

# Trabajo Fin de Grado

Estudios de accesibilidad de Ag en  
nanocompuestos para producción animal

JAVIER GARCÍA LAGUARDIA

Julio 2020

Departamento de Química Analítica  
Directora: María Teresa Gómez Cotín



Departamento de  
Química Analítica  
**Universidad** Zaragoza





## Resumen

El estudio de las nanopartículas metálicas ha experimentado grandes avances en la última década, dadas sus extraordinarias características fisicoquímicas en comparación con otros materiales más tradicionales. Entre estas características destacan sus propiedades antimicrobianas, las cuales serán el objeto de estudio del presente trabajo, usadas normalmente como promotores de crecimiento en piensos bovinos y aviaros. Esto se consigue mediante la eliminación de bacterias del tracto gastrointestinal, aumentando la absorción de comida, y por ende reduciendo los tiempos de engorde de los animales. Por ello, se usarán aditivos alimenticios, uno que contiene nanopartículas de plata adheridas a una matriz de caolín, llamada C3M, y otro carente de plata, C2, que será utilizado como blanco, en diferentes experimentos, que proceden de la siguiente manera.

Primero, se hizo un estudio preliminar de las propiedades fisicoquímicas de ambas muestras (pH, conductividad y humedad), además de diversos test de calibración. Despues, se determinó el contenido total de plata en la muestra C3M mediante ataque ácido con ácido nítrico, usando dos métodos diferentes: mediante ataque en microondas y en tubos abiertos de teflón. Finalmente, se determinó la accesibilidad de plata en diferentes medios (agua ultrapura,  $\text{HNO}_3$  (1%) y tampón de acetato de sodio/ácido acético) a diferentes intervalos de tiempo (10 min, 1 h, 4 h, 24 h y 48 h). Todas las determinaciones se llevaron a cabo mediante Espectrometría de Absorción Atómica de Llama (FAAS).

## Abstract

The

study of metallic nanoparticles has experienced a huge increase in the last decade, given their extraordinary physicochemical properties compared to other traditional materials. On top of these properties lies their antimicrobial features, which will be the aim of this thesis, often used as growth promoter in swine and poultry fodder. This is achieved by eliminating bacteria from the Gastro-Intestinal Tract (GIT), leading to an increase in food absorption, and consequently diminishing fattening time. Therefore, food additives containing silver nanoparticles embedded in a caolinite matrix, called C3M, and another one devoid of silver, called C2, will be used in several experiments, that proceed as follow.

Firstly, preliminary studies of its physicochemical properties (pH, conductivity and humidity) were carried out, as well as several calibration tests, in order to determine the most appropriate way to proceed. Secondly, the total content of silver in the sample C3M was determined *via* acid attack with nitric acid, using two different approaches: the first one being a microwave attack and the second one in open Teflon tubes. Lastly, the accessibility of silver was studied in several media (ultrapure water,  $\text{HNO}_3$  1%, and a sodium acetate/acetic acid buffer) during different time intervals (10 min, 1h, 4h, 24h and 48 h). All determinations were carried out *via* Flame Atomic Absorption Spectroscopy (FAAS).

## **Lista de acrónimos**

<b>AgNPs</b>	Nanopartículas de plata
<b>FAAS</b>	Espectroscopía de Absorción Atómica de Llama
<b>ETAAS</b>	Espectroscopía de Absorción Atómica con atomización electrotérmica
<b>EAM</b>	Espectrofotometría ultravioleta - visible
<b>ICP-MS</b>	Plasma de Acoplamiento Inductivo - Espectrometría de Masas
<b>ICP-OES</b>	Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma de Acoplamiento Inductivo
<b>XAS</b>	Espectrometría de Absorción de Rayos-X
<b>EXDA</b>	Fluorescencia de rayos-X por energía dispersiva
<b>XRD</b>	Difracción de Rayos X
<b>TEM</b>	Microscopía Electrónica de Transmisión
<b>SEM</b>	Microscopía Electrónica de Barrido
<b>HDC</b>	Cromatografía Hidrodinámica
<b>VIP</b>	Voltametría de partículas inmovilizadas
<b>SEC</b>	Cromatografía de Exclusión Molecular
<b>HDC</b>	Cromatografía Hidrodinámica
<b>CPE</b>	Extracción de Punto de Nube
<b>FFF</b>	Fraccionamiento de Flujo de Campo
<b>UF</b>	Ultrafiltración
<b>LA-ICP-MS</b>	Ablación láser-ICP-MS
<b>GCE</b>	Electrodo de carbono vítreo
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta-Visible
<b>GIT</b>	Tracto gastrointestinal

# Índice

<b>1. Introducción .....</b>	1
1.1. Nanopartículas de plata(AgNPs):importancia y actualidad.....	1
1.2. Una visión de las técnicas experimentales para determinar AgNPs.....	2
1.3. Una visión de las técnicas instrumentales para la separación de AgNPs.....	4
1.4 Las nanopartículas de plata en producción animal: propiedades, interés y expectativas.....	7
1.4.1 Las AgNPs como antibióticos en piensos.....	7
1.4.2. Liberación de plata en organismos.....	8
<b>2. Objetivo y planteamiento del trabajo .....</b>	12
<b>3. Parte experimental.....</b>	13
3.1. Instrumentación y material.....	13
3.1.1. Instrumentación y aparatos.....	13
3.1.2. Muestras, material y reactivos.....	13
3.2. Preparación de muestras.....	13
3.2.1. Estudio preliminar de pH, conductividad y humedad.....	13
3.2.2. Determinación del contenido total de Ag.....	14
3.2.3. Estudio de liberación de plata en agua ultrapura.....	14
<b>4. Resultados y discusión.....</b>	15
4.1. Estudio estadístico de calibración.....	15
4.2. Caracterización de parámetros físico-químicos de la muestra pH, conductividad y humedad de la muestra.....	16
4.3. Determinación del contenido total de plata.....	16
4.4. Estudios de liberación de plata en diferentes medios .....	17
4.4.1. Estudio de liberación de plata en agua ultrapura.....	17
4.4.2. Estudio de liberación de plata en $\text{HNO}_3$ 1%.....	18
4.4.3. Liberación de plata en tampón de ácido acético/acetato.....	18
4.5. Comparativa de plata liberada en muestras diferentes.....	20
<b>5. Conclusiones.....</b>	22
<b>6. Bibliografía.....</b>	23

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Nanopartículas de plata (AgNPs): importancia y actualidad

El estudio de la nanociencia implica la utilización de especies de un tamaño de 1 a 100 nm. Esto les confiere unas características únicas, como son una mayor resistencia a esfuerzos mecánicos, termoplásticidad, mayor estabilidad física y conductividad eléctrica. Por ello, son utilizadas en campos muy diversos como la industria química, electrónica o biomedicina. Se emplean metales como el oro, plata, óxido de cobre u óxido de titanio para producir nanopartículas. Entre ellas destacan las nanopartículas de plata.<sup>1</sup>

Desde la antigüedad, la plata se ha utilizado como agente antimicrobiano, ya que éste es un material más barato que el oro. La plata se ha usado en la fabricación de utensilios, monedas e instrumentos quirúrgicos, en este último caso debido a sus propiedades antimicrobianas.<sup>3</sup> A día de hoy, se sigue usando, pero en forma de nanopartícula (AgNP), gracias a su versatilidad, representando el 55% de las nanopartículas empleadas en la industria. Actualmente se utilizan en cosméticos, pastas de dientes, filtros de agua o pañuelos, entre otras aplicaciones.<sup>6</sup> Además, las AgNPs no son tóxicas para las células eucariotas humanas mientras que, para las procariotas, como bacterias, virus y hongos, sí lo son. Las diversas aplicaciones de las nanopartículas de plata son de gran utilidad en investigación, en ámbitos como la nanomedicina, donde son usadas como antimicrobianos, antiplasmódiales, en liberación específica de medicamentos, sensores, anticancerígenos o en cicatrización de heridas.<sup>3</sup> La figura 1 representa la importancia de las nanopartículas de plata en diferentes sectores<sup>19</sup>.

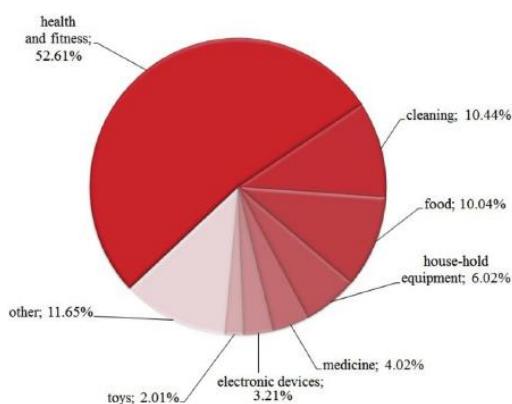
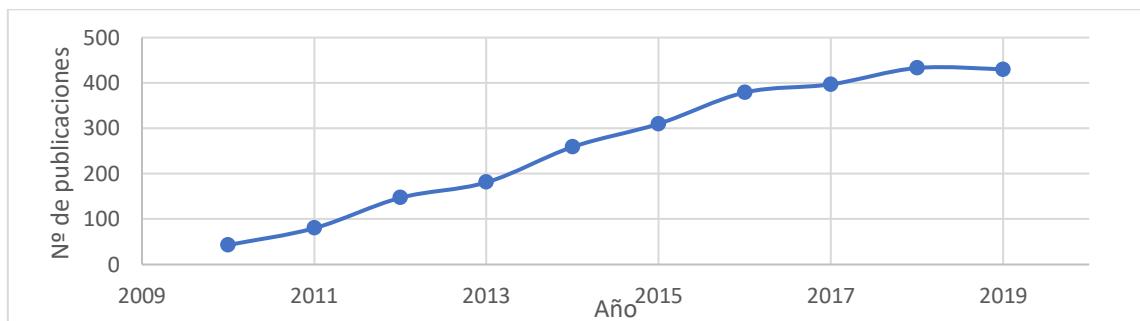


Figura 1. Contribución de AgNPs en diferentes sectores<sup>19</sup>

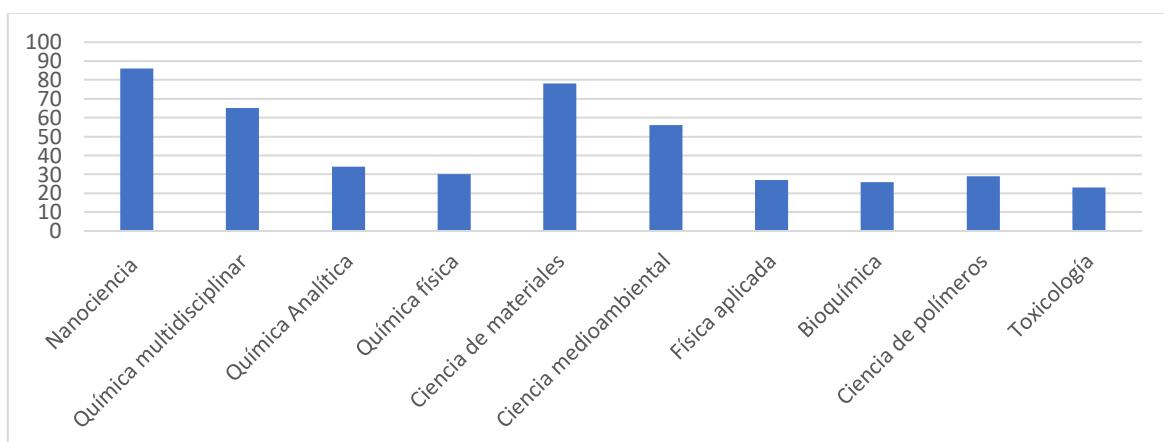
Las AgNPs exhiben propiedades biológicas, térmicas, eléctricas u ópticas fuera de lo común, debido a su alta relación área/volumen<sup>1</sup>. Presentan diferentes conformaciones: esférica, cónica, de barra (*rod*), de cable, etc.<sup>6</sup> Propiedades que las caracterizan como la morfología, el tamaño, la carga eléctrica o el potencial zeta( $\zeta$ ) influyen en sus propiedades antibacterianas.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos al realizar una revisión bibliográfica de los últimos 10 años, para comprobar la importancia de las AgNPs en la última

década a nivel de publicaciones aparecidas referentes al tema. Además, para el año 2019, se buscaron las disciplinas en las que aparecía el estudio de las AgNPs con más frecuencia.



Gráfica 1. Nº de publicaciones por año en las que se estudian las AgNPs



Gráfica 2. Número de artículos por disciplina en el año 2019

Como se puede ver, los artículos publicados sobre AgNPs siguen una tendencia ascendente, desde el año 2010 hasta el 2019. Esto se puede explicar gracias al creciente interés del mundo científico hacia las AgNPs, cuyas características son imbatibles respecto a otros compuestos, especialmente como antimicrobiano, como ya se explicará más adelante. Por último, las disciplinas en las que las AgNPs tienen una mayor presencia son la nanociencia y la ciencia de materiales.

## 1.2. Una visión de las técnicas experimentales para determinar AgNPs

El crecimiento exponencial del uso de AgNPs en los últimos años ha hecho que se tengan que adaptar las técnicas instrumentales para su determinación y separación. Esto ha resultado ser un desafío, ya que las AgNPs tienen una gran variedad de tamaños, formas y pesos, además de la complejidad de algunas matrices, por lo que se ha hecho un gran hincapié a la hora de averiguar cómo estos factores van a afectar a su determinación. También se ha de tener en cuenta que las AgNPs normalmente están asociadas a una matriz sólida, por lo que se ha de considerar la forma en la que se liberan las AgNPs, ya sea en su forma iónica o como nanopartícula. Todos los factores expuestos anteriormente influyen en las propiedades

fisicoquímicas, y por ende, de la posible toxicidad que estas pueden tener en los organismos, de ahí que la búsqueda de técnicas que permitan la detección y separación sea primordial.<sup>14</sup>

Entre las técnicas más utilizadas actualmente para la determinación de plata se encuentran la Espectrometría de Emisión Óptica de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-OES), el Plasma de Acoplamiento Inductivo - Espectrometría de Masas (ICP-MS) o Espectroscopía de Absorción Atómica en llama (FAAS), que será la técnica utilizada en este trabajo. Esta última es ampliamente usada debido a su velocidad, facilidad de uso y coste relativamente bajo. Sin embargo, tiene los inconvenientes de una sensibilidad baja, que no permite el análisis de trazas de manera directa, requiriendo una separación y preconcentración para ser posible su uso.<sup>7</sup>

La Espectroscopía Atómica, ya sea de absorción y atomización en llama o de emisión en plasmas, se basa en la atomización de la muestra a altas temperaturas (2000-3000 K en el caso de la llama y 6000-10000 K<sup>32</sup> en el caso de excitación en plasma). Después, se procede a la determinación cuantitativa, ya sea por espectroscopía óptica o de masas. En nuestro caso, se usa la primera opción. Mediante una lámpara de cátodo hueco de plata se emite luz a la longitud de onda específica, que coincide con la diferencia de energía entre el estado fundamental y el excitado del elemento en cuestión. Por lo tanto, cuando esta luz interacciona con la muestra, solo los átomos de plata absorberán dicha luz. De este modo, midiendo la absorbancia de la muestra atomizada, se puede determinar la concentración de plata en la muestra.<sup>12</sup>

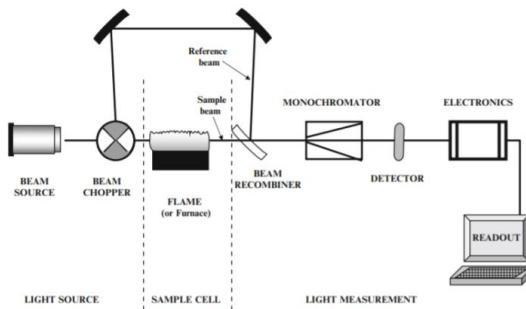
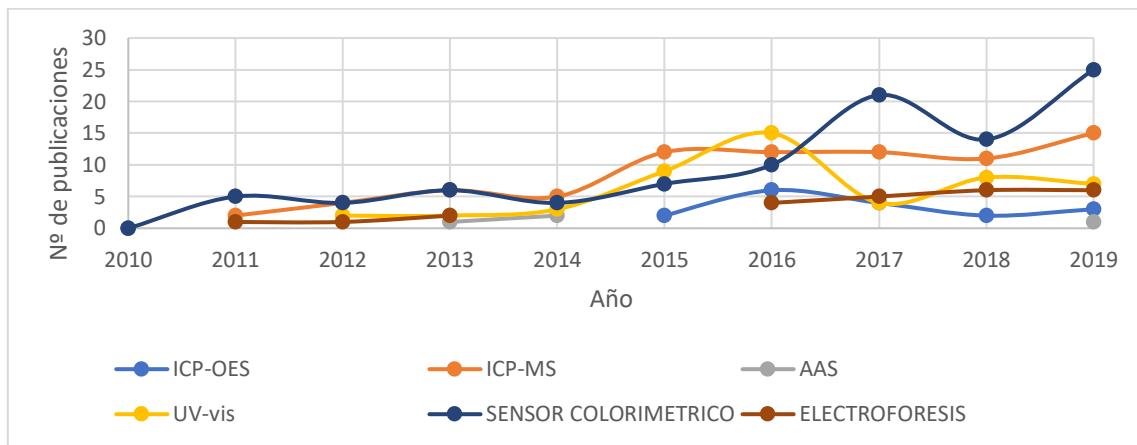


Figura 2. Representación de un espectrofotómetro de absorción atómica de llama.<sup>12</sup>

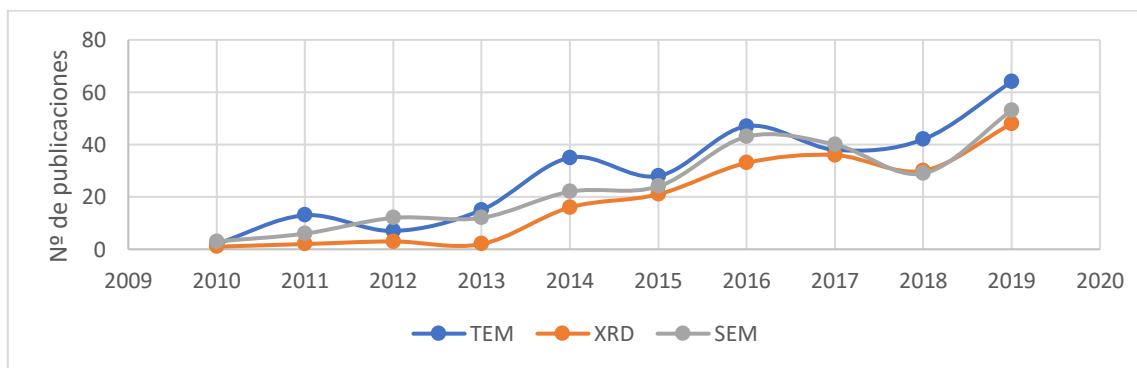
Además de las técnicas anteriores cabe destacar otras técnicas de detección instrumental que son clásicas en Química Analítica, como la Espectrofotometría UV-Vis<sup>29</sup> y técnicas ampliamente utilizadas en laboratorios bioquímicos en los que el seguimiento de las nanopartículas es importante con otros objetivos, como las técnicas electroforéticas, por ejemplo, la electroforesis de gel<sup>1</sup> o la electroforesis capilar<sup>34,37</sup>. También cabe mencionar la Espectroscopía Raman<sup>27</sup> y su interés en trabajos relacionados con AgNPs y nucleótidos. Para la caracterización de las muestras, es decir, la determinación del tamaño, diámetro, forma y perfil de las AgNPs, se utilizan técnicas como la Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)<sup>26,37</sup>, la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)<sup>28,37</sup>, la Fluorescencia de rayos X por energía dispersiva (EXDA)<sup>1</sup>, y la difracción de rayos X (XRD)<sup>28</sup>.

Siguiendo en la línea del apartado anterior, se llevó a cabo una revisión bibliográfica de las técnicas utilizadas en la determinación y caracterización de AgNPs, realizándose dos gráficas sobre ambos términos, sobre su incidencia en la última década.



Gráfica 3. Número de artículos en los que aparece cada técnica de determinación, según el año.

En la gráfica 3 se observa que las técnicas más utilizadas para la determinación de AgNPs son los sensores colorimétricos y el ICP-MS, mostrando una tendencia ascendente en la última década. En la gráfica 4, se puede ver que las técnicas más utilizadas a la hora de caracterizar AgNPs son técnicas ópticas, destacando la Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y la Difracción de rayos-X (XRD), que además siguen una tendencia ascendente en los últimos años, fruto de su importancia en la investigación de nanopartículas. Además, los sensores colorimétricos también han cobrado cierta importancia en los últimos años. El ICP-MS, técnica utilizada en el grupo de investigación de la Universidad de Zaragoza GEAS<sup>8</sup>, está en segunda posición.



Gráfica 4. Número de artículos en los que aparece cada técnica de caracterización, según año

### 1.3. Una visión de las técnicas instrumentales para la separación de AgNPs

Además de la importancia de la detección de presencia de AgNPs es importante la separación de estas especies, o incluso su separación respecto a la plata iónica.

- **Extracción de punto de nube (CPE)**

Este método se basa en la capacidad de solubilización y puntos de nube de surfactantes no iónicos. La separación se consigue mediante la adición del surfactante a la muestra con una concentración superior a la Concentración Micelar Crítica (CMC), hasta que se llega hasta el punto de nube, sometiendo a la muestra a condiciones de temperatura, presión y pH adecuadas. Después, se centrifuga la muestra, separándose en dos fases, una de las cuales es la micelar, rica en plata, debido a la interacción entre ésta y las micelas. Este método destaca por su bajo coste y por un rendimiento de extracción muy alto, con porcentajes de recuperación del 71,7 al 103%<sup>13,30,33</sup>.

- **Fraccionamiento de flujo de campo (FFF)**

Esta técnica se basa en la separación de especies por flujo hidrodinámico, especialmente indicada para separar macromoléculas complejas. Mediante la aplicación de un campo perpendicular al flujo que lleva la muestra por el canal de flujo fraccionado, se consigue retener el analito en cuestión, basándose en los diferentes coeficientes de difusión de las partículas de la muestra, que a su vez tendrán tiempos de retención diferentes. Entre sus características principales destacan la capacidad de separación de partículas de tamaños muy diferentes y la ausencia de interacción con la muestra, lo que permite que el tamaño y morfología de las nanopartículas permanezca invariable durante la operación<sup>13,35,37</sup>.

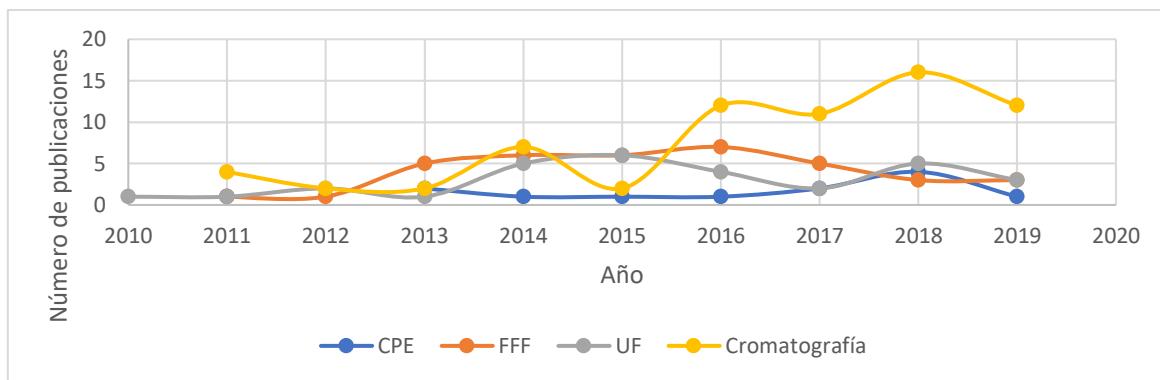
- **Ultrafiltración (UF)**

La ultrafiltración se basa en el uso de membranas porosas de diferentes materiales. La muestra se somete a centrifugación, lo que la fuerza a pasar por el filtro o membrana nanoporoso, hecho que sería imposible usando únicamente la fuerza de la gravedad. Así, se consigue separar las especies iónicas de las propias nanopartículas debido a la diferencia de peso molecular y tamaño.<sup>14</sup>

- **Métodos cromatográficos**

Entre estas técnicas destaca la Cromatografía de Exclusión Molecular (SEC)<sup>13,31</sup> caracterizada por la utilización de una columna cromatográfica que contiene la fase estacionaria porosa, de tal manera que las partículas son separadas según su tamaño y el del poro, por lo que se retienen más las partículas pequeñas, ya que se pueden introducir en éstos. Las partículas de mayor tamaño son las primeras que eluyen. La Cromatografía Hidrodinámica (HDC)<sup>20,37</sup>, es un método cromatográfico desarrollado a partir de la SEC, más actual y se caracteriza porque la fase estacionaria es no porosa, de tal manera que la separación de AgNPs se consigue según su tamaño mediante gradientes de velocidad y de flujo. Estas técnicas cromatográficas, así como FFF, se pueden acoplar a un potente sistema de detección, de enorme sensibilidad, como es ICP-MS. Otra técnica cromatográfica utilizada, es la cromatografía de contracorriente (CCC), en la que también se realiza la separación de partículas según el gradiente de flujo.<sup>13</sup>

Como en el apartado anterior, se realizó una revisión bibliográfica, siendo los términos de búsqueda estos sistemas de separación aplicados al análisis de nanopartículas de plata.



Gráfica 5. Número de artículos en los que aparece cada técnica, según el año

En la gráfica 5, se observa que la técnica más utilizada a la hora de separar AgNPs es la extracción en punto de nube (CPE). Las demás técnicas estudiadas tienen un uso en los últimos años similar, aunque inferior con respecto al CPE.

En la siguiente tabla aparece una selección de algunas publicaciones en las que se detectan AgNPs con distintas técnicas analíticas. Se incluyen el límite de detección (LOD) y la información aportada.

Técnica	Acrónimo	LOD según tamaño	LOD según concentración	Información analítica	Ref.
Espectroscopía de absorción atómica de llama	FAAS		6,5 mg·L <sup>-1</sup>	Concentración elemental y masa total	<sup>22</sup>
Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo	ICP-MS		2,5 ng·L <sup>-1</sup>	Concentración elemental y masa total	<sup>24</sup>
Espectrometría de absorción de rayos-X	XAS		µg·g <sup>-1</sup>	Composición química, distribución cuantitativa de especies químicas	<sup>23</sup>
Microscopía de transmisión electrónica	TEM	5,2 nm		Tamaño, forma, composición elemental, estructura química y cristalina	<sup>26</sup>
Voltametría de partículas inmovilizadas	VIP	10 nm	µg·L <sup>-1</sup>	Composición elemental, estado de oxidación, tamaño	<sup>14</sup>
Cromatografía hidrodinámica- ICP-MS	HDC-ICP-MS	5 nm	0,03 µg·L <sup>-1</sup> (HDC-ICP-MS) <sup>20,36</sup>	Forma, concentración mísica	<sup>25,36,37</sup>
Cromatografía de exclusión por tamaño -ICP-MS	SEC-ICP-MS		3 µg·L <sup>-1</sup>	Tamaño, concentración mísica	<sup>31</sup>
Ablación láser-ICP-MS	LA-ICP-MS		0,2 fg	Concentración mísica	<sup>32</sup>
Voltametría con electrodo de carbono vítreo	GCE		10 µg·L <sup>-1</sup>	Concentración elemental	<sup>38</sup>

Tabla 1. Algunas técnicas de determinación y separación de AgNPs

En la tabla 1 se observa que la técnica más sensible, es decir con un límite de detección (LOD) más bajo, es ICP-MS, por lo que sería la técnica más idónea para la detección a nivel de trazas de AgNPs. Por otro lado, FAAS, la técnica utilizada durante todo este trabajo experimental tiene una sensibilidad muy baja en comparación. Sin embargo, cabe destacar que el uso de técnicas más o menos sensibles depende del tipo de muestra al que se va a aplicar. Si las muestras tienen niveles de analitos que entran dentro de los rangos lineales de la técnica, es correcto su empleo.

#### **1.4. Las nanopartículas de plata en producción animal:propiedades, interés y expectativas**

##### **1.4.1 Las AgNPs como antibióticos en piensos**

Los antibióticos se usaron durante muchos años como promotores de crecimiento en animales, ya que eliminan las bacterias del conducto gastrointestinal, permitiendo una absorción más eficaz de la comida. Sin embargo, esta práctica fue prohibida por la Unión Europea en el año 2003 <sup>8</sup>, debido a que se demostró que los antibióticos se pueden retener en los tejidos de los animales, provocando un aumento de la resistencia a éstos, lo que puede llegar a afectar a los consumidores <sup>15</sup>. Por lo tanto, se buscó una alternativa más segura: las AgNPs.

En los últimos años, se ha descubierto que ciertos microorganismos han adquirido resistencia a algunos antibióticos habituales, lo que presenta un gran problema, ya que las enfermedades causadas por estos microorganismos se han vuelto más difíciles de tratar. Sin embargo, gracias al auge de las nanopartículas metálicas, se ha podido contrarrestar este problema.<sup>6</sup>

La plata en forma de nanopartículas tiene propiedades antimicrobiales, además de una gran estabilidad, una dosis efectiva inferior y una toxicidad menor que los antibióticos, además de limitar drásticamente la resistencia bacteriana. También cabe destacar la posibilidad de controlar la estructura de estas nanopartículas, para cambiar sus propiedades fisicoquímicas y producir agentes antimicrobianos que no presenten toxicidad alguna a los consumidores. Por ello, actualmente se usan las AgNPs en piensos de animales. Para introducir las AgNPs en los piensos, se usan arcillas, como las caolinitas o las sepiolitas, debido a su alta capacidad de absorción de metales, que radica en su alta porosidad, área de superficie, capacidad de intercambio de iones y estabilidad química. Además, son altamente efectivas en la adsorción de toxinas.<sup>8</sup> Sin embargo, aunque ciertamente las AgNPs sean en cierta medida beneficiosas para los humanos, en dosis altas pueden ser altamente perjudiciales. Actualmente, se calcula que diariamente consumimos una cantidad de AgNPs de 20 a 80 µg, aproximadamente. Esto puede conllevar ciertos riesgos a la salud, como arritmia cardiaca o deformación espinal<sup>9</sup>. Se estima que la concentración límite de plata en agua potable es de aproximadamente 100 µg/L<sup>19</sup>.

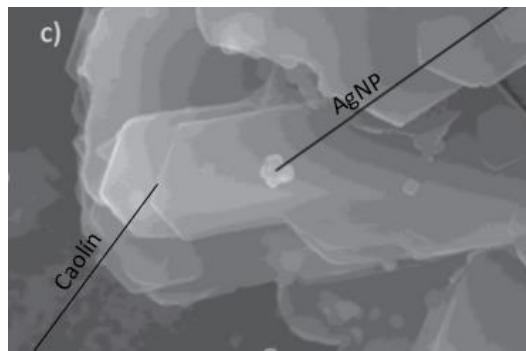


Figura 3. Imagen de una nanopartícula de plata sobre una lámina de caolín obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).<sup>8</sup>

Se ha observado que esta actividad antibacteriana puede afectar a las más de 100 trillones de bacterias que se encuentran en la microbiota o flora intestinal. Estas bacterias son vitales en diversas funciones fisiológicas, ya que intervienen en la síntesis de vitaminas o en el sistema inmune, entre otras.<sup>17</sup>

#### 1.4.2. Liberación de plata en organismos

La plata puede entrar en nuestro organismo por diferentes vías: por la piel, por el tracto respiratorio o por el tracto gastrointestinal (GIT), siendo este último el que tiene más incidencia. Tras ser ingerida la plata, ésta entra en contacto con diferentes fluidos, como la saliva en la boca o ácido clorhídrico en el estómago<sup>10</sup>. El primer cambio que sufren las nanopartículas de plata es la pérdida de parte de su recubrimiento, lo que provoca que las moléculas que sigan adheridas a las AgNPs liberen plata para re establecer el equilibrio.<sup>18</sup> Estos cambios pueden influir en la absorción de AgNPs, formando clústeres y sufriendo procesos de aglomeración, como resultado de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, o incluso presentándose en su forma iónica<sup>8</sup>.

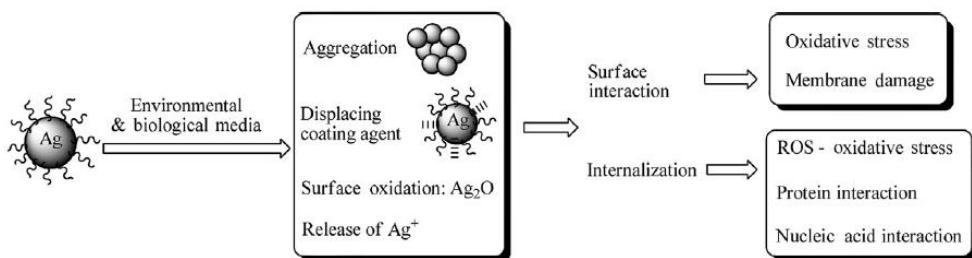


Figura 4. Esquema del mecanismo de liberación de AgNPs en los organismos<sup>6</sup>

En un estudio efectuado por miembros del grupo de investigación GEAS se observó que para una muestra de caolín plata, como la de nuestro objetivo de estudio, la mayor parte de plata liberada en agua ultrapura estaba en el filtrado, en su forma iónica. En resumen, el proceso de transformación de las AgNPs en los organismos es complejo, ya que hay que tener en cuenta la aglomeración y/o disolución de ellas. En dicho estudio se observó que en el estómago la conformación preferente de la plata era en forma de AgCl, es decir, iónica, mientras que, en el

intestino, las AgNPs tendían a agruparse formando complejos con las especies presentes en dicho medio, en su mayoría, enzimas<sup>8</sup>. Además, se observó una clara acumulación en diversos tejidos y órganos. En el caso de los humanos, se observa una decoloración azulada de la piel como resultado de la argiria para concentraciones altas de plata<sup>19</sup>. Además de la piel y músculos, se ha detectado plata en diversos órganos como el hígado, riñón, cerebro, pulmones, glándula salival y tiroidea. Sin embargo, la acumulación de plata en tejidos y órganos no es homogénea. Se observaron concentraciones que van desde los 35 µg de plata /g de tejido en el intestino delgado, pasando por 3-10 µg de plata /g de tejido en el estómago, hígado y riñones, hasta 1 µg de plata /g de tejido encontrados en pulmones, músculos y cerebro<sup>11</sup>.

La tabla 2 muestra resultados del contenido en plata en distintos tejidos y productos de digestión de cerdos; estos datos han sido aportados por estudios anteriores al tema de este TFG y llevados a cabo por miembros del grupo GEAS

	Treatment	Control		Kaolinite-Ag	Sepiolite-Ag	P
		µg Ag g <sup>-1</sup>	µg Ag g <sup>-1</sup>			
Liver	Day 14	< 0.009 (n = 2)	4.8 ± 1.4 (n = 6)	3.6 ± 1.6 (n = 6)	0.19	
	Day 62	< 0.009 (n = 4)	2.8 ± 1.2 (n = 5)	2.2 ± 0.6 (n = 5)	0.35	
	P	—	0.04	0.11		
Faeces	Day 14	0.05 ± 0.01 (n = 3)	114 ± 29 (n = 4)	141 ± 32 (n = 4)	0.25	
	Day 62	n.d.	n.d.	n.d.	—	
Muscle	Day 62	< 0.009 (n = 6)	< 0.009 (n = 6)	< 0.009 (n = 6)	—	

Tabla 2. Determinación del contenido de plata de tejidos musculares, hígado y heces liofilizados provenientes de cerdos alimentados con aditivos de caolinita-plata y sepiolita-plata.<sup>8</sup>

El recubrimiento de las AgNPs es vital a la hora de comprender su efecto antibacteriano. Estos recubrimientos se usan normalmente para estabilizar las AgNPs y evitar su aglomeración. Sin embargo, también pueden tener cierta toxicidad, causando muerte celular o estrés oxidativo. Entre los recubrimientos más comunes se encuentran los de polivinilpirrolidona o povidona (PVP) y citratos. Por ejemplo, el PVP se une fuertemente a las superficies metálicas, ofreciendo una gran estabilidad mediante repulsión estérica, mientras que el citrato se une débilmente, estabilizando las AgNPs mediante interacciones electrostáticas. En este último se observó que producía daño celular y cromosómico. Sin embargo, para el caso del PVP no se pudo demostrar ninguna toxicidad a esa concentración<sup>16</sup>.

Diversos estudios postulan que las AgNPs producen intoxicación pulmonar, acumulación de partículas en los pulmones, inflamación pulmonar y reducción de su capacidad. Además, la toxicidad implica daño al DNA, toxicidad mitocondrial, el incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la supresión de la membrana de potencial mitocondrial y el incremento de la consumición de oxígeno<sup>5</sup>. Cuando hay un exceso de ROS, moléculas como proteínas, ácidos nucleicos o lípidos se ven afectadas. Por ello, se producen modificaciones en la estructura del DNA bacteriano, como mutaciones, inserciones o delecciones, causando la muerte celular. Los iones de plata liberados por AgNPs inhiben varias proteínas incluyendo una subunidad ribosomal, causando la muerte de la bacteria debido a la falta de adenosina trifosfato (ATP)<sup>2</sup>.

El estudio de los materiales ha experimentado un gran crecimiento en los últimos años, debido a las especiales características de las nanopartículas. En especial, las nanopartículas de plata han sido investigadas debido a su toxicidad hacia diferentes organismos. Su toxicidad se basa en la emisión de iones de plata y en el pequeño tamaño y gran superficie de éstos, lo que los hace especialmente tóxicos frente a ciertas especies. Por lo tanto, se demostró que, por regla general, a menor tamaño de la nanopartícula, mayor es su toxicidad<sup>4</sup>.

Las AgNPs muestran una mayor afinidad a las bacterias gram-negativas que a las gram-positivas. Esto se debe a que las gram-positivas presentan unas capas de peptidoglicano mucho más gruesas en la pared celular que las gram-negativas, de ahí que se produzca un mayor impedimento estérico. Además, se ha demostrado que las AgNPs muestran afinidad hacia la capa de lipopolisacáridos característica de la pared celular de las gram-negativas, debido a su naturaleza aniónica, que atrae a las AgNPs, con carga positiva. Esta interacción produce variaciones morfológicas en la pared celular, aumentando su permeabilidad, lo que afecta a la integridad de la bacteria, causando finalmente su muerte.

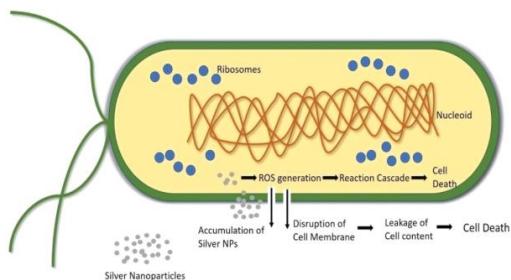
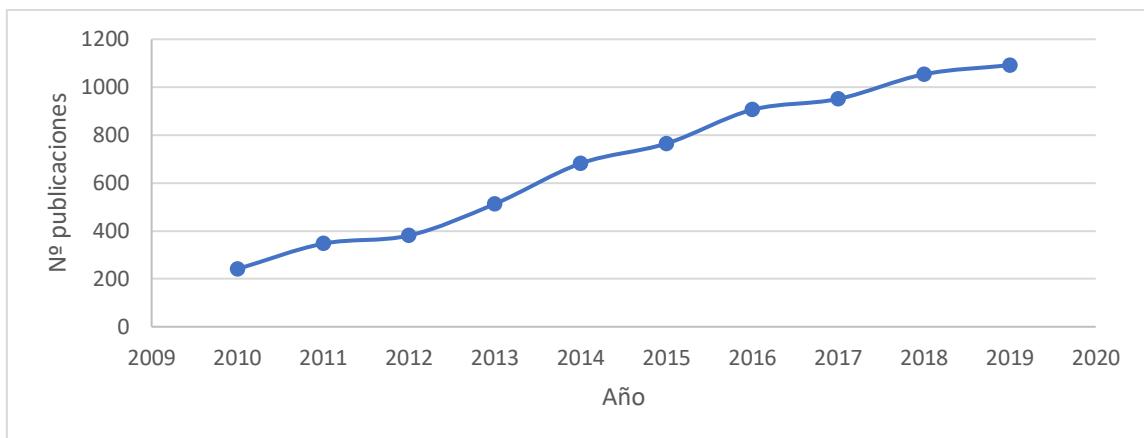


Figura 5. Mecanismo de acción antibacteriana de AgNPs <sup>6</sup>

Además, el aumento de la permeabilidad de la pared celular bacteriana puede permitir la entrada de AgNPs en su interior, aumentando aún más el daño celular, por ejemplo, interaccionando con los ácidos nucleicos o modificando la conformación del DNA bacteriano impidiendo la replicación del material genético<sup>6</sup>.

Para acabar este apartado se muestra una búsqueda bibliográfica sobre publicaciones referentes a la liberación de plata y su accesibilidad. Los términos de búsqueda son muy generales y no se ha entrado en hacer una distribución utilizando filtros. Solamente se desea apreciar el gran volumen de artículos publicados, que superan el millar hasta el año 2019. El gráfico 6 muestra esta tendencia.



Gráfica 6. Revisión bibliográfica de la liberación de AgNPs distribuida por año

Se ha querido aportar con esta búsqueda una idea de la importancia del tema; un estudio más exhaustivo haciendo una distribución de número de publicaciones por tipo de revista, tipo de aplicación o sistemas de caracterización, detección o separación sería objeto de una continuación de este trabajo

## 2.OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

El objetivo inicial de este trabajo era el estudio de la liberación de nanopartículas de plata de una muestra, la C3M, que es un aditivo alimentario para animales, mediante el cual se libera plata en sus organismos. El objetivo de este trabajo será la determinación de la liberación de plata en diferentes medios, ya sean acuosos o de otro tipo.

Ante la situación generada debido al Covid-19, el estudio experimental se modificó, de manera, que el nuevo objetivo experimental es conocer la cantidad total de plata que contiene la muestra originalmente y la cantidad de plata en forma de AgNPs que se libera en diversos medios. Aparte de ese objetivo de carácter experimental, se va a profundizar en realizar una revisión bibliográfica sobre la importancia de la plata y las nanopartículas de plata en la actualidad.

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

- Caracterización de la muestra: determinación de parámetros fisicoquímicos: pH, humedad y conductividad.
- Determinación del contenido total de plata en la muestra mediante Espectroscopía de Absorción Atómica en Llama (FAAS)
- Modelización de la accesibilidad de plata a los animales al ser suministrada mediante suplementos alimentarios y liberada en distintos medios. Influencia del tiempo. Se va a reproducir cuánta plata es accesible al organismo cuando se pone en contacto la muestra que contiene plata con medios diferentes.

Otros objetivos académicos que se desea alcanzar son:

- Saber buscar información sobre un tema para conocer antecedentes del mismo, saber manejar bibliografía y familiarizarse con recursos electrónicos.
- Mejorar la formación adquirida a lo largo de todo el Grado en cuanto al trabajo en un laboratorio e integración en labores de inicio de investigación
- Fomentar la capacidad de interpretar datos y resultados experimentales aplicando conocimiento del Grado de varias disciplinas y fundamentalmente de carácter analítico.

## **3. PARTE EXPERIMENTAL**

### **3.1. INSTRUMENTACIÓN Y MATERIAL**

#### **3.1.1. Instrumentación y Aparatos**

Se usaron dos espectrofotómetros de absorción atómica de llama (Perkin Elmer 2380 y Perkin Elmer AAnalyst 200) con lámpara de cátodo hueco (LCH) de plata, balanzas analíticas con precisión de  $\pm 0,1$  mg (GH-200), pHmetro (Crison Basic, Barcelona, España) y sonda de conductividad (HANNA INSTRUMENTS). En cuanto a los aparatos se utilizaron una estufa de laboratorio (máximo 300°C, precisión  $\pm 1^\circ\text{C}$ ) Memmert, Schwabach, Alemania, un microondas MARS HP-500 Plus DS (CEM Corporation, Matthews, EEUU), una centrífuga (Heraeus Multifugue X1R; Thermo Fisher Scientific, Walthman, EEUU) y un sistema de agitación rotatorio (Heidolph).

#### **3.1.2. Muestras, material y reactivos**

Se utilizaron dos muestras diferentes, las denominadas C2 y C3M, ambas basadas en un sistema de caolín( $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$ ), conteniendo la segunda nanopartículas de plata, mientras que la segunda se utiliza como referencia. Se utilizaron tubos Falcon de polipropileno de 15 y 50 mL, micropipetas de 50, 200 y de 1000  $\mu\text{L}$  (BIOHIT PROLINE y Bibby Sterilin) y pipetas Pasteur. En cuanto a los reactivos se utilizó  $\text{HNO}_3$  al 69 % (PanReac AppliChem), agua ultrapura (Millipore), acetato de sodio (Sigma Aldrich, Suiza), ácido acético (PanReac AppliChem), y como patrón se utilizó patrón de plata de 1000 ppm (Sigma Aldrich, Suiza).

### **3.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS**

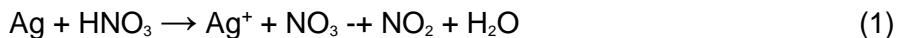
El objetivo fundamental de este trabajo es el sometimiento de la muestra de caolín-plata (C3M) a diferentes medios, para hacer un estudio de liberación mediante lixiviación y replicar las condiciones de la digestión de la muestra en animales, y, además, se hará un estudio del contenido total de plata en la muestra siguiendo dos métodos diferentes, ataque en baño de arena y en microondas. Las determinaciones se llevaron a cabo mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica de Llama (FAAS), con patrones de 0,5 a 5 mg/L con  $\text{HNO}_3$  al 1%.

#### **3.2.1. Estudio preliminar de pH, conductividad y humedad**

Para el estudio del pH y conductividad se tomaron tres réplicas de C3M y C2 de 50 mg y se llevaron a tubos Falcon de 50 mL, los cuales se enrasaron con agua ultrapura hasta llegar a los 50 mL; se agitaron durante una hora y se analizaron con un pHmetro y un conductímetro. Por otro lado, para los ensayos de humedad se tomaron tres réplicas de C3M y C2 de 1 g cada una y se llevaron a la estufa, donde estuvieron a 105 grados en tres intervalos de 1 hora cada uno. Después, se pesó el residuo seco.

#### **3.2.2. Determinación del contenido total de Ag**

Para llevar a cabo la determinación total de Ag en la muestra C3M se realizaron dos ataques ácidos: uno en microondas y otro en baño de arena. Estos ataques se basan en la acción oxidante del ácido nítrico para oxidar la Ag (0) presente en el sistema caolín-plata de la muestra C3M, a Ag (I). El ataque de la muestra sigue la siguiente reacción redox:



- **Ataque en microondas**

Se tomaron 2 réplicas de 100 mg de muestra C3M, se les añadió 1,5 mL de  $\text{HNO}_3$  al 69% y 1,5 de  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ. El ataque en microondas se llevó a cabo utilizando un programa de que trabajaba a una temperatura de 200 °C, 800 psi de presión y durante 30 minutos. Después, se llevó el producto de la reacción a 15 mL. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 5000 rpm durante 17 min, con un corte a 0,2 micras. Posteriormente, se extrajo 1 mL del sobrenadante y se llevó a 50 mL con  $\text{HNO}_3$  1%.

- **Ataque en baño de arena**

El ataque se realizó en abierto en tubos de teflón. Se hicieron 2 réplicas de C2, 2 de C3M de 0,1 g cada una y dos de blanco de ataque ( $\text{HNO}_3$  al 50 % únicamente, sometido al mismo proceso de calentamiento). A las muestras se les añadió 3 mL de  $\text{HNO}_3$  al 50 % y se introdujeron en baño de arena hasta sequedad. Tras evaporarse todo el contenido de los tubos, se vuelve a adicionar 3 mL de  $\text{HNO}_3$  al 50 % y se repite el proceso anterior hasta sequedad. Una vez concluido este proceso se traspasa el residuo sólido a tubos de 15 mL con ayuda de una disolución de  $\text{HNO}_3$  al 10 % y se lleva a los 10 mL. Después se centrifugaron las muestras a 3000 rpm durante 10 minutos. Del sobrenadante de cada uno de los tubos se extrajo 1 mL y se llevó a 50 mL con una disolución de  $\text{HNO}_3$  al 1 %.

### 3.2.3. Estudio de accesibilidad de plata

Para realizar este estudio se tomaron 8 réplicas de 50 mg de C3M y se enrasaron con 50 mL del medio objeto de estudio. En este caso, se hicieron tres experimentos con agua ultrapura, ácido nítrico y tampón de ácido acético-acetato, y se realizaron los ensayos por duplicado. La utilización del tampón de ácido acético-acetato se debe a que ofrece un valor de pH similar al de la muestra, como se explicará posteriormente. Las dos primeras se dejaron agitando durante 10 minutos y las siguientes durante 1 hora, 4 horas, 1 día y 2 días, respectivamente. Tras el proceso de agitación se centrifugan a 5000 rpm durante 17 minutos. Después de este paso se tomó 1 mL del sobrenadante y se le añadieron 2 mL de  $\text{HNO}_3$  al 1%. Posteriormente, se hizo la determinación por FAAS.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se presentarán y discutirán los resultados obtenidos a lo largo de todo el trabajo experimental, desde el primer estudio de calibración, el estudio de pH, conductividad y humedad de la muestra; pasando por los ensayos de determinación total de plata y terminando por los estudios de liberación de plata en varios medios.

### 4.1. Estudio estadístico de calibración

Para las calibraciones y determinaciones de contenido de plata total y liberado en distintos medios y llevadas a cabo por FAAS, se usaron los siguientes parámetros instrumentales:

	PE AAnalyst 200	PE 2380
Lámpara de Cátodo Hueco (LCH)	Plata (Ag)	Plata (Ag)
Longitud de onda ( $\lambda$ ) (nm)	328,07	328,07
Slit (mm)	0,8	0,7
Flujo de acetileno/oxidante (mL/min)	2,5/10	15/35
Tiempo de integración (s)	1	1
Tiempo de retraso (s)	2	2
Número de réplicas	3: patrones, muestras 10: blanco	3: patrones, muestras 10: blanco
Intensidad (mA)	12	12

Tabla 3. Parámetros instrumentales para los espectrofotómetros utilizados

Para la calibración se prepararon patrones de 1, 2, 3, 4, 5, 7 y 10 mg/L de Ag en  $\text{HNO}_3$  1%. Se realizaron dos experimentos simultáneamente: se quiso comprobar si se producen diferencias significativas si en vez de usar una disolución de  $\text{HNO}_3$  1% para enrasar, se añade un volumen de  $\text{HNO}_3$  más concentrado, al 10%, y se enrasa con agua milliQ. Para ello se prepararon los patrones, se enrascaron usando los dos métodos, se analizaron en el espectrofotómetro de absorción atómica de llama y se procedió a comparar las dos rectas de calibrado llevándose a cabo un test t de dos colas, para saber si la diferencia entre las dos rectas era o no significativa, obteniéndose los siguientes resultados:

	Pendiente usando $\text{HNO}_3$ 10% +agua milliQ	Pendiente usando $\text{HNO}_3$ 1%
Magnitud	0,0462	0,0433
Incertidumbre	0,00359	0,00183
Grados de libertad	4	4

Tabla 4. Resultados del test t para las pendientes de ambas gráficas.

Aplicando el test t de dos colas se obtiene que las diferencias entre ambas rectas de calibrado no son significativas, por lo que se deduce que no hay diferencias entre ambos métodos. Esto significa, que se pueden usar ambos métodos a la hora de preparar las rectas de calibrado, ya que ofrecen resultados similares.

#### 4.2 Caracterización de parámetros físico-químicos de la muestra pH, conductividad y humedad de la muestra

Estos estudios preliminares son importantes a la hora de conocer las características de las muestras con las que se va a trabajar, ya que a partir de éstas se puede deducir su comportamiento al ser sometidas a diferentes medios. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Muestra	pH	Conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	Humedad %
C2	$5,47 \pm 0,36$	$10,00 \pm 9,80$	$0,59 \pm 0,43$
C3M	$5,38 \pm 0,04$	$0,00 \pm 0,00$	$1,23 \pm 0,53$

Tabla 5. Valores promedio de pH, conductividad y humedad. Intervalo de confianza  $\alpha=0,05$ .

Como se puede ver, ambas muestras arrojaron valores de pH muy parecidos, siendo este ligeramente ácido. Se observó que ambas muestras exhiben una conductividad prácticamente nula, siendo en el caso de la muestra C2 muy pequeña y en la C3M cero. Por ello, se puede deducir que la muestra C3M, objetivo de nuestro estudio, no es conductora. Ello se debe al tratamiento de preparación de la muestra, anterior a todos los experimentos realizados en este trabajo. Se obtuvieron unos valores de humedad muy bajos, y se observó que prácticamente toda la humedad se evaporó en el primer intervalo de 1 h, permaneciendo el porcentaje de humedad de las muestras prácticamente invariable hasta llegar a pesada constante.

#### 4.3. Determinación del contenido total de plata

Se realizaron dos ataques con medio ácido con dos métodos distintos: uno en horno de microondas y otro en baño de arena con vasos de teflón. Utilizando un horno microondas para disolver la muestra, se encontró que el contenido de plata en % en el suplemento alimentario C3M es de  $8,52 \pm 7,36$  %, mientras que el contenido de plata es de  $10,23 \pm 0,78$  % mediante ataque en sistema abierto y tubos de teflón, ligeramente superior a la muestra C3 sometida a un tratamiento inicial diferente.

Mediante ataque microondas, el resultado obtenido no es preciso debido a que las réplicas reflejaron valores de absorbancia muy dispares, generando una desviación estándar muy alta. Se llevó a cabo este ataque para tener otro dato de contenido total de plata aparte del ataque ácido convencional en abierto. Fue un estudio meramente orientativo. Se realizaron dos réplicas y en una de ellas el ataque no fue cuantitativo, redundando en la excesiva imprecisión de las medidas; pero el resultado aportó un dato importante: el porcentaje de plata en esta muestra era del mismo orden que el de otra muestra de caolín (C3) analizada por el grupo de investigación y de características muy similares. Con este dato se procedió a realizar el ataque en abierto en baño de arena. En la tabla 6 se resumen los datos.

TIPO DE PREPARACIÓN DE MUESTRA	% plata total
Ataque en horno microondas	$8,52 \pm 7,36$
Ataque ácido en sistema abierto	$10,23 \pm 0,78$

Tabla 6. Valores de contenido total de plata para el ataque en microondas.

#### 4.4. Estudios de accesibilidad de Ag en diferentes medios

Como se ha descrito anteriormente, se procedió a lixiviar la muestra C3M en diferentes medios, a diferentes intervalos de tiempo, desde los 10 minutos de lixiviación, hasta las 48 horas. La lixiviación se llevó a cabo mediante agitación durante los intervalos de tiempo indicados. Esto permitirá replicar el proceso de digestión de la plata presente en piensos en animales y así conocer como la muestra se libera según el medio en el que se encuentre. Por ello, se probaron diferentes medios, para saber cual era el más eficaz a la hora de lixiviar plata de la muestra. Las dos variables estudiadas en este estudio son el medio donde se libera la plata y el tiempo al que la muestra se somete a este proceso.

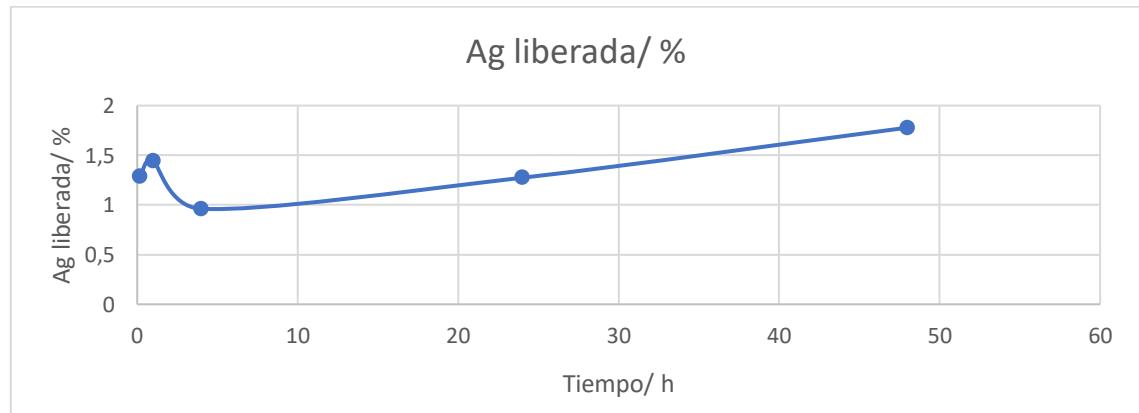
#### 4.4.1 Estudio de accesibilidad de plata en agua ultrapura

En primer lugar se sometió al caolín C3M a una lixiviación en agua a diferentes intervalos de tiempo; 10 minutos, 1 hora, 4 horas, 24 horas y 48 horas. El agua es el medio más aproximado al natural en el proceso de digestión.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tiempo transcurrido	% Ag liberada
10 min	1,24± 0,02
1 h	1,40± 0,02
4 h	0,93± 0,07
24 h	1,30± 0,03
48 h	1,75± 0,10

Tabla 7. Valores de porcentaje de plata liberada a diferentes intervalos de tiempo.



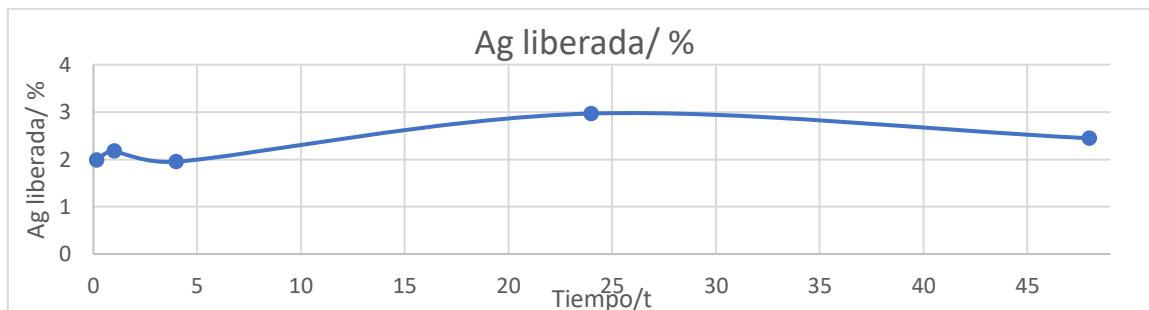
Se puede concluir que la cantidad de plata liberada es muy baja y prácticamente se libera casi en su totalidad en la primera hora. Los valores oscilan entre 0,90 y 1,40 %, hasta 24 h. El aumento que supone dejarlo 48 horas, hasta un 1,75 %, no es significativo. La cantidad de plata se mantiene constante. Por lo tanto, se obtiene un valor de liberación promedio durante las primeras 24 horas de 1,22± 0,20 %.

#### 4.4.2. Estudio de accesibilidad de plata en $\text{HNO}_3$ 1%

Se siguió el mismo procedimiento que el descrito para el caso anterior. El medio  $\text{HNO}_3$  1%, un medio ácido diluido, es el medio habitual en el que las disoluciones de plata son estables, también utilizado en la preparación de patrones, de ahí el interés por saber cuánta plata es accesible en este medio y a diferentes tiempos. Para las disoluciones resultantes, se hizo la determinación por FAAS, obteniéndose los siguientes resultados:

Tiempo transcurrido	% Ag liberada
10 min	1,98± 0,02
1 h	2,17 ± 0,00
4 h	1,95 ± 0,04
24 h	2,96± 0,07
48 h	2,44± 0,26

Tabla 8. Valores de porcentaje de plata liberada a diferentes intervalos de tiempo



Gráfica 8. Valores de porcentaje de plata liberada en función del tiempo.

En este caso, se observa una tendencia diferente con respecto a la lixiviación en agua ultrapura. Primero, los valores obtenidos son generalmente superiores a los del caso anterior. Segundo, esta vez sí que se observa un máximo en la gráfica, tras haber transcurrido 24 horas, puesto que en las primeras cuatro horas se observa la misma tendencia que en el caso anterior, pero, sin embargo, después de haber transcurrido 24 horas, el valor de plata liberada tiende a disminuir. Por lo tanto, se observa que el tiempo óptimo de lixiviación de plata en ácido nítrico al 1% es 24 horas. Los valores, generalmente mayores que en el caso anterior, se deben a la capacidad oxidante del ácido nítrico, que oxida la  $\text{Ag}^0$  a  $\text{Ag}^+$ , y al medio ácido en el que se produce la liberación, ya que aunque está diluido ayuda en el proceso de lixiviación. El valor promedio de porcentaje de liberación es del  $2,39 \pm 0,42\%$ , por lo que se puede concluir que se libera algo más de plata en este medio ácido, como cabía esperar.

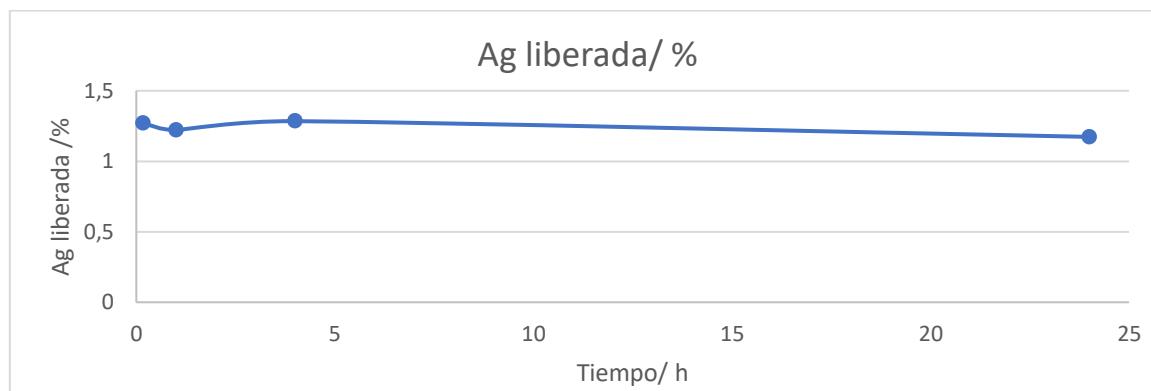
#### 4.4.3. Estudio de accesibilidad de plata en ácido acético/acetato

Como se ha descrito antes, el valor de pH obtenido para la muestra C3M era aproximadamente 5,4. Por lo tanto, se decidió elegir un tampón que se asemejase lo máximo posible a ese valor de pH, el de ácido acético/acetato ( $\text{pH}=4,7$ ). Una vez preparada esta disolución se siguieron los mismos pasos que en los anteriores ensayos de liberación.

Posteriormente, se hizo la determinación por FAAS, obteniéndose los siguientes resultados:

Tiempo transcurrido	% Ag liberada
10 min	1,17 ± 0,01
1 h	1,19 ± 0,01
4 h	1,72 ± 0,36
24 h	1,08 ± 0,40

Tabla 9. Valores de porcentaje de plata liberada a diferentes intervalos de tiempo.



Gráfica 9. Valores de porcentaje de plata liberada en función del tiempo.

Cuando se pone en contacto un medio orgánico cuyo pH es similar al del caolín, de aproximadamente 5, a diferencia que en los anteriores, se observa un valor constante y muy similar a lo largo de todo el experimento, arrojando un valor máximo muy parecido al estudio de liberación en agua ultrapura. Por ello, se puede deducir que el proceso de liberación de plata en este tampón transcurre muy rápido, ya que el porcentaje liberado prácticamente no varía desde los 10 minutos hasta las 24 horas, dando un valor promedio de  $1,29 \pm 0,28\%$ . En conclusión, con someter la muestra de plata en este medio a agitación 10 minutos es suficiente para sacar el mayor rendimiento posible.

En el siguiente gráfico se exponen los valores del porcentaje de Ag liberada en los distintos medios estudiados y a diferentes intervalos de tiempo. Excepto en el caso del medio ácido, que se libera una cantidad mayor de Ag, la cantidad de plata liberada es inferior al 2% a cualquier intervalo de tiempo.

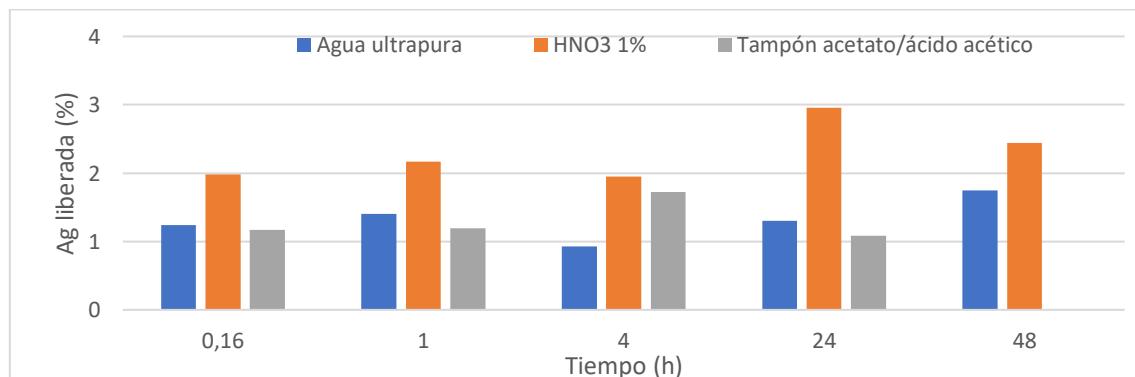


Gráfico 10. % de plata liberada en distintos medios

La cantidad de plata liberada se puede considerar de forma cualitativa similar hasta cuatro horas, para los tres medios. Y aumenta cuando se trabaja con ácido (ya que se disuelve mayor cantidad de plata) y también aumenta con el tiempo. En cualquier caso no es superior al 3 %.

#### 4.5. Comparativa de cantidad de plata total y accesible en muestras C3 y C3M

En este apartado se realiza una comparativa entre la muestra C3M objeto de este trabajo, y una muestra de caolin pretratada de forma distinta, denominada C3 y que fue estudiada en un Trabajo de Fin de Grado anterior <sup>21</sup>. Se comparan los contenidos totales de plata (en porcentaje) que inicialmente llevan las muestras, así como las cantidades liberadas, que pasan a disolución por ambas muestras tanto en agua como en HNO<sub>3</sub> 1% .

MUESTRA	Contenido total C3M / %	Desviación estándar / s
C2	---	
C3M	10,23	0.78
C3	8,42	0.08

Tabla 10. Comparativa de contenidos totales de las muestras de caolín

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos respecto de la cantidad de plata liberada y accesible por las muestras que contienen plata. El estudio se ha realizado a diferentes tiempos de delixiviación.

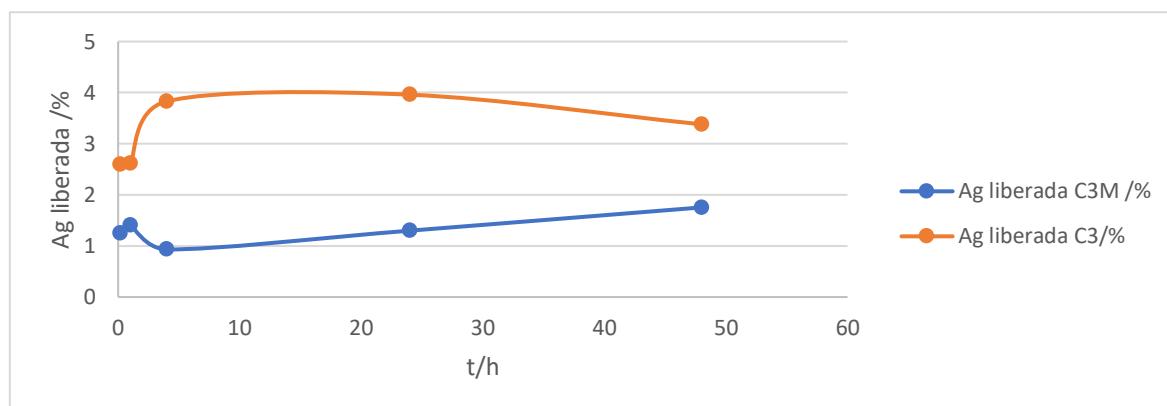
t (h)	H <sub>2</sub> O ultrapura		HNO <sub>3</sub> 1%	
	C3M	C3	C3M	C3
0,1666	1,24± 0,02	2,60± 0,02	1,98± 0,02	3,66± 0,89
1	1,40± 0,02	2,62± 0,19	2,17 ± 0,00	4,06± 0,07
4	0,93± 0,07	3,83± 0,79	1,95 ± 0,04	4,32± 0,17
24	1,30± 0,03	3,96± 0,68	2,96± 0,07	8,21± 0,34
48	1,75± 0,10	3,38± 0,64	2,44± 0,26	8,31± 0,45

Tabla 11. Comparativa de porcentajes de Ag liberada por las muestras de caolín en función del tiempo

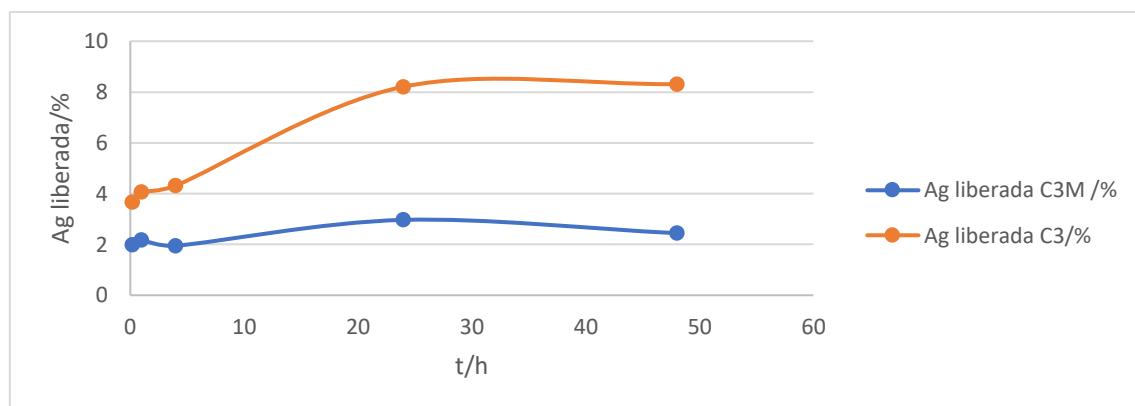
Se observa que como regla general, los valores de plata liberada son mayores en el caso de la muestra C3 con respecto a la C3M. Esto podría deberse a que en la muestra C3 hay una mayor cantidad de plata ya inicialmente, hecho que explicaría por qué, ante un mismo medio, una muestra libera más plata que la otra. Sin embargo, en la tabla 10 se puede observar que la muestra C3 tiene un contenido de plata algo inferior al de la muestra C3M. Otra hipótesis podría ser que ambas tuvieran una matriz o estructura diferente, lo que explicaría la diferencia en su comportamiento ante un mismo medio. Esta alternativa es la elegida, ya que se diferencian en el tratamiento inicial con el que han sido preparadas, y que puede afectar a que la liberación de plata de la estructura del sólido sea más fácil en una muestra que en otra.

En este caso, se sigue una tendencia parecida con respecto al caso anterior, con la única diferencia que las cantidades de plata liberadas, en especial para los datos correspondientes a 24 y 48 h, son significativamente mayores para la muestra C3. Ante un medio ácido, se observa

como cabría esperar, una mayor liberación de plata en ambos casos con respecto al agua ultrapura, ya que el ácido nítrico tiene un gran poder oxidante, pudiendo oxidar Ag(0) a Ag(I).



Gráfica 11. Comparativa de estudio de liberación de plata para las muestras C3 y C3M en agua ultrapura.



Gráfica 12. Comparativa de estudio de liberación de plata para las muestras C3 y C3M en  $\text{HNO}_3$  al 1%.

Los anteriores gráficos muestran de forma más visual estas tendencias. Las líneas naranjas corresponden a la cantidad de plata liberada por la muestra C3 y la linea azul, corresponde a la muestra C3M.

Este trabajo está incluido en los estudios de tipos de suplementos alimentarios que van a liberar plata accesible a los animales y es necesario relacionar y comparar datos aportados por diferentes vías, como son este trabajo de fin de grado y otro anterior <sup>21</sup>. El siguiente paso es comprobar qué sucede con medios más similares a los medios que se encuentran en un proceso de digestión animal, medios biológicos a los cuales se puede liberar plata procedente de estos caolines y que va a resultar accesible al animal en un proceso, ya que simula un caso real. El trabajo quedó interrumpido y modeliza con medios de laboratorio (agua, ácido nítrico y tampón) la accesibilidad de plata a los animales. El trabajo experimental debería haber continuado con medios más similares a los procesos biológicos.

## 5.CONCLUSIONES

A partir de todas las experiencias llevadas a cabo durante este estudio se puede concluir que:

1. Al realizar la calibración, no se han encontrado diferencias significativas entre la preparación de los patrones con disolución de  $\text{HNO}_3$  al 1% y con  $\text{HNO}_3$  al 10 % y agua. Por lo tanto, se escogió la primera opción, que es más práctica y rápida.
2. Los estudios de pH, conductividad y humedad demostraron que las muestras C3M y C2 tienen un pH ligeramente ácido debido a la presencia de caolín en las muestras. En cuanto a la humedad, ésta es de aproximadamente 0,6 y 1,2%, respectivamente.
3. El contenido total de plata en la muestra C3M fue de  $10,23 \pm 0,78$  %, realizando un ataque ácido en sistema abierto.
4. Se realizó un estudio de liberación de plata en diferentes medios de lixiviación (agua ultrapura,  $\text{HNO}_3$  al 1% y tampón de ácido acético/acetato. Los contenidos fueron en casi todos los casos inferiores al 2%. Se concluyó que la variable tiempo no juega un factor importante en la liberación de plata.
5. La comparación de los datos de plata liberada en dos muestras de caolín revelan que es mayor para una muestra que para otra, debido al tratamiento inicial con el que se prepararon los lotes de ambos suplementos alimentarios.
6. La búsqueda bibliográfica ha aportado información sobre labores de investigación sobre plata y fundamentalmente nanopartículas de plata, tanto en cuanto a técnicas de detección como técnicas de separación. Asimismo, se ha buscado información sobre la influencia que ejerce la plata aportada y accesible a los organismos.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- (1) Wang, Y.; Zhang, X.; Bai, Y.; Li, W.; Li, X.; Xing, X.; Dupadahalli, K.; Rudramurthy, G. R.; Anticancer and Antibacterial Activities of Silver Nanoparticles (AgNPs) Synthesized from Cucumis Melo L. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2020**, 20 (7),
- (2) Harada, A.; Ichimaru, H.; Kawagoe, T.; Tsushida, M.; Niidome, Y.; Tsutsuki, H.; Sawa, T.; Niidome, T. Gold-Treated Silver Nanoparticles Have Enhanced Antimicrobial Activity. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2019**, 92 (2), 297–301.
- (3) Keshari, A. K.; Srivastava, R.; Singh, P.; Yadav, V. B.; Nath, G. Antioxidant and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. *J. Ayurveda Integr. Med.* **2018**, 1–8.
- (4) Abramenko, N. B.; Demidova, T. B.; Abkhalimov, E. V.; Ershov, B. G.; Krysanov, E. Y.; Kustov, L. M. Ecotoxicity of Different-Shaped Silver Nanoparticles: Case of Zebrafish Embryos. *J. Hazard. Mater.* **2018**, 347, 89–94.
- (5) Ma, W.; He, S.; Ma, H.; Jiang, H.; Yan, N.; Zhu, L.; Bang, J. J.; Li, P. A.; Jia, S. Silver Nanoparticle Exposure Causes Pulmonary Structural Damage and Mitochondrial Dynamic Imbalance in the Rat. *Int. J. Nanomedicine* **2020**, 15, 633–645.
- (6) Gharpure, S.; Akash, A.; Ankamwar, B. A Review on Antimicrobial Properties of Metal Nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2019**, 20 (6), 3303–3339.
- (7) Dadfarnia, S.; Shabani, A. M. H.; Kazemi, E.; Khormizi, S. A. H.; Tammadon, F. Synthesis of Nano-Pore Size Ag(I)-Imprinted Polymer for the Extraction and Preconcentration of Silver Ions Followed by Its Determination with Flame Atomic Absorption Spectrometry and Spectrophotometry, *J. Braz. Chem. Soc.* **2015**, 26 (6), 1180–1190.
- (8) Abad-Álvaro, I.; Trujillo, C.; Bolea, E.; Laborda, F.; Fondevila, M.; Latorre, M. A.; Castillo, J. R. Silver Nanoparticles-Clays Nanocomposites as Feed Additives: Characterization of Silver Species Released during in Vitro Digestions. Effects on Silver Retention in Pigs. *Microchem. J.* **2019**, 149 (March), 104040.
- (9) Wu, W.; Zhang, R.; McClements, D. J.; Chefetz, B.; Polubesova, T.; Xing, B. *Transformation and Speciation Analysis of Silver Nanoparticles of Dietary Supplement in Simulated Human Gastrointestinal Tract*; **2018**; Vol. 52.
- (10) Pindáková, L.; Kašpárová, V.; Kejlová, K.; Dvořáková, M.; Krsek, D.; Jírová, D.; Kašparová, L. Behaviour of Silver Nanoparticles in Simulated Saliva and Gastrointestinal Fluids. *Int. J. Pharm.* **2017**, 527 (1–2), 12–20.
- (11) Hadrup, N.; Lam, H. R. Oral Toxicity of Silver Ions, Silver Nanoparticles and Colloidal Silver - A Review. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2014**, 68 (1), 1–7
- (12) Miller, D.; Rutzke, Atomic Absorption Spectroscopy, Atomic Emission Spectroscopy, and Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry M. Analysis 2. *Agro Food Ind. Hi. Tech.* **2014**, 25 (1), 29–31..
- (13) Liu, J. F.; Yu, S. J.; Yin, Y. G.; Chao, J. B. Methods for Separation, Identification, Characterization and Quantification of Silver Nanoparticles. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2012**, 33, 95–106.

- (14) 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. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *904*, 10–32.
- (15) Zheng, K.; Setyawati, M. I.; Leong, D. T.; Xie, J. Antimicrobial Silver Nanomaterials. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *357*, 1–17.
- (16) Nallanthighal, S.; Chan, C.; Bharali, D. J.; Mousa, S. A.; Vásquez, E.; Reliene, R. Particle Coatings but Not Silver Ions Mediate Genotoxicity of Ingested Silver Nanoparticles in a Mouse Model. *NanoImpact* **2017**, *5*, 92–100.
- (17) van den Brule, S.; Ambroise, J.; Lecloux, H.; Levard, C.; Soulard, R.; De Temmerman, P. J.; Palmai-Pallag, M.; Marbaix, E.; Lison, D. Dietary Silver Nanoparticles Can Disturb the Gut Microbiota in Mice. *Part. Fibre Toxicol.* **2016**, *13* (1), 1–16.
- (18) McShan, D.; Ray, P. C.; Yu, H. Molecular Toxicity Mechanism of Nanosilver. *J. Food Drug Anal.* **2014**, *22* (1), 116–127.
- (19) Deshmukh, S. P.; Patil, S. M.; Mullani, S. B.; Delekar, S. D. Silver Nanoparticles as an Effective Disinfectant: A Review. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *97* (July 2018), 954–965.
- (20) Yang, X.; Jia, Z.; Yang, X.; Li, G.; Liao, X. Cloud Point Extraction-Flame Atomic Absorption Spectrometry for Pre-Concentration and Determination of Trace Amounts of Silver Ions in Water Samples. *Saudi J. Biol. Sci.* **2017**, *24* (3), 589–594.
- (21) Teixidó Baches, N., *Estudios de liberación de plata a partir de nanocomuestos de interés alimentario para producción animal*, Trabajo de fin de Grado, **2019**
- (22) Wu, H. Z.; Meng, L. F. Flame Atomic Absorption Spectrometry Determination of Silver Nanoparticles in Environmental Waters Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction. *Appl. Ecol. Environ. Res.* **2018**, *16* (5), 5705–5714.
- (23) Porcaro, F.; Roudeau, S.; Carmona, A.; Ortega, R. Advances in Element Speciation Analysis of Biomedical Samples Using Synchrotron-Based Techniques. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2018**, *104*, 22–41.
- (24) Mitrano, D. M.; Barber, A.; Bednar, A.; Westerhoff, P.; Higgins, C. P.; Ranville, J. F. Silver Nanoparticle Characterization Using Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation ICP-MS (AF4-ICP-MS). *J. Anal. At. Spectrom.* **2012**, *27* (7), 1131–1142.
- (25) Proulx, K.; Hadioui, M.; Wilkinson, K. J. Separation, Detection and Characterization of Nanomaterials in Municipal Wastewaters Using Hydrodynamic Chromatography Coupled to ICPMS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408* (19), 5147–5155.
- (26) Balakumar, V.; Prakash, P.; Muthupandi, K.; Rajan, A. Nanosilver for Selective and Sensitive Sensing of Saturnism. *Sensors Actuators, B Chem.* **2017**, *241*, 814–820.
- (27) Lordan, F.; Damm, S.; Kennedy, E.; Mallon, C.; Forster, R. J.; Keyes, T. E.; Rice, J. H. The Effect of Ag Nanoparticles on Surface-Enhanced Luminescence from Au Nanovoid Arrays. *Plasmonics* **2013**, *8* (4), 1567–1575.

- (28) Dimitrijević, R.; Cvetković, O.; Miodragović, Z.; Simić, M.; Manojlović, D.; Jović, V. SEM/EDX and XRD Characterization of Silver Nanocrystalline Thin Film Prepared from Organometallic Solution Precursor. *J. Min. Metall. Sect. B Metall.* **2013**, *49* (1), 91–95.
- (29) Rocha, F. S.; Gomes, A. J.; Lunardi, C. N.; Kaliaguine, S.; Patience, G. S. Experimental Methods in Chemical Engineering: Ultraviolet Visible Spectroscopy—UV-Vis. *Can. J. Chem. Eng.* **2018**, *96* (12), 2512–2517.
- (30) López-Mayán, J. J.; Cerneira-Temperán, B.; Peña-Vázquez, E.; Barciela-Alonso, M. C.; Domínguez-González, M. R.; Bermejo-Barrera, P. Evaluation of a Cloud Point Extraction Method for the Preconcentration and Quantification of Silver Nanoparticles in Water Samples by ETAAS. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2018**, *98* (15), 1434–1447.
- (31) Dong, L. J.; Lai, Y. J.; Yu, S. J.; Liu, J. F. Speciation Analysis of the Uptake and Biodistribution of Nanoparticulate and Ionic Silver in Escherichia Coli. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (19), 12525.
- (32) Zheng, L. N.; Sang, Y. B.; Luo, R. P.; Wang, B.; Yi, F. T.; Wang, M.; Feng, W. Y. Determination of Silver Nanoparticles in Single Cells by Microwell Trapping and Laser Ablation ICP-MS Determination. *J. Anal. At. Spectrom.* **2019**, *34* (5), 915–921.
- (33) Li, L.; Wang, Q.; Yang, Y.; Luo, L.; Ding, R.; Yang, Z. G.; Li, H. P. Extraction Method Development for Quantitative Detection of Silver Nanoparticles in Environmental Soils and Sediments by Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (15), 9442–9450.
- (34) Michalke, B.; Vinković-Vrček, I. Speciation of Nano and Ionic Form of Silver with Capillary Electrophoresis-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2018**, *1572*, 162–171.
- (35) Panyabut, T.; Sirirat, N.; Siripinyanond, A. Use of Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry for Size Profiling of Gold and Silver Nanoparticles. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1000*, 75–84.
- (36) Roman, M.; Rigo, C.; Castillo-Michel, H.; Munivrana, I.; Vindigni, V.; Mičetić, 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**, *408* (19), 5109–5124.
- (37) González-Fuenzalida, R. A.; Moliner-Martínez, Y.; Molins-Legua, C.; Campíns-Falcó, P. Miniaturized Liquid Chromatography Coupled On-Line to in-Tube Solid-Phase Microextraction for Characterization of Metallic Nanoparticles Using Plasmonic Measurements. A Tutorial. *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1045*, 23–41.
- (38) Vidal JC, Torrero D, Menés S, de La Fuente A, Castillo JR. Voltammetric sensing of silver nanoparticles on electrodes modified with selective ligands by using covalent and electropolymerization procedures. Discrimination between silver(I) and metallic silver. *Mikrochim Acta*. **2020**;187(3):183

## ANEXO I. Estudio de calibración: influencia de preparación de los patrones para la determinación de Ag por FAAS

### a) Preparación de patrones a partir de $\text{HNO}_3$ 10%

Concentración / mg/L	masa de patrón de Ag añadida / g	masa de $\text{HNO}_3$ añadida/ g	masa final tras enrasar con $\text{H}_2\text{O}$ milliQ/ g
1	0,1863	1,5962	14,9543
2	0,3536	1,6014	14,9508
3	0,5610	1,6147	15,0165
4	0,7450	1,6009	15,0512
5	0,9412	1,6154	14,9515
7	1,3094	1,5991	14,9584
10	1,8220	1,6175	15,0352

Tabla 1. Cantidades añadidas para calibración con  $\text{HNO}_3$  (10%)

Concentración real / mg/L	Señal AAS	DS	DSR
0	0,0004	0,0004	30,1
0,9963	0,033	0,0004	1,4
1,886	0,117	0,0039	3,3
2,992	0,12	0,0005	0,4
3,973	0,209	0,0244	11,7
5,019	0,252	0,0034	1,3
<b>6,983*</b>	0,296	0,074	2,5
<b>9,717*</b>	0,537	0,0214	4

\*: valores de concentración fuera del rango lineal

Tabla 2. Recta de calibrado con  $\text{HNO}_3$  (10%)

**b) Preparación de patrones enrasando directamente con  $\text{HNO}_3$  (1%)**

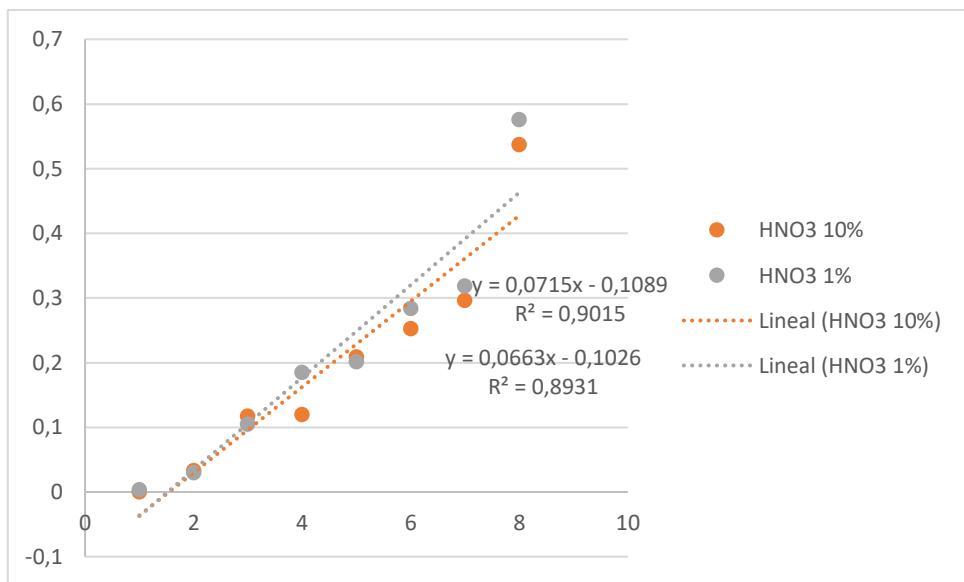
Disolución intermedia de patrón de Ag	Concentración / mg/L	masa de patrón de Ag añadida / g	masa de $\text{HNO}_3$ (1%) añadida / g
100 ppm	1	0,1533	15,000
	2	0,2894	14,994
60 ppm	3	0,7510	14,989
	4	1,0008	14,990
	5	1,2514	15,083
	7	1,7485	14,993
	10	2,6531	15,002

Tabla 3. Cantidades añadidas para calibración con  $\text{HNO}_3$  (1%)

Concentración / ppm	Señal AAS	DS	DSR
0	0,003	0,0002	5,9
0,9963	0,03	0,0005	1,7
1,886	0,105	0,0016	1,5
2,992	0,185	0,0025	1,4
3,973	0,201	0,0023	1,2
5,019	0,284	0,0179	6,5
<b>6,983*</b>	0,318	0,0036	1,1
<b>9,717*</b>	0,576	0,0066	1,2

\*: valores de concentración fuera del rango lineal

Tabla 4. Recta de calibrado con  $\text{HNO}_3$  (1%)



Gráfica 1. Comparación de ambas calibraciones

**Anexo II. Preparación de muestras para la determinación del contenido total de plata en el aditivo alimentario. Modelo y ejemplo de tablas diseñadas**

Muestra	masa de muestra / g	masa de sobrenadante añadida / g	masa final tras enrasar con $\text{HNO}_3$ al 1% / g
Blanco 1		1,0312	50,0068
Blanco 2		1,1010	50,0244
C2.1	0,1029	1,0652	50,0159
C2.2	0,0990	1,0905	50,0648
C3M.1	0,1013	1,0587	50,0234
C3M.2	0,0999	1,0611	50,0632

Tabla 5. Ejemplo de preparación de muestras

	Señal AAS	C obtenida / (mg/L)	Dilución 50 mL	Dilución 1 mL	C <sub>total</sub> / (mg/L)	Vol. final /mL	Masa/ g	Masa muestra / mg	% muestra
C3M.1	0,055	1,96	50,0234	1,0587	1004,98	10,8518	0,0109	0,1029	10,59

Tabla 6. Cálculos realizados para hallar el contenido total de plata

**Anexo III. Preparación de muestras para la liberación de plata desde el aditivo alimentario en distintos medios. Modelo y ejemplo de tablas diseñadas**

	Señal AA	Cobtenida/ (mg/l)	Dilución 50 mL	Dilución 1 mL	Ctotal/ (mg/l)	Volumen aforado/mL	Masa/ g	Masa muestra/ mg	% muestra
C3M.1 10 min	0,046	1,448	50,0171	0,9705	217,8	2,9195	0,0006	0,0525	1,21
C3M.2 10 min	0,047	1,458	50,0069	0,9458	226,5	2,9385	0,0006	0,0519	1,28
C3M.1 1h	0,053	1,64	51,1857	0,9913	247,5	2,9231	0,0007	0,0505	1,43
C3M.2 1h	0,052	1,607	50,0156	1	246,6	3,0094	0,0007	0,0537	1,38
C3M.1 4h	0,014	0,974	49,8584	0,9822	147,0	2,9734	0,0004	0,053	0,82
C3M.2 4h	0,016	1,12	50,204	0,9912	172,2	3,0352	0,000	0,0502	1,04
C3M.1 24h	0,026	1,513	50,0284	0,9675	229,4	2,9318	0,0006	0,0527	1,27
C3M.2 24 h	0,025	1,454	50,0453	0,9884	221,1	3,0029	0,0006	0,0502	1,32
C3M.1 48 h	0,027	1,675	50,0162	0,986	255,1	3,0019	0,0007	0,053	1,44
C3M.2 48 h	0,037	2,297	49,9969	0,9793	351,4	2,9965	0,0010	0,051	2,06

Tabla 7. Preparación de muestra y cálculos realizados para determinar el porcentaje de plata liberada a diferentes tiempos.