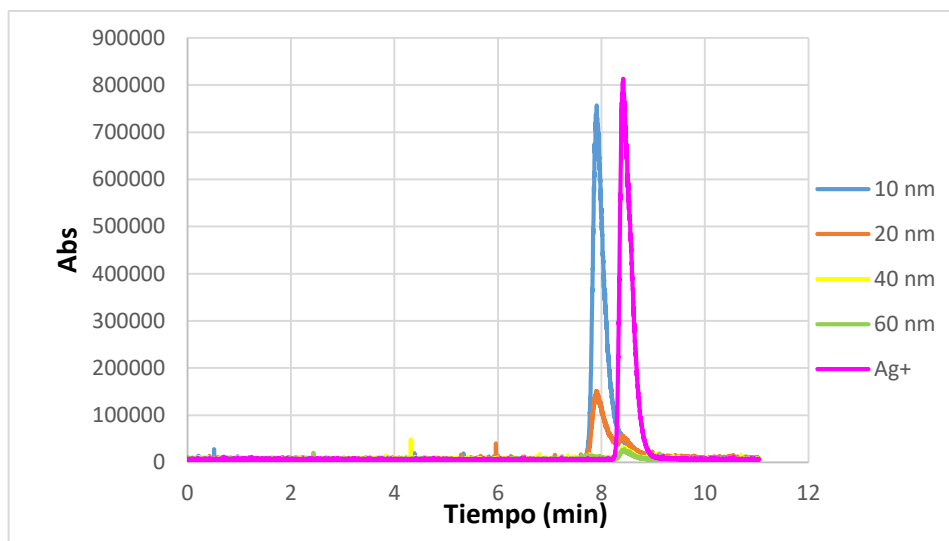
Tabla F.2.4 Valores de Recuperaciones de Ag⁺ y AgNPs, empleando FM B

	10 nm	20 nm	40 nm	60 nm	Ag ⁺
Recuperación (1)	128,5	86,02	14,90	16,64	*
Recuperación (2)	129,9	82,58	12,54	14,96	122,9
Recuperación (3)	128,2	74,50	11,02	12,73	113,6
Media	128,9	81,03	12,82	14,78	118,3
SD	0,8896	5,913	1,959	1,961	6,518
%DSR	0,6903	7,297	15,28	13,27	5,512

*porcentaje anómalo (>150%)

F.3) Optimización de la FM: Fase móvil C

Gráfica F.3.1 Cromatograma completo de Ag⁺ y AgNPs de distintos diámetros, empleando FM C



Gráfica F.3.2 Calibración de tr vs tamaño para las AgNPs, empleando FM C

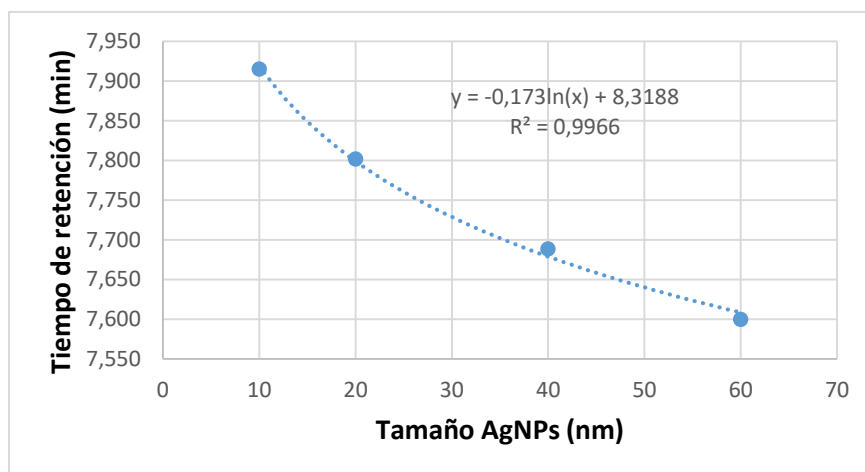


Tabla F.3.1 Valores de tr, Áreas, y Alturas sin Columna para Ag⁺ y AgNPs, empleando FM C

	10 nm	20 nm	40 nm	60 nm	Ag+ 250 ppb
Área (1)	192039,01	166141,93	168953,46	146619,92	147023,52
Área (2)	177160,53	158426,22	165510,80	149331,31	145015,70
Área (3)	174904,09	153535,44	165933,11	145958,14	147142,55
Media	181367,88	159367,87	166799,12	147303,12	146393,92
SD	9310,0824	6355,7783	1877,6224	1787,3592	1195,0612
%DSR	5,133	3,988	1,126	1,213	0,8163
Altura(1)	1381310	1392780	1326490	1162580	1169710
Altura(2)	1291300	1323820	1259380	1182330	1120500
Altura(3)	1314120	1262030	1285400	1106800	1133700
Media	1328910	1326210	1290423,33	1150570	1141303
SD	46792,18	65407,76	33835,83	39171,10	25470,85
%DSR	3,521	4,932	2,622	3,404	2,232

Tabla F.3.2 Valores de tr, Áreas, y Alturas obtenidas con Columna para Ag⁺ y AgNPs, empleando FM C

	10 nm	20 nm	40 nm	60 nm	Ag ⁺
tr (1)	7,924	7,797	7,666	7,549	8,425
tr(2)	7,910	7,807	7,710	7,659	8,421
tr(3)	7,913	7,801	-	7,590	8,418
Media	7,915	7,802	7,689	7,600	8,422
SD	0,007382	0,005080	0,03123	0,05537	0,003535
%DSR	0,09326	0,06511	0,4061	0,7286	0,04197
Área (1)	172413,70	146904,34	1291,63	7100,02	141035,84
Área (2)	203787,11	137812,37	1171,07	6580,29	143790,17
Área (3)	186878,60	130679,93	-	7277,07	154352,98
Media	187693,13	138465,55	1231,35	6928,68	146393,92
SD	15702,556	8131,9049	85,2525	362,164	7029,7681
%DSR	8,366	5,873	6,923	5,227	4,802
Altura(1)	653375	143087	8718	22682	781518
Altura(2)	749651	117624	8941	19836	806602
Altura(3)	679345	101498	-	22070	811676
Media	694124	120736	8830	21529	799932
SD	49810,1	20968,5	158,2	1497,9	16148,1
%DSR	7,176	17,37	1,791	6,957	2,019
Anchura (1)	1,84	1,75	0,67	1,35	1,21
Anchura (2)	1,99	2,06	0,76	1,93	1,35
Anchura (3)	1,66	2,24	-	1,77	1,03
Media	1,83	2,02	0,72	1,68	1,20
SD	0,162	0,247	0,0675	0,300	0,159
%DSR	8,840	12,21	9,436	17,84	13,26

Tabla F.3.3 Valores de Resolución entre picos consecutivos de AgNPs y AgNPs 10nm-Ag⁺, empleando FM C

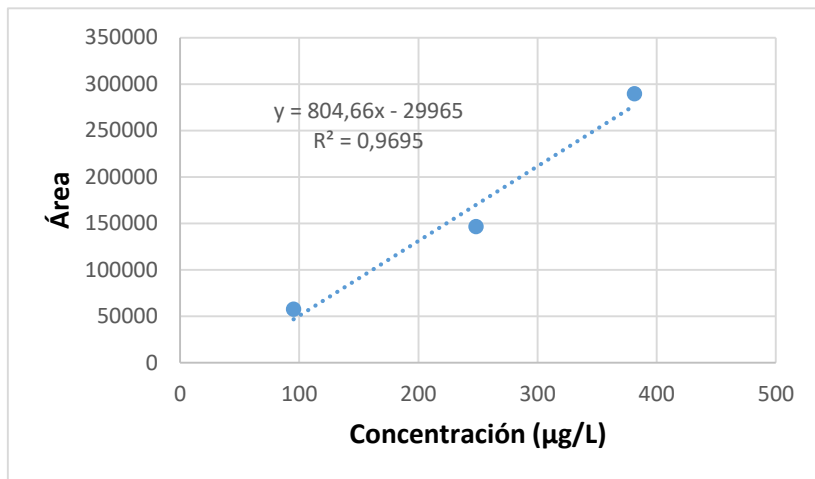
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Media
Resolución 10nm-20nm	0,07034	0,05048	0,05726	0,05936
Resolución 20nm-40nm	0,1079	0,06840	-	0,08817
Resolución 40nm-60nm	0,1157	0,03805	-	0,07687
Resolución Ag ⁺ -10nm	0,3283	0,3073	0,3749	0,3368

Tabla F.3.4 Valores de Recuperaciones de Ag⁺ y AgNPs, empleando FM C

	10 nm	20 nm	40 nm	60 nm	Ag ⁺
Recuperación (1)	89,78	88,42	0,7645	4,842	138,8
Recuperación (2)	115,0	86,99	0,7075	4,407	142,0
Recuperación (3)	106,8	85,11	-	4,986	138,9
Media	103,9	86,84	0,7360	4,745	139,9
SD	12,88	1,658	0,04026	0,3017	1,850
%DSR	12,40	1,910	5,471	6,358	1,323

F.4) Muestras de suplementos alimenticios: cuantificación simultánea de AgNPs y Ag⁺ mediante HDC-ICP-MS

Gráfica F.4.1 Recta de calibrado de Ag⁺ + 1mM PA



Incertidumbre pendiente (L/µg)	Incertidumbre ordenada (µg/L)
142,68	38306

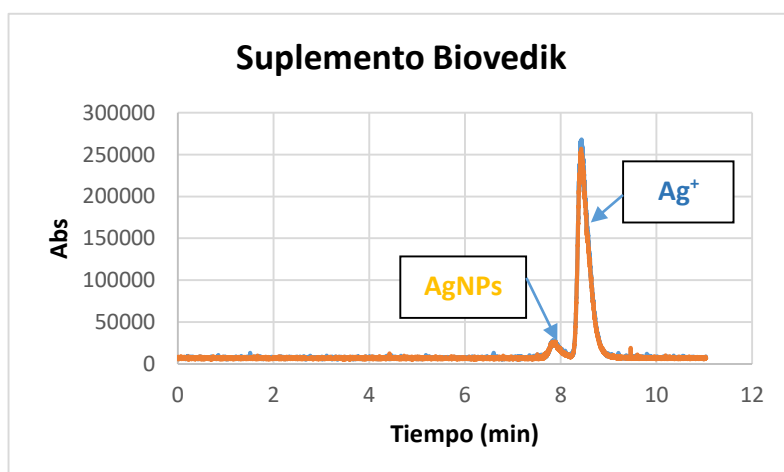
Tabla F.4.1 Resultados de la cuantificación de AgNPs en suplementos alimenticios mediante HDC-ICP-MS

	Concentración interpolada (µg/L)	Factor de dilución	Concentración AgNPs (mg/L)	S _{total}	S _{calibración}	S _{instrumental}
Biovedik	42,33	102,03	4,319	1,203	1,181	0,229
High Stability	-	-	-	-	-	-
Wellness	230,5	120,67	27,82	4,780	2,513	4,066

Tabla F.4.2 Resultados de la cuantificación de Ag⁺ en suplementos alimenticios mediante HDC-ICP-MS

	Concentración interpolada (µg/L)	Factor de dilución	Concentración Ag ⁺ (mg/L)	S _{total}	S _{calibración}	S _{instrumental}
Biovedik	117,4	102,04	11,98	3,990	3,087	2,528
High Stability	269,0	40,584	10,92	2,591	2,025	1,616
Wellness	37,98	120,67	4,583	1,694	8,640	1,457

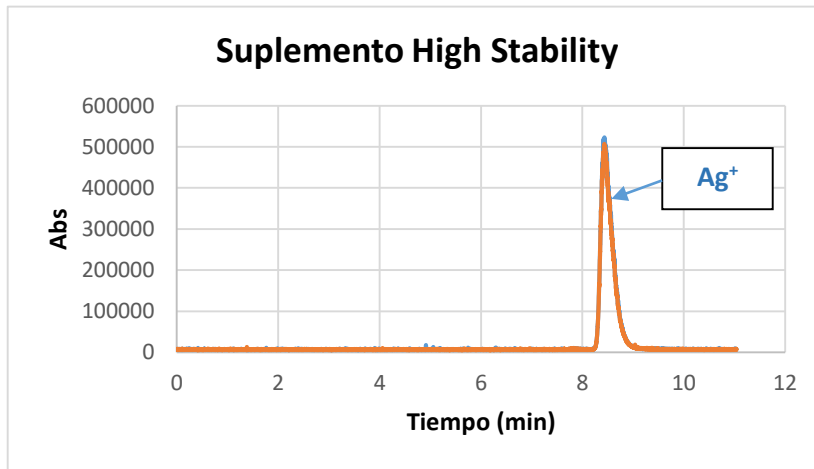
Gráfica F.4.2 Cromatograma y parámetros cromatográficos obtenidos para el suplemento Biovedik



AgNPs	
tr	7,77
Área	4097,56
Altura	20414
Anchura	0,5895

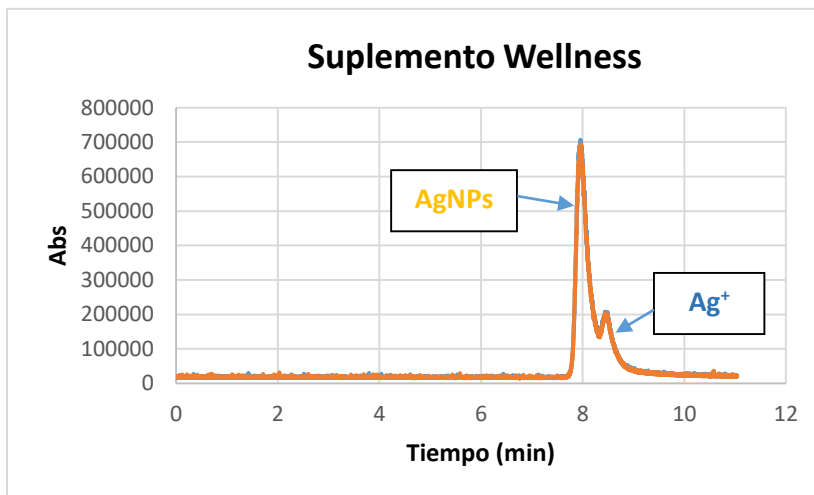
Ag ⁺	
tr	8,43
Área	64516,48
Altura	186455
Anchura	0,8398

Gráfica F.4.3 Cromatograma y parámetros cromatográficos obtenidos para el suplemento High Stability



Ag ⁺	
tr	8,47
Área	186491,76
Altura	518993
Anchura	1,018

Gráfica F.4.4 Cromatograma y parámetros cromatográficos obtenidos para el suplemento Wellness



AgNPs	
tr	7,66
Área	155516,72
Altura	38781
Anchura	1,222

Ag ⁺	
tr	8,39
Área	592,129
Altura	8364
Anchura	0,9552

Figura F.4.1 Resultado obtenido mediante SEM para el suplemento alimenticio Biovedik

