



Departamento de
Química Analítica
Universidad Zaragoza

DETECCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES Y BIOLÓGICAS



TRABAJO FIN DE MÁSTER

Departamento de Química Analítica, Universidad de Zaragoza

Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores

ISABEL ABAD ÁLVARO

Junio 2013



Departamento de
Química Analítica
Universidad Zaragoza

D. **Eduardo Bolea Morales**, profesor Titular del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza

AUTORIZA

por el presente documento a **Dña. Isabel Abad Álvaro** a presentar la memoria del Trabajo Fin de Máster con el título "DETECCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES Y BIOLÓGICAS" realizado bajo mi dirección.



Departamento de
Química Analítica
Universidad Zaragoza

En Zaragoza, a 21 de Junio de 2013

Fdo. Eduardo Bolea Morales

ÍNDICE

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. INTERÉS, APLICACIÓN Y CONSECUENCIAS DEL USO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA ...	1
1.2. TÉCNICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS	2
1.2.1. Identificación y caracterización	2
1.2.2. Técnicas de separación	4
1.2.3. Técnicas de cuantificación	5
1.3. FRACCIONAMIENTO EN FLUJO A TRAVÉS DE CAMPO DE FLUJO ASIMÉTRICO ACOPLADO A UN ESPECTRÓMETRO DE MASAS DE PLASMA DE ACOPLAMIENTO INDUCTIVO (AsFIFFF-ICP-MS)	6
1.4. PUESTA EN DISOLUCIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS	9
2. OBJETIVOS	10
3. EXPERIMENTAL	11
3.1. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS	11
3.1.1. Instrumentación	11
3.1.2. Aparatos	11
3.1.3. Material	11
3.1.4. Reactivos y estándares	11
3.2. DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS	12
3.3. PUESTA EN DISOLUCIÓN DE LAS MUESTRAS	14
3.3.1. Digestión ácida	14
3.3.2. Solubilización con TMAH	14
3.4. FRACCIONAMIENTO EN FLUJO MEDIANTE CAMPO DE FLUJO ASIMÉTRICO (AsFIFFF) .	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16

4.1. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN CÉLULAS PROCEDENTES DE ENSAYOS DE NANOCITOTOXICIDAD MEDIANTE SOLUBILIZACIÓN CON TMAH Y POSTERIOR ANÁLISIS MEDIANTE AsFIFFF-ICP-MS	16
4.1.1. Estudio de las condiciones experimentales para la solubilización con TMAH del material biológico presente en los ensayos de nanocitotoxicidad	16
4.1.2. Estudio de la estabilidad de las nanopartículas de Ag en las condiciones del ensayo de solubilización con TMAH	18
4.1.3. Detección de nanopartículas de plata en células mediante AsFIFFF-ICP-MS tras solubilización con TMAH. Condiciones iniciales	24
4.1.4. Optimización de las condiciones de separación de nanopartículas de plata en AsFIFFF. Programa de flujo cruzado	26
4.1.4.1 Ensayos de optimización sobre células expuestas a nanopartículas de plata	27
4.1.4.2 Ensayos de optimización sobre células de control tras adición de nanopartículas de plata	30
4.1.5. Calibración del canal frente a estándares de tamaño	32
4.1.6. Identificación y caracterización de nanopartículas de plata en los medios solubilizados mediante AsFIFFF-ICP-MS. Análisis mediante TEM de las fracciones recogidas en el AsFIFFF	33
4.1.7. Recuperación del canal	37
4.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PLATA TOTAL EN LAS CÉLULAS MEDIANTE SOLUBILIZACIÓN CON TMAH. VALIDACIÓN DEL PROCEDIMIENTO	38
5. CONCLUSIONES	40
6. BIBLIOGRAFÍA	41
7. ANEXOS

RESUMEN:

En este trabajo se ha desarrollado una metodología analítica que ha permitido la identificación y caracterización de nanopartículas de plata en células expuestas a este agente en ensayos de citotoxicidad a través de fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AsFIFFF) acoplado a un espectrómetro de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS). Se ha trabajado con muestras biológicas de cultivos celulares tratados con nanopartículas de plata a concentraciones en las que se observaron efectos sobre la viabilidad celular. La puesta en disolución de las nanopartículas de plata en este tipo de muestras se ha llevado a cabo mediante la digestión/solubilización con hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) como alternativa a la puesta en disolución por ataque ácido. El trabajo experimental se ha centrado en el estudio de la estabilidad de las nanopartículas en este medio frente al tiempo y en la optimización de las condiciones de separación de las nanopartículas en AsFIFFF. La caracterización de las nanopartículas solubilizadas se ha realizado mediante calibración externa del sistema AsFIFFF con estándares de tamaño de nanopartículas de plata y comparando los resultados con imágenes tomadas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Los resultados obtenidos permiten confirmar la presencia de nanopartículas en las células del mismo tamaño que las inicialmente puestas en el medio. Por último se ha cuantificado de forma satisfactoria la cantidad de plata total en las células mediante el procedimiento de solubilización encontrado, validándolo frente al ataque ácido convencional. Esta metodología abre el camino a la caracterización de nanopartículas de plata en matrices biológicas complejas, lo que puede aportar información relevante para estudios de toxicidad de estas nanopartículas en entornos biológicos o medioambientales.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 INTERÉS, APLICACIÓN Y CONSECUENCIAS DEL USO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

La nanociencia y la nanotecnología han experimentado una rápida expansión en las dos últimas décadas, dando lugar al desarrollo y producción de una gran variedad de nanomateriales. Estos nanomateriales sintéticos están incorporándose a un cada vez mayor número de productos industriales, de consumo y alimentos [1]. El interés creciente por los materiales a nanoescala está convirtiendo a las nanopartículas de plata (AgNPs) en el nanomaterial más utilizado actualmente, debido a sus propiedades antimicrobianas [2,3]. Las nanopartículas de plata están siendo utilizadas en diversas aplicaciones de tratamiento de agua [4], pinturas, vendajes y diverso material sanitario, envases para el almacenamiento de comida, etc. [5]. La actividad bactericida de las nanopartículas depende del tamaño y de la forma, siendo las partículas con un tamaño menor a 100 nm las que muestran una actividad antibacteriana óptima, aumentando al disminuir el tamaño de partícula [6].

Una consecuencia del desarrollo de la nanotecnología es la liberación de nanopartículas sintéticas en el medio ambiente [7]. Las principales rutas de exposición humana serían el sistema respiratorio, el sistema gastrointestinal y la piel, los cuales son interfases entre los sistemas internos del cuerpo humano y el medio ambiente externo [8]. La plata en su forma iónica tiene efectos tóxicos para muchos patógenos, incluyendo bacterias, virus y hongos [9]. Debido a la toxicidad relativamente baja sobre los seres humanos, la plata se ha utilizado en un gran número de aplicaciones médicas [10]. Aunque también se hayan empezado a estudiar los posibles efectos tóxicos de las nanopartículas de plata, los mecanismos de toxicidad no están todavía establecidos. Los estudios realizados parecen indicar que la toxicidad puede estar relacionada tanto con las propiedades específicas de las nanopartículas, como debida a los efectos de los iones plata liberados desde las mismas [11]. Existen pruebas que demuestran que las nanopartículas de plata pueden dañar directamente las membranas de las células, interaccionando con ellas y penetrando en el interior de la célula. Los tres mecanismos más comunes de toxicidad propuestos son: (1) absorción de iones plata libres seguidos de una interrupción en la producción de ATP y en la replicación del DNA, (2) generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), y (3) daño directo de las nanopartículas de plata a las membranas celulares [12] (Figura 1).

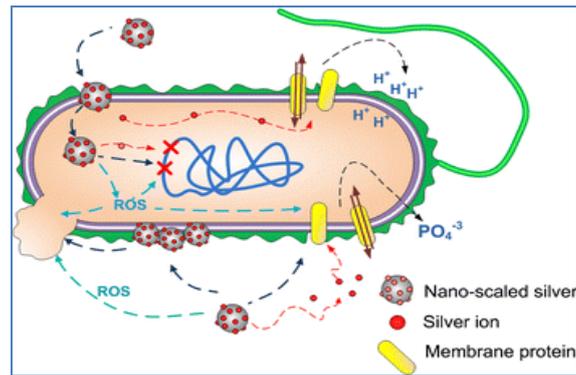


Fig 1 Diagrama resumen de la interacción de nanopartículas de plata con células bacterianas. AgNPs pueden (1) liberar iones plata y generar ROS; (2) interactuar con proteínas de la membrana afectando a su función correcta; (3) acumularse en la membrana celular afectando a la permeabilidad de la membrana; y (4) entrar en la célula donde pueden generar ROS, liberar iones plata, y afectar al DNA. Las ROS generadas también pueden afectar al DNA, a la membrana de la célula, y a las proteínas de membrana; los iones plata liberados afectarán probablemente al DNA y a las proteínas de membrana [12].

1.2 TÉCNICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

La caracterización y cuantificación de nanopartículas en matrices complejas como biológicas o medioambientales, supone un difícil reto analítico ya que las medidas son altamente dependientes de: (1) el tamaño de la partícula y su naturaleza, (2) la concentración de la muestra y las características fisicoquímicas de la disolución, y (3) los principios fundamentales de la técnica analítica [13].

1.2.1. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN

Las técnicas más comunes para la caracterización de tamaños incluyen técnicas basadas en láser, así como la espectroscopía de correlación de fotones (PCS), técnicas basadas en la microscopía, y técnicas de separación por tamaños [14].

Microscopía electrónica

Las técnicas de microscopía electrónica (EM), basadas en la aplicación de un haz de electrones, tienen una alta resolución, lo que les convierte en una opción muy frecuente en la visualización y caracterización de nanomateriales. Las técnicas más destacadas son la microscopía electrónica de transmisión (TEM) y la microscopía electrónica de barrido (SEM) [15]. Las imágenes TEM no sólo proporcionan el tamaño y la forma de las partículas, sino

también la morfología y el estado de agregación. Sin embargo, se requiere que las muestras TEM estén secas y sean de un espesor de unos cientos de nanómetros, por lo que la principal dificultad está en preparar una muestra correcta. En disoluciones, la evaporación del disolvente puede llevar a una coagulación indeseada de las partículas y cambios en las propiedades de la superficie. Para tejidos biológicos y otras muestras complejas, a menudo se necesita fijación química y un proceso de presión [16].

En SEM, el haz de electrones interacciona con la superficie de la muestra, y se detectan los electrones secundarios. Aunque las muestras SEM no necesitan ser tan delgadas como las de TEM, para evitar la acumulación de carga electrostática en la muestra durante la irradiación, la muestra, o al menos la superficie de ésta, debe ser conductora, por lo que muchas veces hay que recubrir la muestra con una capa de material conductor, con el riesgo de que se pierda parte de la información de la superficie [17]. Además, la resolución suele ser inferior a la que se alcanza por TEM, lo que puede limitar el estudio de algunos nanomateriales en función de su tamaño.

Espectroscopía de energía dispersiva de rayos-X (EDS)

La espectroscopía de energía dispersiva de rayos-X (EDS) es un método analítico de gran importancia para la determinación elemental. Normalmente, se combina con TEM o SEM para dar una distribución elemental de las nanopartículas. Para muestras complejas, es una herramienta muy útil para identificar la existencia de nanopartículas de un elemento determinado [18].

Absorción UV-Vis

Las propiedades ópticas de las nanopartículas difieren de las del metal, por lo que el UV-Vis ofrece la posibilidad de caracterizar NPs. Normalmente, la longitud de onda del máximo de absorción en un espectro de UV-Vis se asocia al tamaño promedio de partícula. Se sabe que las AgNPs tienen un pico de resonancia de plasmón de superficie localizado en la región del UV-Vis. La banda de plasmones de superficie surge de la existencia de electrones libres en la banda de conducción debido al pequeño tamaño de partícula. Esta banda de absorción se sitúa cerca de los 400 nm en el caso de las AgNPs libres. El desplazamiento de la banda depende del tamaño de la partícula y del entorno químico. Una característica única de estas partículas metálicas sintetizadas es que un cambio en la absorbancia o en la longitud de onda, da una medida del tamaño y forma de la partícula. Para AgNPs libres la disminución en la absorbancia se puede utilizar como una medida de disolución. Por su parte, un desplazamiento a longitudes

de onda mayores es indicativo de la aglomeración de partículas. Cuando la aglomeración está teniendo lugar, la absorbancia del pico de las AgNPs disminuye [19-22].

1.2.2. TÉCNICAS DE SEPARACIÓN

Las técnicas para la separación por tamaños y el análisis de su distribución incluyen el fraccionamiento en flujo mediante campos (FFF), métodos cromatográficos y métodos electroforéticos. Todos ellos se pueden usar con diferentes tipos de detectores y tienen un gran número de aplicaciones debido a su amplio rango de separación de tamaños y a una perturbación relativamente baja de la muestra [23].

Fraccionamiento en flujo mediante campos (FFF)

FFF es una técnica de separación en la que se aplica una fuerza (campo o gradiente) perpendicular a un canal en el que se desplazan las distintas especies en régimen laminar.

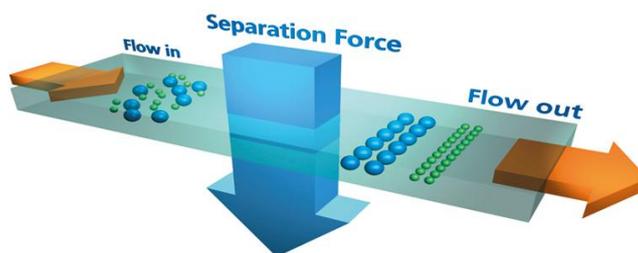


Fig 2 Representación del proceso de separación en FFF.

Cuando el flujo que transporta la muestra migra a través del canal de FFF, se aplica un campo externo perpendicular al eje del canal de fraccionamiento, lo que causa la retención de los analitos (Figura 2).

En función de la naturaleza del campo aplicado se distinguen varios tipos de subtécnicas: FFF térmico, FFF de sedimentación, FFF de flujo cruzado, FFF dielectroforético y FFF magnético [24]. Debido a su aplicabilidad en un amplio rango de tamaños (de 1 nm a 100 μm), FFF se ha empleado en la separación de diversos tipos de nanomateriales. En comparación con los métodos cromatográficos, la ausencia de fase estacionaria en FFF evita interacciones irreversibles, por lo que la morfología y el tamaño de las NPs se conservan durante las operaciones [15].

Métodos cromatográficos y electroforéticos

Dentro de los métodos cromatográficos se encuentra la cromatografía hidrodinámica (HDC) o la cromatografía de exclusión por tamaños (SEC). HDC utiliza una columna empacada con micropartículas no porosas, la separación se consigue por la velocidad de

flujo y la velocidad de gradiente a través de ellas [15]. El uso de fase estacionaria no porosa en HDC reduce considerablemente las interacciones con las partículas [17]. La cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) utiliza una columna empaquetada con materiales porosos, los cuales forman canales de flujo. Las partículas que tienen un diámetro inferior o igual al tamaño del poro de los materiales de empaquetado pueden penetrar en el interior de la columna; mientras que las partículas mayores únicamente se pueden trasladar a través de los poros mayores o ser excluidas, dando lugar a menores tiempos de retención.

La electroforesis en gel, la electroforesis de isoelectroenfoque (IEF) y la electroforesis capilar (CE) han sido ampliamente utilizadas en el fraccionamiento de NPs [15].

Otros métodos

También se han aplicado otras técnicas para la separación de AgNPs como filtración por membrana, ultrafiltración o diálisis. Debido a su bajo coste y fácil manejo, la centrifugación es ampliamente utilizada para purificar AgNPs. Por su procedimiento simple y por no requerir una adición de otros agentes de separación, la filtración por membrana o la ultrafiltración han emergido como una herramienta eficiente para la separación de AgNPs de distintos tamaños [18, 24, 26, 27, 28]. Sin embargo, durante la centrifugación o la filtración puede tener lugar una agregación no deseada o una obturación del filtro, lo que puede distorsionar los resultados [29].

1.2.3. TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN

Entre las técnicas de cuantificación la espectroscopía atómica de emisión con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES) y la espectroscopía de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) permiten detectar trazas de AgNPs de manera eficiente y rápida. La alta velocidad, precisión, sensibilidad y el amplio rango lineal les convierten en las técnicas más populares en la determinación de iones metálicos. ICP-AES o ICP-MS se pueden acoplar a diversas técnicas de separación (por ejemplo, FFF o HDC), por lo que las partículas de diferentes tamaños dentro de la muestra pueden ser aisladas, determinando la composición de cada fracción.

1.3. FRACCIONAMIENTO EN FLUJO A TRAVÉS DE CAMPO DE FLUJO ASIMÉTRICO ACOPLADO A UN ESPECTRÓMETRO DE MASAS DE PLASMA DE ACOPLAMIENTO INDUCTIVO (AsFIFFF-ICP-MS)

Tal y como se ha comentado previamente, FFF es una técnica de separación versátil en términos de rango de separación, selectividad y resolución [30], pudiéndose acoplar a un gran número de detectores [25] (Figura 3). El FFF de flujo asimétrico (AsFIFFF o AF4) es actualmente una de las técnicas más utilizada para la identificación y caracterización de nanopartículas sintéticas.

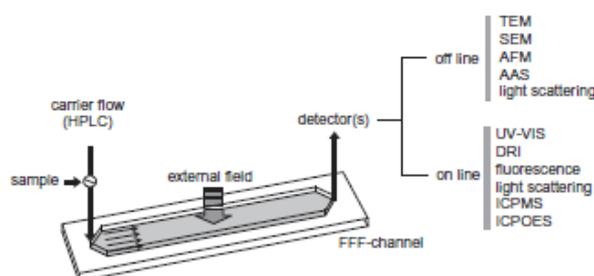


Fig 3 Esquema general de los diversos detectores on-line y off-line que se pueden acoplar a un sistema de FFF.

AsFIFFF generalmente se encuentra acoplado con un detector on-line de UV-Vis. Mientras que el UV-Vis tiene como ventaja su sencillez de operación y bajo coste, entre sus inconvenientes se encuentra una baja sensibilidad y selectividad para el análisis de nanomateriales. Es por ello que se usa el ICP-MS como detector on-line acoplado al AsFIFFF, ya que proporciona una alta sensibilidad y selectividad, un amplio rango dinámico y además cuenta con la capacidad de análisis multielemental [31].

A pesar de las ventajas que presenta el AsFIFFF en la caracterización de NPs, los tiempos de análisis son largos (20-40 min por réplica) y el trabajo es laborioso. Para conseguir las condiciones de separación adecuadas para las partículas de estudio, se han de optimizar una serie de parámetros, incluyendo la fase móvil, la membrana, el espesor del canal y el campo externo aplicado [25].

En AsFIFFF el campo externo que se aplica consiste en un flujo secundario perpendicular al flujo portador a través del canal de separación. La separación se consigue por la retención de partículas en el canal de FFF, en comparación con la velocidad promedio del flujo portador. La retención se origina por un equilibrio entre el movimiento de difusión de las partículas y la fuerza del campo generado. El campo externo lleva a las partículas hacia la

llamada pared de acumulación, desde donde difunden en sentido opuesto al campo aplicado. Los diferentes coeficientes de difusión de las partículas van a permitir llevar a cabo una separación por tamaños, de acuerdo a la ley de Stokes que relaciona el diámetro hidrodinámico con el coeficiente de difusión (Figura 4).

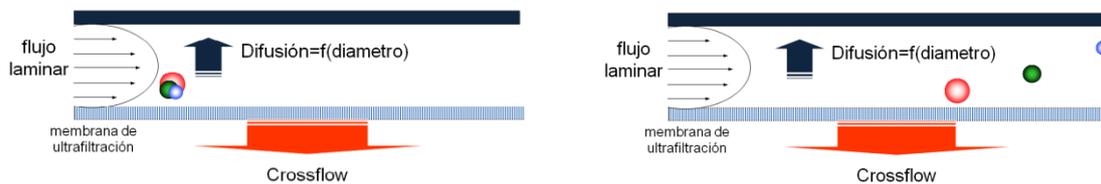


Fig 4 Efecto de la difusión sobre la separación de tamaños al aplicar un campo perpendicular al canal de AsFFFF.

En AsFFFF la pared superior del canal es impermeable y el flujo cruzado se genera por un exceso de caudal a la entrada del canal. A la inyección de la muestra le sigue un paso de focalización, donde se genera un flujo opuesto bien equilibrado desde la entrada y la salida del canal. Finalmente, tiene lugar la etapa de separación de la muestra (Figura 5).

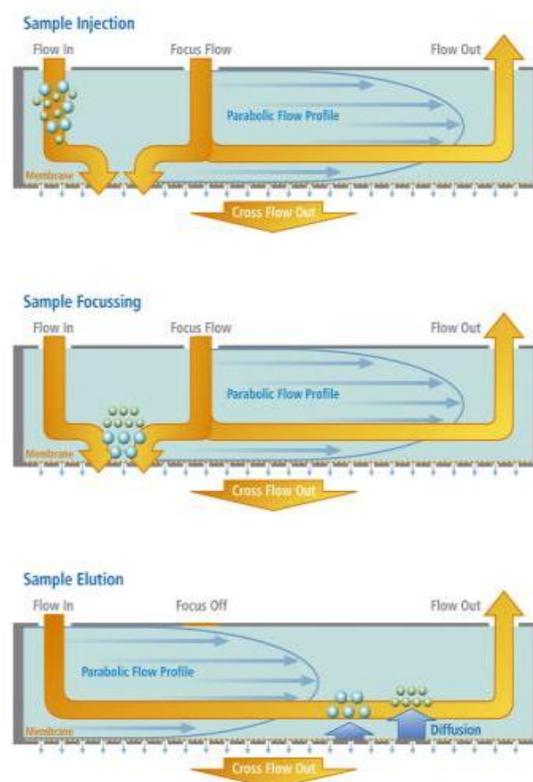


Fig 5 Etapas implicadas en la separación en FFF: inyección, focalización y elución de la muestra.

Durante la inyección, se introduce caudal por la parte superior e intermedia del canal. La muestra se introduce a un caudal bajo (por ejemplo a $0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) para asegurar que queda en la zona inferior del canal. Una vez inyectada la muestra, la focalización consiste en centrar

la muestra en una banda lo más estrecha posible. Hay que evitar efectos de sobrecarga que pueden provocar interacciones entre las propias especies y el propio canal. Estos efectos provocarían una modificación en los tiempos de retención.

El amplio rango de tamaños y la capacidad de separación del FFF se consigue a través de una optimización muy cuidadosa de las condiciones de operación. Existen varios parámetros que influyen en la calidad de la separación a través de FFF entre los que se encuentran:

- la composición del portador
- la membrana y sus propiedades superficiales
- las dimensiones del canal
- el campo externo

Las características de pH, fuerza iónica y composición química de la disolución portadora (fase móvil) influyen en las propiedades electrostáticas de la membrana y de las NPs, influyendo en el comportamiento fisicoquímico de las NPs. Generalmente, la fase móvil proporciona una carga con la misma polaridad eléctrica (ambas negativas o ambas positivas) de la partícula y la membrana, con una suficiente repulsión electrostática para prevenir la interacción y pérdida de partículas en la membrana.

La estabilidad de las suspensiones acuosas de AgNPs se puede conseguir a través de dos mecanismos diferentes: basado en repulsiones estéricas o basado en repulsiones electrostáticas. En el primer caso, se usan polímeros y surfactantes no iónicos como fase móvil ya que forman una capa adsorbida que tiene un efecto estabilizante equilibrando las fuerzas atractivas y repulsivas. En el segundo mecanismo, la carga superficial de la fase dispersa puede aumentar por la adición de un surfactante iónico que proteja a las AgNPs de adherirse unas a otras.

En AsFIFFF el papel de la membrana es permitir el paso del flujo perpendicular (flujo cruzado), evitando al mismo tiempo que las partículas y las nanopartículas se filtren a su través. El valor nominal de las membranas se dan generalmente en Dalton (g/mol) y están disponibles en un rango de 300-100000 Da. Las membranas más comunes en AsFIFFF son de celulosa regenerada (RC) o de poliétersulfona (PES).

Una de las variables más importantes que influyen sobre la retención y fraccionamiento de las partículas es el flujo cruzado. Las partículas más pequeñas exigen un mayor caudal para poder ser separadas de forma adecuada. Sin embargo, caudales elevados

conllevan tiempos de retención mayores y pérdidas selectivas de las partículas más grandes de la muestra. Una opción para muestras con un amplio rango de tamaños de partícula es aplicar gradientes, reduciendo el caudal del flujo cruzado a lo largo del tiempo.

La señal que se obtiene en el AsFIFFF se denomina fractograma. Al principio del mismo siempre aparece un pico denominado void peak. Este pico es debido a especies no focalizadas correctamente que se eluyen sin ser retenidas por acción del flujo aplicado (Figura 6).

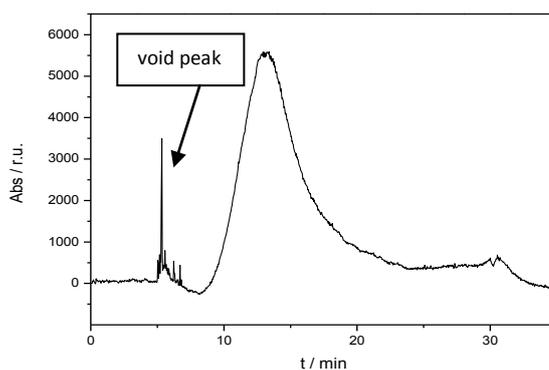


Fig 6 Fractograma de una muestra de nanopartículas de plata.

1.4. PUESTA EN DISOLUCIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

La forma habitual para la puesta en disolución de la plata pasa por la utilización de ácidos, puesto que en este medio los cationes simples son más estables. Sin embargo, el uso de esta digestión ácida no permite la distinción entre plata iónica y nanopartículas (plata en estado metálico). Como alternativa al uso de la digestión ácida se propone el uso de un medio alcalino mediante la utilización de hidróxido de tetrametilamonio (TMAH). Se sabe que el TMAH es un reactivo eficiente para solubilizar muestras de tejidos, principalmente tejidos animales. La reacción del TMAH con el tejido animal se percibe a través de la formación de espuma, la viscosidad y el olor parecido a una reacción de esterificación [32]. El objetivo es conseguir una buena liberación de las NPs desde las muestras biológicas antes de llevar a cabo la separación a través de FFF.

Se han realizado estudios para la determinación de AuNPs en tejidos de rata por AsFIFFF-ICPMS en los que se empleaba TMAH para liberar AuNPs desde hígados y tejidos homogeneizados. Se consiguió detectar y separar con éxito AuNPs intactas tras una extracción alcalina con TMAH. Sin embargo, la separación de AuNPs de 10 y 60 nm presentes en los extractos alcalinos de hígado no fue posible debido a la asociación de las NPs con restos del tejido, lo que podría haber impedido la correcta caracterización mediante AsFIFFF [33].

2. OBJETIVOS

El proyecto desarrollado en este Trabajo Fin de Máster (TFM) forma parte de una de las líneas de investigación del Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores (GEAS): “Nanotecnología y Nanociencia Medioambiental Analítica”.

Este trabajo se encuadra dentro de un proyecto en el que ha colaborado el Grupo Nutrigenomics de la Universidad Rovira i Virgili en Tarragona. Este grupo se ha encargado de realizar los distintos ensayos de citotoxicidad con nanopartículas de plata y de suministrar las distintas muestras con las que se ha trabajado a lo largo de este proyecto.

El objetivo principal del presente TFM se centra en el desarrollo de una metodología analítica que permita la identificación y caracterización de nanopartículas de plata expuestas a este agente en ensayos de toxicidad. Para ello, se han de conseguir los siguientes objetivos parciales:

1. Establecer una estrategia alternativa al ataque ácido mediante la digestión/solubilización de las muestras utilizando hidróxido de tetrametilamonio (TMAH). Validar el procedimiento comparando los resultados obtenidos con el ataque ácido para la cuantificación de plata total.
2. Estudiar la estabilidad de las AgNPs en el medio de solubilización y frente al tiempo.
3. Desarrollar un procedimiento basado en el uso de la técnica de separación AsFIFFF acoplada a UV-Vis e ICP-MS para la identificación de las especies de plata puestas en disolución.
4. Caracterizar por tamaños mediante AsFIFFF las nanopartículas solubilizadas, haciendo uso de estándares de tamaño de AgNPs. Comparación de los resultados con Microscopía de transmisión electrónica (TEM).

3. EXPERIMENTAL

3.1 INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS

3.1.1. INSTRUMENTACIÓN

- Equipo de Fraccionamiento en Flujo mediante Campo de Flujo Asimétrico (AsFIFFF). (Postnova Analytics, Landsberg, Germany).
- Espectrómetro ICP-MS Perkin Elmer SCIEX Elan DRC-e (Perkin Elmer, Toronto, Canada).
- Espectrómetro Molecular UV-Vis Diode Array (Shimadzu, Duisburg, Germany).
- Espectrómetro Molecular UV-Vis Diode-Array 8452 A (Hewlett-Packard, California, USA).
- Microscopio Electrónico de Trasmisión (TEM) INCA 200 X-Sight Oxford Instruments.
- Balanza Analítica GH-200 (AND, California, USA).
- Micropipetas 5-50 μ L (Biohit, Helsinki, Finlandia).
- Micropipetas 100-1000 μ L y 1000-4000 μ L (Rainin, California, USA).

3.1.2. APARATOS

- Agitador orbital analógico Reax 2 (Heidolph, Schwabach, Alemania).
- Baño de Ultrasonidos Ultrasons-P (Selecta, Barcelona, España).
- Placa agitadora Rotamax 120 (Heidolph, Schwabach, Alemania).

3.1.3. MATERIAL

- Tubos tipo Falcon de polipropileno de 50 mL y de 15 mL (cónico).
- Tubos Eppendorf de polipropileno de 1,5 mL.
Estos tubos se dejaron en un baño de HNO_3 al 1 % (v/v) durante al menos 24 horas. Posteriormente se lavaron con agua ultrapura y se dejaron secar en estufa a una temperatura de unos 60 °C, dejándose enfriar antes de su utilización.
- Frascos para cultivos celulares.
- Filtros de membrana de nylon con tamaño de poro de 0,20 μm .
- Filtros para jeringa de poliamida con tamaño de poro de 0,45 μm .
- Membranas de poliétersulfona (PES) con tamaño de poro de 1 y 4 kDa para el sistema de AsFIFFF.
- Cubetas de cuarzo de volumen reducido para EAM-UV-Vis.

3.1.4. REACTIVOS Y ESTÁNDARES

Se utilizó agua ultrapura (Milli-Q Advantage, Molsheim, Francia) para la preparación de disoluciones.

Las disoluciones de plata (I) se prepararon a partir de una disolución de estándar comercial ¹ (disolución estándar de Ag 1,000 ± 0,002 g·L⁻¹ AA, Panreac, Barcelona, España).

Las disoluciones de nanopartículas de plata (AgNPs) correspondientes se prepararon a partir de estándares comerciales de distintos tamaños y concentraciones:

- AgNPs 10 nm, 100 mg·L⁻¹ (PlasmaChem, Berlín, Alemania).
- AgNPs 20 nm, 7 mg·L⁻¹ (BBInternational, Cardiff, UK).
- AgNPs 40 nm, 20 mg·L⁻¹ (Sigma Aldrich, St. Louis, USA).
- AgNPs 60 nm, 20 mg·L⁻¹ (Sigma Aldrich, St. Louis, USA).

Se emplearon también disoluciones de Colargol (Laboratorios Argenol, España) preparadas a partir del polvo comercial.

Además se utilizó: HNO₃ 69,0-70,0 % (Baker Instra Analyzed for Trace Metals Analysis, J.T. Baker, Holanda); HCl 36,5-38,0% (Baker Instra Analyzed for Trace Metals Analysis, J.T. Baker, Holanda); hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) (Alfa Aesar - 25% w/w aq. soln., electronic grade, Karlsruhe, Alemania); L-cisteína (Aldrich, St. Louis, USA); Triton™ X-100 (Aldrich, St. Louis, USA); dodecil sulfato sódico (SDS) (electrophoresis purity reagent, BioRad, California, USA).

Todas las disoluciones de estándares se prepararon por pesada.

Las muestras se sonicaron durante 1 min justo antes de cada medida.

3.2. DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS

– Descripción del Colargol

El Colargol, fue proporcionado por el fabricante (Laboratorios Argenol, España) como un polvo granulado.

El Colargol es también conocido como plata coloidal. Este producto está descrito en la farmacopea europea como un fuerte antiséptico. Su contenido en plata está entre el 68-70% (m/m), en su mayor parte en forma de nanopartículas de 14-17 nm de diámetro. El resto del contenido del producto es materia orgánica procedente del proceso de la síntesis de las nanopartículas. Esta materia orgánica son proteínas, fundamentalmente caseínas, con un porcentaje de Ag (I) en esta matriz proteica inferior al 0,5%.

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

– **Descripción de las muestras de cultivos celulares**

Las muestras objeto de estudio son células pertenecientes a la línea celular de hepatoma humano HepG2.

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

El medio de cultivo empleado es el DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Medium) suplementado con suero fetal bovino (FBS), aminoácidos no esenciales, penicilina, estreptomycin, glutamina y HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico).

Los medios de cultivo fueron retirados tras 24 horas de incubación, dejando únicamente las células en los frascos, y congelándolas inmediatamente a -20°C .

En el caso en el que se adiciona la plata en forma de AgNPs, éstas proceden del Colargol. Los ensayos desarrollados con HepG2 se corresponden con:

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

Por su parte, en las células cultivadas con la plata en forma de Ag (I), ésta se adiciona como nitrato de plata (AgNO_3). Los ensayos desarrollados con HepG2 se corresponden con:

- Células incubadas + AgNO_3 $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (equivalente a una concentración de $0,32 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Ag (I)). La masa adicionada se corresponde con $3,2 \mu\text{g}$). Sin efecto sobre la viabilidad celular.
- Células incubadas + AgNO_3 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (equivalente a una concentración de $1,27 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Ag(I)). La masa adicionada se corresponde con $12,7 \mu\text{g}$). Efecto sobre la viabilidad celular del 50%.
- Células incubadas + AgNO_3 $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (equivalente a una concentración de $2,54 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Ag(I)). La masa adicionada se corresponde con $25,4 \mu\text{g}$). Efecto sobre la viabilidad celular del 90%.

Asimismo se cuenta con cultivos celulares de control, en los que no se ha añadido plata al medio en ninguna de sus formas.

3.3. PUESTA EN DISOLUCIÓN DE LAS MUESTRAS

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

3.3.1. DIGESTIÓN ÁCIDA

Se llevó a cabo un ataque ácido para la determinación del contenido total de plata presente en las distintas muestras de células.

Para ello se añaden 10 mL de una disolución de ataque compuesta por HNO_3 :HCl (7:3) en cada uno de los frascos de cultivo que contienen las células y se dejan 18 h en ligera agitación (50 rpm) en una plaza agitadora. Transcurrido este tiempo se recoge la disolución de ataque en HCl 3% hasta 50 mL. Para la cuantificación por ICP-MS se hace una dilución previa a la medida igualmente en HCl 3%.

3.3.2. SOLUBILIZACIÓN CON TMAH

Para la solubilización de las muestras con TMAH, los cultivos celulares se ponen en presencia de 4 mL de TMAH (25%w/w) y 1 mL de Triton X-100 0,25 %, de manera que la proporción de éste en el medio de solubilización sea 0,05 %. A continuación, se deja en agitación durante 4 horas para que tenga lugar el proceso de solubilización.

Transcurrido este tiempo, se toman 2 mL del medio solubilizado y se diluyen hasta los 8 mL con Triton X-100 al 0,05 %. El medio final en que se encuentran las células solubilizadas es TMAH 5 % y Triton X-100 0,05 %.

3.4. FRACCIONAMIENTO EN FLUJO MEDIANTE CAMPO DE FLUJO ASIMÉTRICO (AsFIFFF)

Se utiliza un sistema AsFIFFF AF 2000. El canal trapezoidal era de 27,5 cm de largo y entre 2 a 0,5 cm de ancho. El espaciador utilizado en todas las medidas tenía 350 μm de espesor. Se utilizaron membranas de ultrafiltración de polietersulfona (PES) de 1 y 4 kDa como pared de acumulación.

La fase móvil empleada se corresponde con una disolución de SDS 0,01 % (m/v) preparada en agua ultrapura y ajustada a pH=8. Esta fase móvil fue desgasificada antes de su uso a través de un desgasificador online de vacío. Se estudiaron distintos programas de crossflow para conseguir una correcta separación. En la Tabla 1 se resume el programa óptimo encontrado. Se usó un loop de inyección de muestra de 100 μL .

Tabla 1 Método de inyección y de crossflow utilizado para las medidas de fraccionamiento en flujo mediante campo asimétrico (AsFIFFF) con un flujo a la salida del detector de 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Programa de separación de nanopartículas de plata			
Etapa del programa	Tiempo (min)		Crossflow, V_c, $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
Inyección/focalización	5	Flujo de Inyección, 0.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	4
Separación	5	Constante	2.5
	20	Caída lineal	2.5 a 0
	5	Constante	0

El eluyente se dirige desde el canal hasta un detector UV-Vis de diodos que recoge la señal entre 200 y 650 nm; y hasta un espectrómetro ICP-MS colocado en línea. La resonancia plasmón de las AgNPs fue utilizada para su detección online a través del detector UV-Vis. Se registró un espectro completo del eluyente cada 2 s.

Para la detección elemental, se acopló el sistema AsFIFFF a un espectrómetro de masas ICP. El flujo de salida del sistema se dirigía directamente al nebulizador del espectrómetro (un nebulizador concéntrico de vidrio slurry con una cámara ciclónica de spray). La adquisición de datos por ICP-MS se realizó utilizando 20 barridos y un "dwell time" de 50 ms [23].

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN CÉLULAS PROCEDENTES DE ENSAYOS DE NAOCITOTOXICIDAD MEDIANTE SOLUBILIZACIÓN CON TMAH Y POSTERIOR ANÁLISIS MEDIANTE AsFIFFF-ICP-MS.

Uno de los principales objetivos del presente trabajo se centra en la detección y caracterización de nanopartículas de plata en células. Para poder realizar el análisis mediante AsFIFFF-ICP-MS, hay que conseguir previamente una correcta solubilización de las muestras.

Las muestras con las que aquí se trabaja son cultivos celulares tratados con plata. Más allá de llevar a cabo una digestión ácida que permita determinar el contenido de plata total, se busca realizar una solubilización de las células que permita especiar entre las distintas formas de plata presentes.

La identificación y caracterización de AgNPs en células sometidas a ensayos de citotoxicidad con nanopartículas, resulta ser una tarea complicada. Las AgNPs pueden haber sufrido distintos procesos en el interior de las células que dificulten su identificación. Por una parte, las AgNPs pueden liberar iones plata que contribuyan a los mecanismos de toxicidad. La liberación de iones desde las NPs puede depender de una gran variedad de factores, entre los que se encuentra el tamaño de las NPs [34]. Una menor liberación de Ag (I) podría estar relacionada con una alta velocidad de aglomeración de las AgNPs en el medio celular. Partículas más grandes, aglomerados, con un área de superficie reactiva menor, mostrarían una liberación de iones reducida, en comparación con partículas menores, de mayor área de superficie reactiva [35]. La aglomeración puede afectar a la capacidad de las AgNPs para interactuar con las células. Las nanopartículas se pueden asociar a la membrana celular, lo que favorece que las células puedan internalizar algunas de esas partículas [36]. El análisis TEM de la distribución de partículas de plata en dos líneas celulares (A549 y HepG2) mostró la presencia de AgNPs en el interior de este tipo de células [37].

Asimismo el proceso de solubilización también es complicado. Las nanopartículas se pueden asociar a restos sin solubilizar y no permitir una correcta separación de las mismas [33].

4.1.1. Estudio de las condiciones experimentales para la solubilización con TMAH del material biológico presente en los estudios de citotoxicidad.

En una primera aproximación para realizar la solubilización de las células, se toma como punto de partida el procedimiento óptimo obtenido durante ensayos de solubilización

de muestras de heces de ratones que habían sido alimentados con Colargol durante cierto periodo de tiempo. La optimización de este procedimiento se desarrolló durante la realización de un Trabajo Académicamente Dirigido (TAD) en el curso 2011-2012. A través de él se consiguió llevar a cabo la determinación de plata y la identificación de AgNPs en este tipo de muestras.

En este procedimiento se utilizaba el TMAH como alternativa al ataque ácido. Este reactivo es capaz de provocar la ruptura hidrolítica y la metilación de enlaces éster, amida y algunos enlaces éter, solubilizando así la materia orgánica. El TMAH es una base fuerte que va a producir la precipitación de la plata. Para tratar de evitar esto, y tener la plata presente en disolución, se utiliza un complejante. Entre todos los complejantes que se estudiaron se encontró que el que mejores resultados daba era la cisteína en una determinada proporción.

El procedimiento óptimo dejaba la muestra en contacto con 2 mL de TMAH y cisteína 0,1 % en agitación durante 24 horas. Tras la agitación se diluía hasta un volumen de 10 mL con Triton 0,05 %. El medio final en el que quedaba la muestra era TMAH 5 %, cisteína 0,1 % y triton 0,05 %.

Los experimentos preliminares se llevaron a cabo para optimizar la cantidad de TMAH y el tiempo de contacto necesario con la muestra para solubilizar las células.

En primer lugar se trató de emplear el mismo procedimiento de solubilización llevado a cabo en ensayos anteriores (agitación durante 24 h con 2 mL de TMAH y cisteína 0,1 %, para posterior dilución a 10 mL con Triton X-100 0,05 %). A la vista de que 2 mL de TMAH no eran suficientes para cubrir toda la superficie del frasco donde se encuentran las células procedentes del ensayo de citotoxicidad, se decidió emplear el doble, 4 mL, y dejarlo junto con cisteína 0,1 % en agitación durante 24 h, diluyendo hasta un volumen final de 20 mL para mantener siempre la misma proporción de TMAH en el medio final (1:5).

Los primeros ensayos se realizaron sobre cultivos de AgNO_3 y de control debido a que el número de muestras disponibles era reducido. Se utilizaron las células incubadas con AgNO_3 en una dosis de $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Asimismo, se realizó la solubilización de uno de los cultivos de control (libre de plata) al que se le adicionaron AgNPs y se dejó en agitación durante 24 h según el procedimiento descrito anteriormente. Las medidas del primer caso se realizaron a través de ICP-MS; mientras que en el segundo caso se acopló el equipo de AsFIFFF al ICP-MS para la detección de nanopartículas debidas a las AgNPs adicionadas. De estos ensayos no se obtuvieron buenos resultados. Por una parte, no se estaba solubilizando toda la cantidad de

plata presente (% Rec = 54 % respecto al ataque ácido), y por otra, no se detectaron las AgNPs, lo que sugirió cierta inestabilidad de las AgNPs frente al tiempo. En la Figura 7 se muestra el fractograma obtenido al inyectar la disolución de control a la que se había adicionado AgNPs, en la que no aparece la señal correspondiente al efecto plasmón de las mismas. Esta inestabilidad puede ser una cuestión de cinética y de tiempo de contacto con la cisteína.

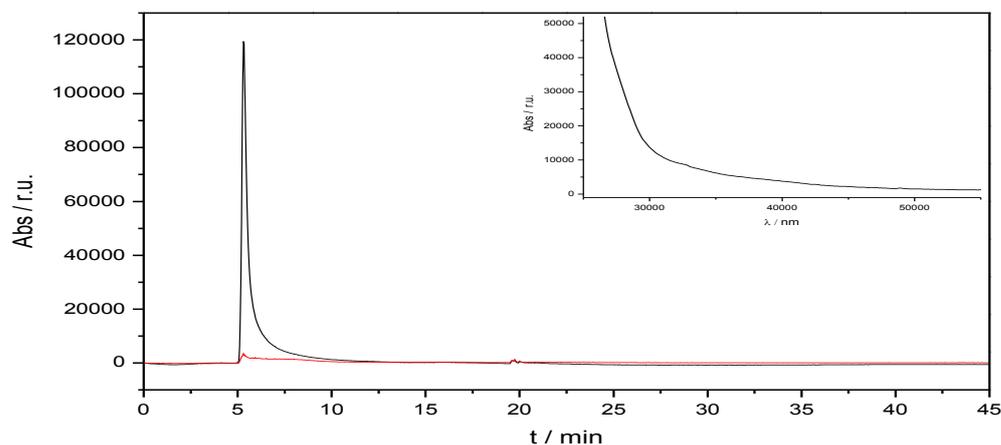


Fig 7 Fractogramas de células de control en el medio de solubilización (TMAH 5 %, cisteína 0,1%, Triton x-100 0,05%) tras 24 h de solubilización. Programa de crossflow Tabla 3. La línea negra es la señal obtenida a 254 nm, la roja se refiere a 405 nm. En la parte superior de la figura se observa el espectro UV-Vis a un tiempo de 5,3 min.

4.1.2. Estudio de la estabilidad de las nanopartículas de Ag en las condiciones del ensayo de solubilización con TMAH.

A la vista de los resultados, se realizaron ensayos para estudiar la estabilidad de las nanopartículas de Ag en las condiciones del ensayo de solubilización con TMAH. Se quería ver la influencia del medio sobre las nanopartículas de plata con el tiempo.

Los primeros ensayos se realizan en frascos de cultivo vacíos, para que el contacto de las nanopartículas con el medio sea comparable al que sufren las células cuando se lleva a cabo su solubilización. De esta forma, se dejan AgNPs (concentración final en el medio diluido: $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) en agitación con 4 mL de TMAH y cisteína 0,1 %. Se toma una pequeña fracción en el momento de poner en contacto las NPs con el medio (t_0) y otra fracción transcurridas 4 horas (t_{4h}). En ambos casos se diluye la muestra con Triton X-100 de manera que el medio final sea TMAH 5 %, cisteína 0,1 % y Triton X-100 0,05 %.

Estas fracciones se inyectan en el equipo de AsFIFFF para identificar las nanopartículas de plata. Los fractogramas que se muestran a continuación, se corresponden con la señal

obtenida a una longitud de onda de 405 nm (característica del efecto plasmón de las AgNPs) para ambos casos (Figura 8).

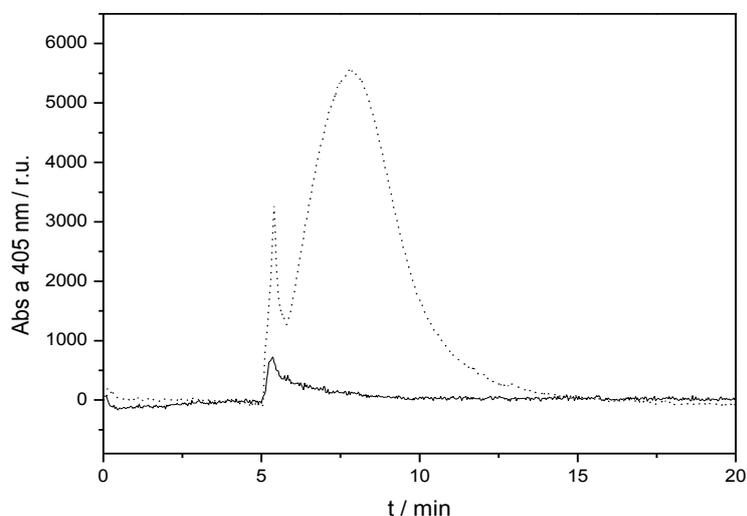


Fig 8 Fractogramas de AgNPs en el medio de solubilización (TMAH 5 %, cisteína 0,1%, Triton x-100 0,05%) a t_0 (línea de puntos) y transcurridas 4 horas (línea continua).

En la figura anterior se ve de manera clara la presencia de AgNPs en la muestra tomada a t_0 . Sin embargo, el pico que aparece en el fractograma correspondiente a la muestra en agitación durante 4 h no se aprecia lo mismo. El pico que aparece a los 5 minutos de inyección puede ser debido a especies de pequeño tamaño o no focalizadas correctamente que se eluyen sin ser retenidas en el void peak y no a la presencia de nanopartículas.

Estas observaciones llevan a pensar que los malos resultados obtenidos anteriormente, en los que no se observaba la presencia de AgNPs tras agitación durante 24 h (Fig. 7), pueden ser debidos a un exceso de tiempo de contacto de la muestra con el TMAH y a la presencia de cisteína. Se sabe que la cisteína es capaz de estabilizar la Ag (I) formando complejos con ella ($pK_f = 11,9$). Este ligando se utiliza para disminuir la concentración de Ag (I) libre en el medio y, por tanto, para liberar de la toxicidad total la contribución de la Ag (I) de la de las AgNPs [26]. Pero es posible que en este caso la cisteína esté dificultando la identificación de las nanopartículas de plata disolviéndolas.

Para comprobar esto último de manera cualitativa se hace una pequeña prueba en la que se pone en contacto las nanopartículas de plata con TMAH pero esta vez sin cisteína. Transcurridas unas horas, la disolución de AgNPs en triton sigue manteniendo intacto el color

amarillo característico de las disoluciones de AgNPs debido al efecto plasmón. Sin embargo, si se le adiciona cisteína se vuelve completamente incoloro. La cisteína está disolviendo las AgNPs de plata.

Resulta por tanto necesario encontrar un medio adecuado que permita la solubilización de las muestras, así como la identificación de las nanopartículas. Para ello se lleva a cabo un estudio de la influencia de la concentración de cisteína, así como la presencia de triton sobre las AgNPs presentes en el Colargol con el tiempo. Se pone Colargol en agitación en distintos medios y se van recogiendo distintas fracciones a lo largo del tiempo (aproximadamente cada 30 minutos durante 3 horas). Estas fracciones se recogen en tubos Eppendorf, se diluyen con Triton X-100 0,05 % y se miden a través de EAM-UV-Vis empleando cubetas de cuarzo de volumen reducido para 1 mL.

Los medios que se estudiaron fueron:

1. Colargol + 4 mL TMAH.
2. Colargol + 4 mL TMAH + cisteína 0,002 % (1 mL).
3. Colargol + 4 mL TMAH + cisteína 0,02 % (1 mL).
4. Colargol + 4 mL TMAH + cisteína 0,1 % (1 mL).
5. Colargol + 4 mL TMAH + triton 0,05 % (1 mL).

Se hizo un blanco de la señal con agua milli-Q al principio de las medidas y las correspondientes líneas base de cada medio.

1. Colargol + 4 mL TMAH

En la Figura 9 se muestran los espectros obtenidos a lo largo del tiempo al poner en agitación las AgNPs del Colargol únicamente con 4 mL de TMAH.

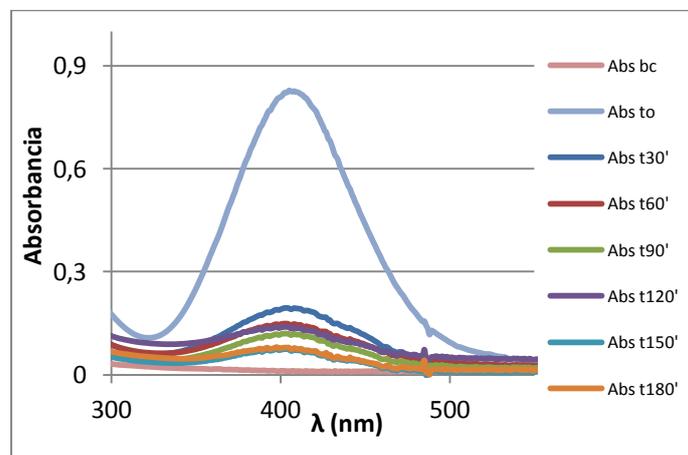
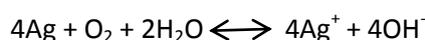


Fig 9 Espectro de absorción de Colargol ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) frente al tiempo. Ensayo en presencia de TMAH.

Se observa una diferencia de señal del 77 % pasados los 30 min respecto a la señal inicial (t_0). Si se mide después de 3 horas esta diferencia se ve incrementada hasta el 91 %.

Transcurridos 30 minutos desde el inicio del experimento se aprecia un precipitado por las paredes del tubo. La aparición de este precipitado junto con el descenso de la absorbancia, permiten deducir que la plata presente en el ensayo precipita en forma de hidróxido al haber medio básico; por lo que pasados 30 minutos desde el inicio, gran cantidad de la plata que había presente ya no está en forma de AgNPs, sino que se encuentra precipitada.

La precipitación de las AgNPs tiene lugar debido a un proceso previo de oxidación de la Ag (0) a Ag (I). Las AgNPs se pueden oxidar en disoluciones acuosas en presencia de oxígeno según la reacción:



La liberación de estos iones plata junto con la basicidad del reactivo empleado, da lugar a la precipitación de la plata que se encuentra favorecida por la formación del precipitado de AgO_2 en medio francamente básico ($\text{pKs}_{\text{Ag}_2\text{O}} = 7,7$).

2. Colargol + 4 mL TMAH + cisteína

En las figuras 1 ,2, 3 recogidas en los Anexos (A1) se muestran los espectros de UV-Vis obtenidos a lo largo del tiempo al poner en agitación las AgNPs del Colargol con 4 mL de TMAH y cisteína en distintas proporciones (0,002 %, 0,02 % y 0,1 %). En todos los casos la cisteína está en exceso respecto a la cantidad de plata presente.

Se observa que al aumentar la concentración de cisteína en el medio, parece aumentar el grado de disolución de las AgNPs con el tiempo, al favorecer este proceso.

3. Colargol + 4 mL TMAH + triton 0,05 %

En la Figura 10 se muestran los espectros obtenidos a lo largo del tiempo al poner en agitación las AgNPs del Colargol con 4 mL de TMAH y Triton X-100 0,05 %.

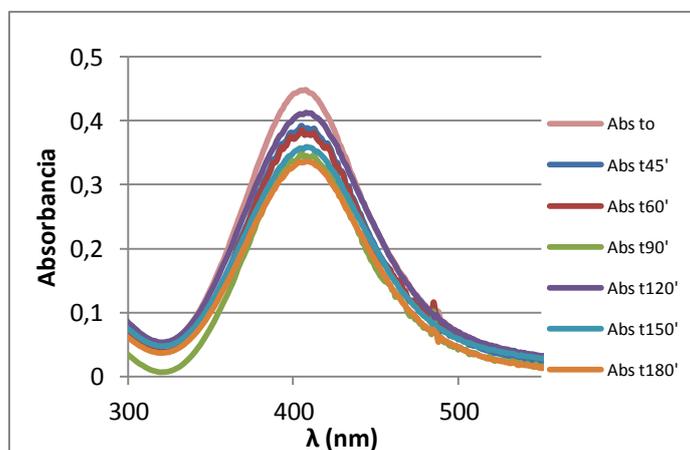


Fig 10 Espectro de absorción de Colargol ($5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) frente al tiempo. Ensayo en presencia de TMAH 5 %, Triton X-100 0,05 %.

Se observa una diferencia de señal del 26 % pasadas las 3 h respecto a la señal inicial (t_0).

En la Figura 11 se representa para todos los casos descritos anteriormente el porcentaje de la señal que se mantiene con el tiempo respecto a la señal a t_0 .

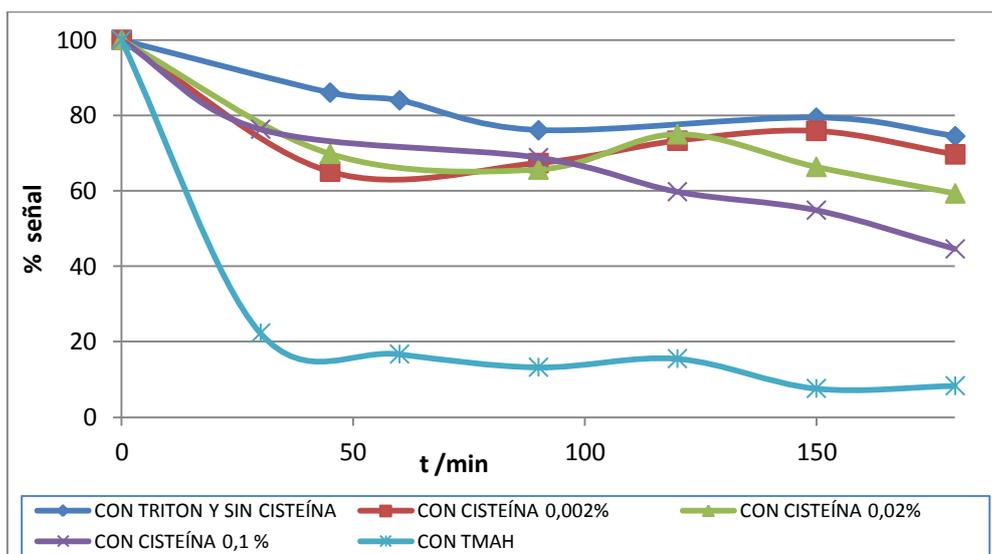


Fig 11 Variación de la señal de absorción relativa respecto a t_0 con el tiempo para los distintos medios.

A la vista de los resultados se puede concluir que la ausencia de un tensoactivo como el triton, provoca la rápida oxidación de las AgNPs en TMAH debido a la precipitación de AgO_2 . Asimismo, transcurridas 3 h de contacto entre el Colargol y el medio de cisteína correspondiente, se aprecia una menor disminución de la señal cuanto menor es la proporción de cisteína en el medio. Esto está de acuerdo con los cambios de color que se observan en el contenido de los tubos que tenían el Colargol en presencia de TMAH y cisteína. Por tanto, en presencia de tensoactivo, la adición de cisteína acelera el proceso de oxidación, tanto más cuanto mayor es la concentración de cisteína en el medio.

Para el caso del ensayo con Triton X-100 la disminución de señal no es tan acusada. Además, apenas se observa cambio de color. En estas condiciones se considera que los mejores resultados se obtienen realizando la solubilización en presencia únicamente de tensoactivo Triton X-100.

Al eliminar la cisteína como complejante, la Ag (I) que no se encuentre estabilizada por formación de complejos con especies procedentes de la muestra precipitará. Para el caso de

las AgNPs parece que el tensoactivo evita su oxidación, impidiendo su transformación a Ag (I) y su posterior precipitación en el medio básico.

Es necesario comprobar si en estas condiciones de estabilización, únicamente con Triton X-100 0,05 % en presencia de TMAH, se puede llevar a cabo la identificación de AgNPs en el equipo de AsFIFFF.

Para ello, se deja Colargol en agitación en este medio (TMAH y triton 0,05%) y se inyectan distintas fracciones diluidas con Triton X-100 a distintos tiempos (t_0 , t_{1h} y t_{4h}) (Figura 12).

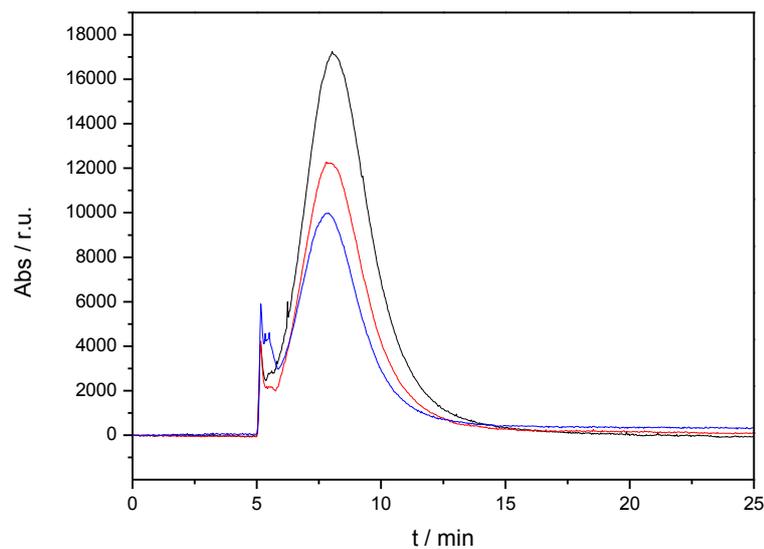


Fig 12 Fractogramas de AgNPs en el medio de solubilización (TMAH 5 %, Triton x-100 0,05%). La señal de color negro es la obtenida a t_0 . La roja y la azul se corresponden con t_{1h} y t_{4h} respectivamente.

Integrando los picos correspondientes a las AgNPs (pico con máximo a 7-8 min) se obtienen los resultados que se muestran en la Tabla 2. Se ha considerado el área a t_0 como 100 % para evaluar el efecto en términos relativos del tiempo sobre la integridad de las AgNPs.

Tabla 2 Diferencias de señal obtenidas en los ensayos llevados a cabo a t_{1h} y t_{4h} respecto a la señal a t_0 .

t	Área	% señal	% diferencia señal respecto t_0
0	61091,2515	100,0	
1 h	42425,8001	69,4	30,6
4 h	34156,5984	55,9	44,1

Atendiendo a los resultados se observa que en las condiciones de medida, un aumento en el tiempo de solubilización en presencia de TMAH y Triton conduce a una reducción en el área del pico correspondiente a las AgNPs, tal y como se había observado en el ensayo anterior con la señal de absorbancia. En este caso, y tras 4 horas, la señal se ha reducido en un 44%.

Este es el medio finalmente elegido para llevar a cabo la solubilización de las células. Realmente se trata de una solución de compromiso. Un aumento en el tiempo de solubilización conlleva una pérdida de AgNPs por disolución de las mismas. En cambio, un tiempo menor puede llevar a una solubilización incompleta del medio biológico objeto de estudio. En la bibliografía se utilizan tiempos mayores para la solubilización de muestras biológicas complejas (como tejidos) del orden de 12 o 24 h [38]. Estos tiempos son excesivamente largos para poder mantener la presencia de AgNPs en el medio, por lo que se opta por un tiempo en el que en principio se permita la completa disolución de la muestra biológica, pero asegurando que al menos un porcentaje significativo sigue estando en la forma elemental como NPs. A través de posteriores ensayos de cuantificación de la plata se confirma que 4 horas son suficientes para la solubilización completa de las células. Además, esto queda validado por comparación de resultados tras ataque ácido como se discute en el apartado 4.2.

4.1.3. Detección de nanopartículas de plata en células mediante AsFIFFF-ICP-MS tras solubilización con TMAH. Condiciones iniciales.

Una vez que se han encontrado las condiciones adecuadas para la estabilidad de las nanopartículas de plata en el medio de solubilización, se realiza un ensayo con uno de los cultivos celulares de los que se dispone.

En este caso se realiza el ensayo con las células cultivadas con una dosis de $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Colargol. Estas células son solubilizadas según el procedimiento descrito anteriormente.

Para realizar la identificación de AgNPs se acopla el AsFIFFF al ICP-MS. De esta manera, se utiliza el AsFIFFF como método de separación por tamaños, y la absorción UV-Vis y el ICP-MS como técnicas de detección. El contenido de plata de las especies eluidas es monitorizada por el ICP-MS; mientras que la señal del detector de UV-Vis da información adicional relacionada con su naturaleza: nanopartículas de plata que muestran un máximo a 405 nm. La señal que se registra a 254 nm se relaciona con materia orgánica presente en la muestra.

El programa de separación aplicado para la separación de las nanopartículas de plata se describe en la Tabla 3. Este programa permite la caracterización de AgNPs con un tamaño entre 1 y 100 nm y ha sido optimizado por nuestro grupo de investigación [23].

Tabla 3 Método de inyección y de crossflow utilizado inicialmente para las medidas de fraccionamiento en flujo mediante campo asimétrico (AsFIFFF) con un flujo a la salida del detector de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Programa de separación de nanopartículas de plata			
Etapa del programa	Tiempo, min		Crossflow, V_c , $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
Inyección/focalización	5	Flujo de Inyección, $0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$	1
Separación	20	Constante	0.325
	5	Caída lineal	0.325 a 0
	5	Constante	0

En la Figura 13 se muestran las señales de UV-Vis a 254 nm y 405 nm, junto con la señal ICP-MS de las células solubilizadas. Asimismo, se refleja el espectro UV-Vis en el tiempo del máximo de los picos observados a 405 nm.

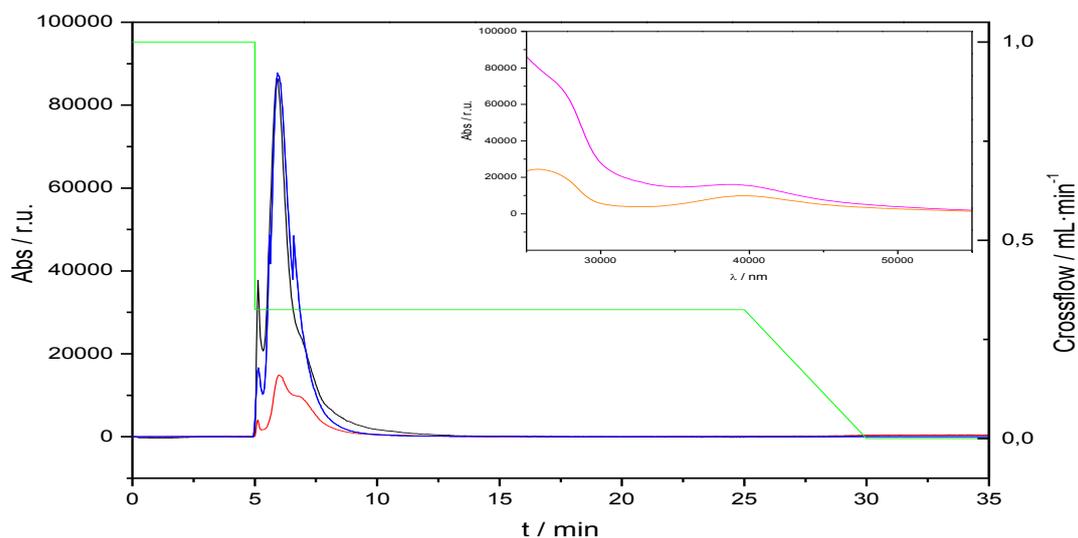


Fig 13 Fractograma células cultivadas con una dosis de $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Colargol. En azul se refleja la señal de ^{107}Ag obtenida en ICP-MS. Las señales en negro y rojo hacen referencia a las señales obtenidas en UV-Vis a 254 nm y 405 nm, respectivamente. En la parte superior de la figura, se muestra el espectro UV-Vis en el tiempo máximo de los picos observados en la señal de 405 nm. La línea rosa se refiere al máximo del pico a los 6 min y la naranja a 6,86 min. En verde se muestra el programa de flujo cruzado aplicado en el AsFIFFF.

De la señal de ICP-MS se observa la presencia de un pico de plata al principio del fractograma, sin resolver del void peak, asociado a la señal obtenida a 254 nm. Este pico puede estar relacionado con Ag (I) asociada a materia orgánica de la muestra. El espectro UV-Vis para los máximos del fractograma a 405 nm confirman la presencia de nanopartículas de plata en las células solubilizadas.

Sin embargo, la separación no es del todo correcta. Los dos picos que aparecen al principio del fractograma no están resueltos.

Se ha de optimizar un programa de flujo cruzado que permita separar estas AgNPs del resto de especies que contienen plata en el medio de solubilización.

4.1.4. Optimización de las condiciones de separación de nanopartículas de plata en AsFFFF.

Programa de flujo cruzado.

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

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

donde w es la anchura del espaciador, D_i el coeficiente de difusión de la sustancia i , V_c el caudal del flujo cruzado (crossflow), y V_{out} el caudal de salida del canal. Cuanto menor es el tamaño de una especie, mayor es su coeficiente de difusión, y por tanto menor es el tiempo de retención de la misma. Es necesario entonces adecuar el crossflow al tamaño (coeficiente de difusión) de las especies que se quiere separar. Para una sustancia dada y con w fija, el tiempo de retención depende de la relación V_c/V_{out} . Valores más altos de V_c llevan a mayores tiempos de retención, por lo que el crossflow se debe fijar para tener buenas separaciones en tiempos razonables.

Asimismo, la anchura de los picos obtenidos también se debería tener en cuenta para una separación óptima. De la teoría se deriva una ecuación simplificada para la anchura de un pico de un compuesto retenido:

$$\sigma_i = 0,82 \frac{Aw}{V_c} \left\{ \ln \left(1 + \frac{V_c}{V_{out}} \right) \right\}^2$$

donde A es el área de la pared del canal poroso. Por tanto, de la ecuación anterior se deduce que para una relación V_c/V_{out} dada, se deben aplicar valores más altos de crossflow para obtener picos lo más estrechos posible. Desde un punto de vista experimental, V_{out} está normalmente limitado por la presión dentro del canal, por lo que la relación V_c/V_{out} se debe estudiar para la configuración de cada sistema.

Un aumento en la relación V_c/V_{out} lleva a mayores tiempos de retención y mejor resolución [23].

La optimización de las condiciones de separación de AgNPs en AsFIFFF se lleva a cabo mediante diferentes ensayos. Estos ensayos se realizan en el medio de solubilización empleado, inyectando 100 μL de las muestras en el equipo de AsFIFFF y con una membrana PES 1 kDa. En este caso se utiliza como sistema de detección únicamente el detector de UV-Vis. Se realizaron ensayos sobre muestras de células y sobre nanopartículas de plata tal y como se describe a continuación.

4.1.4.1. Ensayos de optimización sobre células tratadas con Colargol

Los primeros ensayos para llevar a cabo la optimización del programa de separación se realizan sobre la muestra descrita en el apartado 4.1.3. (células cultivadas con una dosis de 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Colargol). Parte del volumen restante de esa muestra que no había sido utilizado en las medidas, se emplea para tratar de encontrar un buen programa de separación.

El objetivo es desarrollar un programa que permita separar las AgNPs de la fracción de materia orgánica presente en el medio. Esto requiere de una etapa con elevado crossflow, que permita eluir las especies de menor tamaño, seguida de otra con un crossflow menor que permita la elución de las AgNPs.

Se parte de un programa optimizado por el grupo de investigación que se ha utilizado para la identificación de especies de plata asociada a proteínas presentes en medios de cultivo. Este programa permite separar especies de bajo peso molecular (en el rango de 10-100 kDa), para a continuación eluir especies de mayor tamaño sin ninguna separación (etapa en la que se deja de aplicar crossflow). Este programa se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4 Método de inyección y de crossflow utilizado para las medidas de fraccionamiento en flujo mediante campo asimétrico (AsFIFFF) con un flujo a la salida del detector de 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Etapa del programa	Tiempo, min		Crossflow, Vc , $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
Inyección/focalización	5	Flujo de Inyección, 0.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	4
Separación	30	Constante	3
	1,5	Caída exponencial	3 a 0
	10	Constante	0

La Figura 14 muestra el fractograma obtenido al aplicar el programa de la Tabla 4.

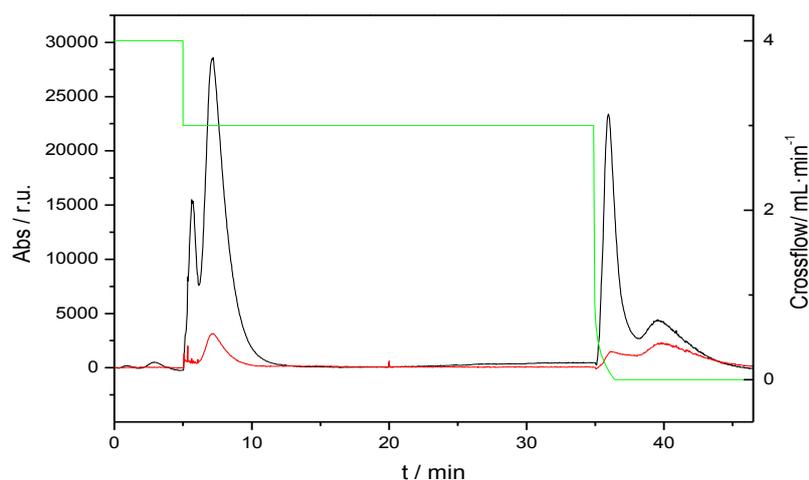


Fig 14 Fractograma correspondiente al ensayo con células cultivadas con una dosis de $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Colargol al aplicarle el programa de separación descrito en la Tabla 4. Las señales en negro hacen referencia a las señales obtenidas en UV-Vis a 254 nm, las de color rojo a las de 405 nm.

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

Para confirmar la naturaleza de estas dos poblaciones se inyectan con este mismo programa AgNPs y células de control solubilizadas siguiendo el mismo procedimiento, por separado. Los fractogramas obtenidos para esta inyección de AgNPs en el medio de solubilización se muestran en las Figuras 15 y 16.

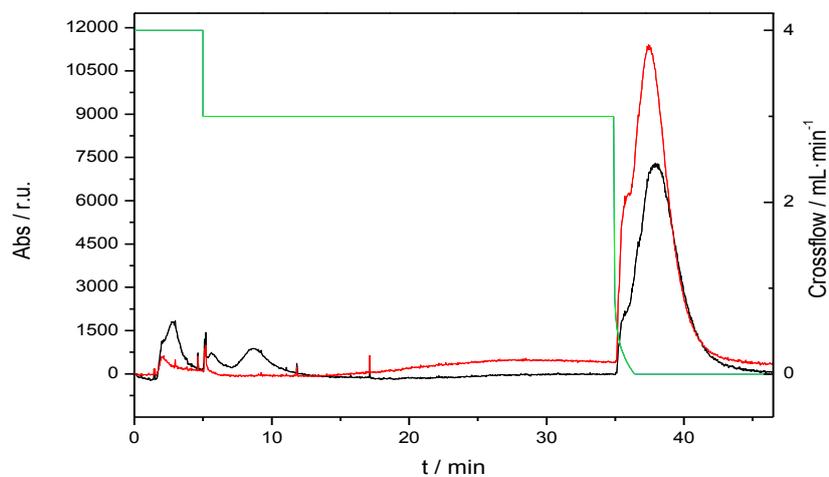


Fig 15 Fractograma correspondiente al ensayo con AgNPs en el medio de solubilización al aplicar el programa de separación descrito en la Tabla 4. Las señales en negro hacen referencia a las señales obtenidas en UV-Vis a 254 nm, las de color rojo a las de 405 nm.

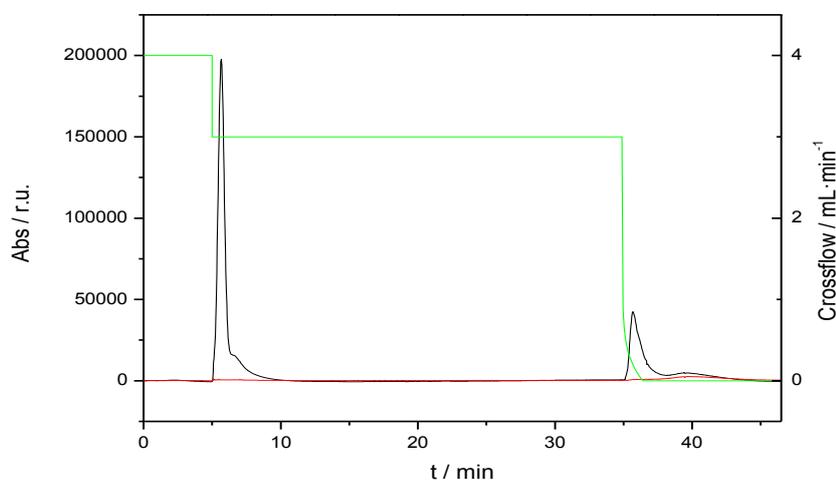


Fig 16 Fractograma correspondiente al ensayo con células de control tras someterse al proceso de solubilización al aplicar el programa de separación descrito en la Tabla 4. Las señales en negro hacen referencia a las señales obtenidas en UV-Vis a 254 nm, las de color rojo a las de 405 nm.

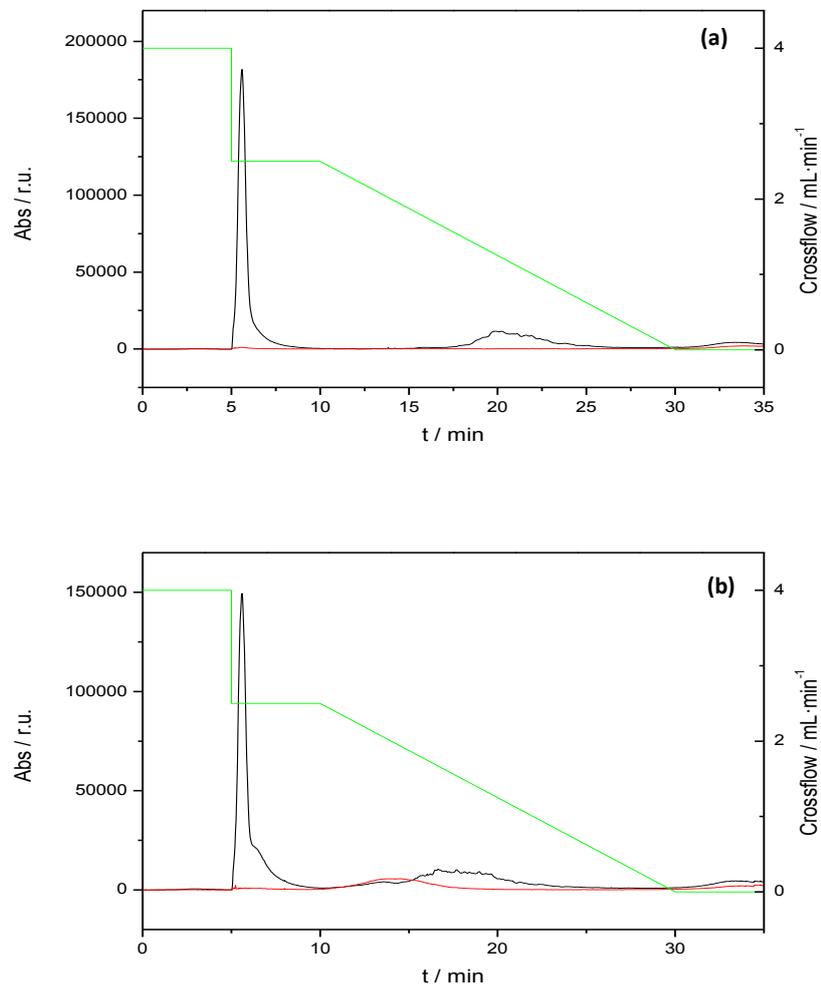
Comparando ambos fractogramas, podemos observar que el pico a 39,6 min de la Figura 14 corresponde con el pico a 38 min de AgNPs de la figura 15, lo que confirma la naturaleza metálica de dicha fracción. Por su parte, al comparar los picos a 254 nm de la Figura 14 con los que aparecen en la Figura 16 de las células de control, se ve que los picos que aparecen a 5,6 min, 35,9 min y 39,6 min en el primer caso, se corresponden con los de 5,6 min, 35,7 y 39,6 min del segundo, lo que confirma la naturaleza orgánica procedente de las células de dichos picos. El pico que aparece a 7,2 min en la Figura 14 no se observa en la Figura 16, podría estar relacionado con la presencia de nanopartículas de pequeño tamaño asociadas a material orgánico.

A pesar de que este programa permite la separación de las AgNPs de la fracción orgánica de menor tamaño, éstas se eluyen al final del fractograma, donde no es posible obtener información acerca del tamaño de las mismas al eluirse en ausencia de crossflow. El hecho además de que otras especies de gran tamaño de naturaleza orgánica, coeluyan en estos tiempos y que también pudieran llevar asociada plata, hace que se busque un programa más adecuado.

4.1.4.2. Ensayos de optimización sobre células de control

Para estos ensayos de optimización del programa de separación, se utilizaron células de control sobre las que se adicionaron AgNPs (según el procedimiento indicado en 3.3.2.).

Tras varios programas (Anexo A2) se obtuvo uno que permitía la separación de las AgNPs del resto de especies presentes en el medio solubilizado (Tabla 1). Los fractogramas que se obtienen para la muestra solubilizada de células de control, para la muestra de células de control con adición posterior de AgNPs y para AgNPs en el medio de solubilización se muestran en la Figura 17.



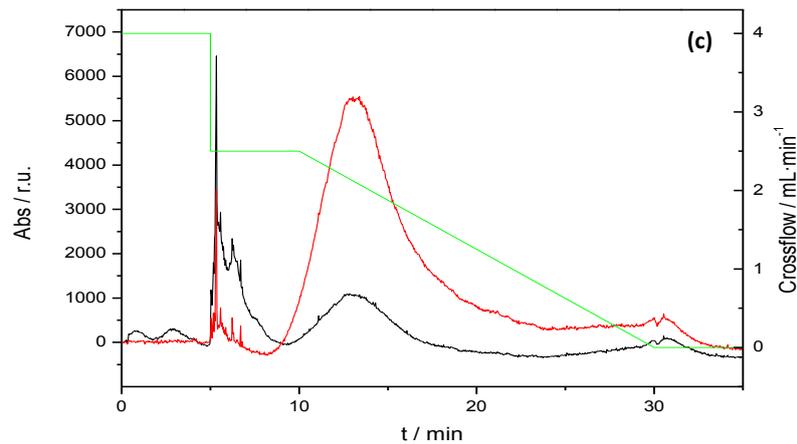


Fig 17 Fractogramas correspondientes a los ensayos de células de control solubilizadas (a), células de control solubilizadas con adición posterior de AgNPs (b) y AgNPs en el medio de solubilización (c) al aplicar el programa de separación descrito en la Tabla 7. Las señales en negro hacen referencia a las señales obtenidas en UV-Vis a 254 nm, las de color rojo a las de 405 nm. Para la separación de la muestra (C) se empleó una membrana PES 4 kDa.

De los fractogramas anteriores se observa la separación entre las AgNPs adicionadas posteriormente a la muestra de control solubilizada y el material orgánico presente en la muestra debido a la solubilización de las células. La Figura 18 muestra una ampliación de la zona baja de la Figura 17 B en la que se aprecia esto.

Con este programa se ha conseguido la separación parcial de las AgNPs debidas al Colargol y del material orgánico debido a la solubilización de las células.

El programa descrito en la Tabla 1 se toma como el más adecuado para llevar a cabo la separación de nanopartículas de plata en medios celulares solubilizados.

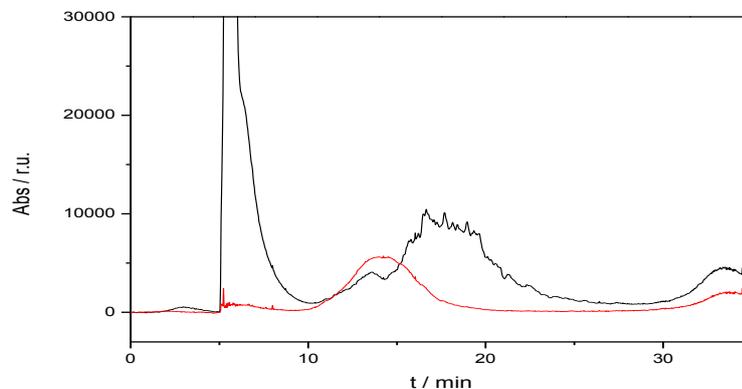


Fig 18 Fractograma ampliado correspondientes a células de control solubilizadas con adición de AgNPs (Fig. 17 B).

4.1.5. Calibración del canal frente a estándares de tamaño.

El t_r de las especies que se eluyen a través del canal de FFF se puede relacionar con su tamaño, tal y como se ha discutido en la sección 4.1.4. Las partículas más pequeñas, con mayor coeficiente de difusión, se eluyen antes que las más grandes.

Se realiza una calibración del sistema AsFIFFF frente al tamaño de distintos estándares de AgNPs. Estos estándares van desde los 20 a los 45 nm (Figura 19).

Estos estándares se disuelven en la fase móvil empleada (SDS 0,01 %, pH=8) y se inyectan en el sistema aplicando el programa de elución optimizado (Tabla 1).

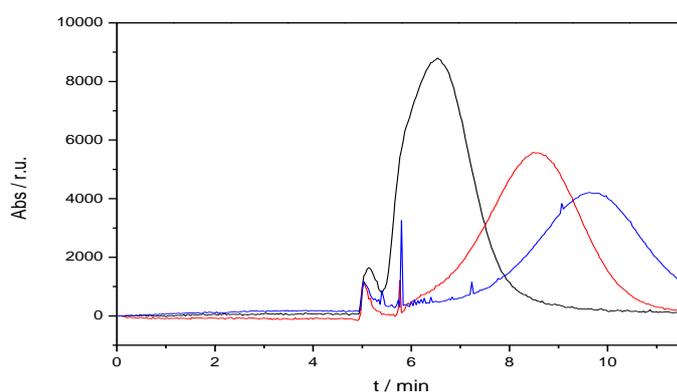


Fig 19 Fractogramas de los estándares de AgNPs utilizados para la calibración de tamaños en fase móvil. La señal negra hace referencia a AgNPs de 20 nm, la roja a AgNPs de 30 nm y la azul a AgNPs de 45 nm. Los programas se pararon antes de su finalización completa tras la aparición del máximo correspondiente a cada uno de los tamaños.

Se establece una relación lineal entre el logaritmo del factor de retención R ($R = t_0/t_r$) y el logaritmo del diámetro (d) en nanómetros de las nanopartículas [19]. La relación encontrada es: $\log R = -0,9665 \log d + 0,9341$ ($r^2 = 0,9986$).

De acuerdo a esta relación se puede establecer el tamaño de las nanopartículas eluidas a través del canal en experimentos posteriores.

4.1.6. Identificación y caracterización de nanopartículas de plata en los medios solubilizados mediante AsFIFFF-ICP-MS. Análisis mediante TEM de las fracciones recogidas en el AsFIFFF.

El programa de separación aplicado para la separación de las nanopartículas de plata es el descrito en la Tabla 1.

Las muestras estudiadas en este caso son los medios celulares tratados con una dosis de $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AgNO_3 y $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Colargol respectivamente. El medio tratado con AgNO_3 se utilizó con fines comparativos, con el fin de establecer por diferencia aquellas señales que fueran debidas a la presencia de AgNPs.

La Figura 20 muestra las señales de UV-Vis a 254 nm y 405 nm correspondientes a las células solubilizadas, que habían sido previamente tratadas con Colargol y con AgNO_3 .

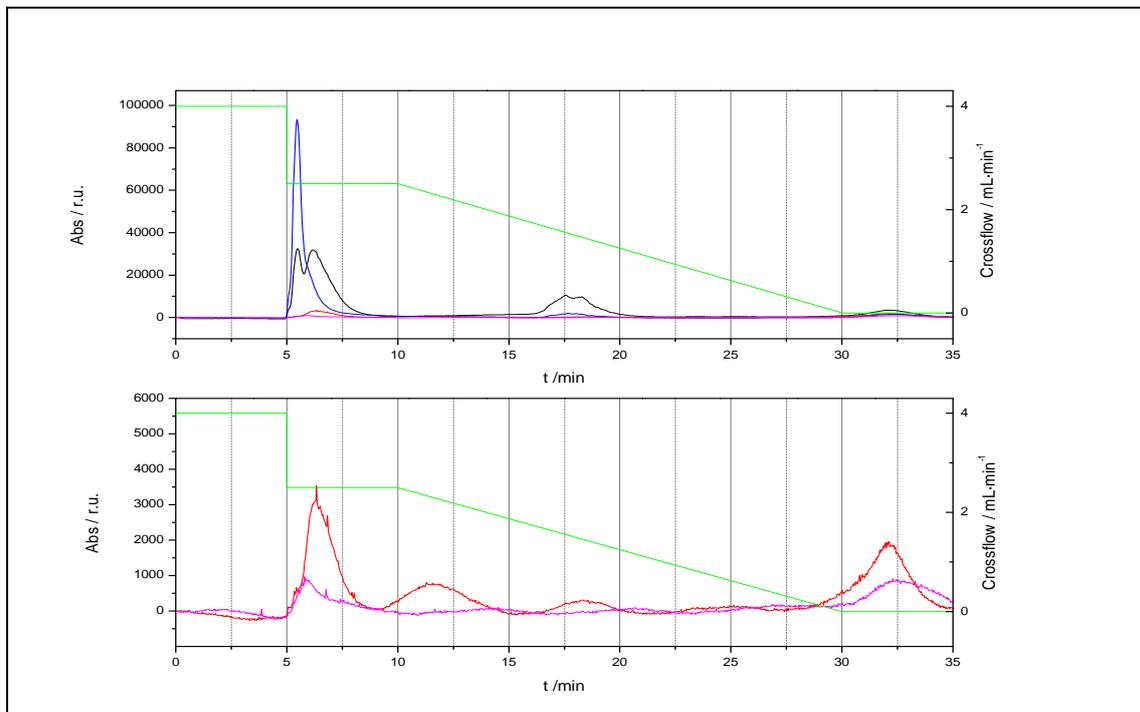


Fig 20 Fractogramas correspondientes a las muestras de Ag (I) y AgNPs solubilizadas. Las señales azul y rosa se refieren a las señales obtenidas a 254 nm y 405 nm respectivamente para las muestras de células tratadas con AgNO_3 . Las señales negra y roja son las de las células tratadas con Colargol a esas mismas longitudes de onda.

A continuación se comparan las señales de ambas muestras (Figura 21 y Figura 22).

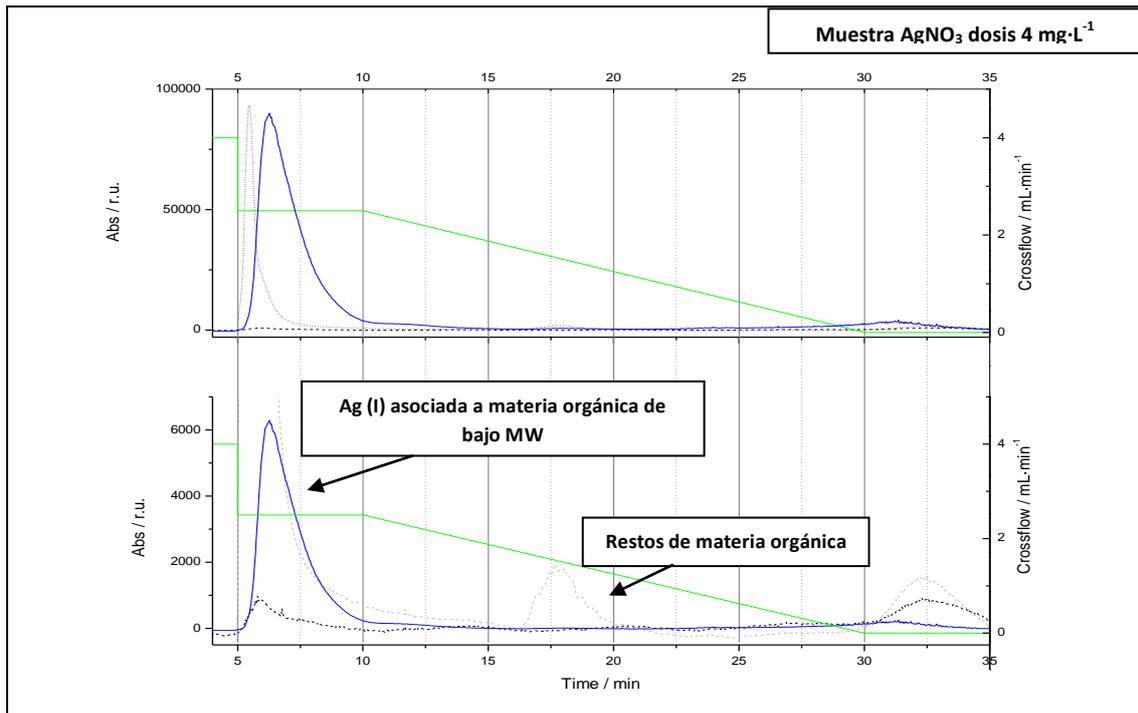


Fig 21 Fractogramas correspondientes a la muestra de células tratada con AgNO_3 . Las señales discontinuas se corresponden a las señales de UV-Vis; siendo la de color negro la señal a 405 nm y la gris la de 254 nm. La señal que aparece en azul es la señal de ^{107}Ag medida en ICP-MS. En verde se representa el programa de flujo cruzado aplicado en el AsFFFF para la separación.

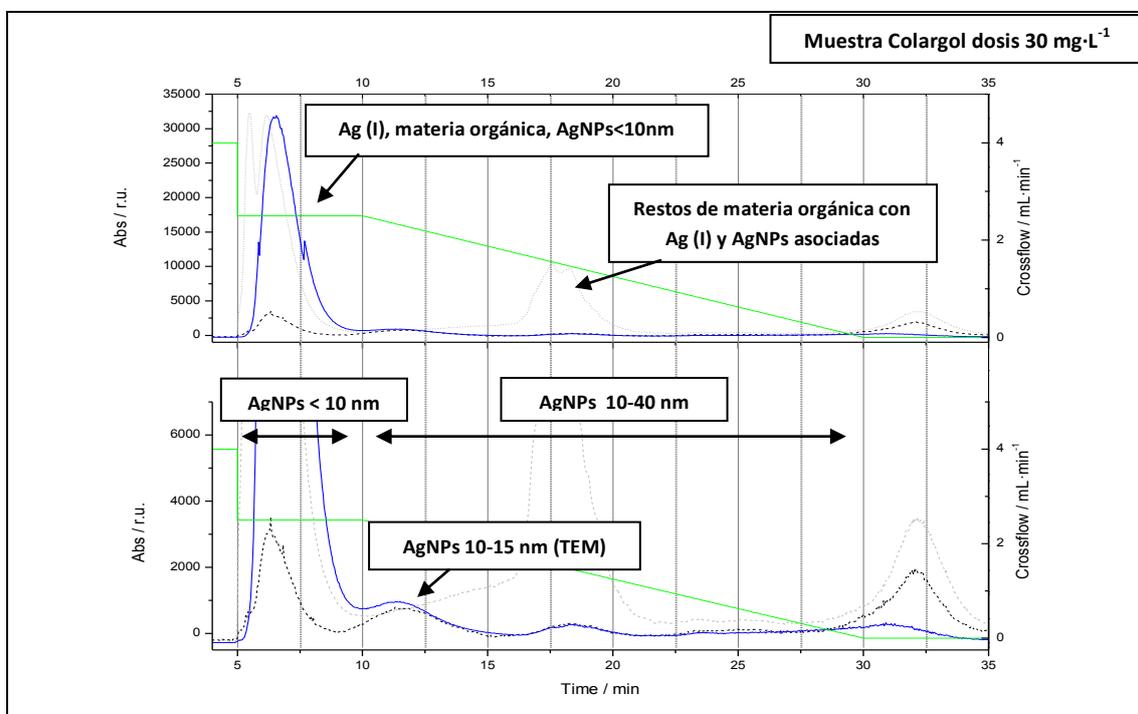


Fig 22 Fractogramas correspondientes a la muestra de células tratada con Colargol. Las señales discontinuas se corresponden a las señales de UV-Vis; siendo la de color negro la señal a 405 nm y la gris la de 254 nm. La señal que

aparece en azul es la señal de ^{107}Ag medida en ICP-MS. En verde se representa el programa de flujo cruzado aplicado en el AsFFFF para la separación. En la figura se muestra también la relación de tamaños de las AgNPs encontrada por calibración de nanopartículas.

En la Figura 21 las señales de plata que se observan en ICP-MS corresponden a plata asociada a fracciones de bajo peso molecular de material orgánico sin solubilizar.

Cuando se aplica un crossflow constante de $2,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ durante 5 min, se eluyen las macromoléculas pequeñas. En el siguiente paso de caída lineal de crossflow desde los $2,5$ a $0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ durante 20 min se permite la elución de macromoléculas mayores (o en su caso AgNPs) a diferentes tiempos. Finalmente, se introduce una etapa sin crossflow para asegurar que todas las especies inyectan son eluidas.

En la Figura 22 la señal de ^{107}Ag muestra un gran pico a los 7 min, y dos más pequeños a 11 y 17 min. También se eluye una pequeña cantidad de plata al final del programa, cuando no se aplica crossflow.

La calibración del canal frente a estándares de tamaño de AgNPs muestran que las especies eluidas antes de los 10 min son menores de 10 nm, mientras que las que se eluyen entre 10 y 30 min están en un rango de 10-40 nm. Especies mayores de este tamaño se eluirían a tiempos mayores.

A la vista de los fractogramas de UV-Vis obtenidos en ambos casos (Figura 20), se deduce que la presencia de algunas fracciones en la muestra del cultivo celular tratado con Colargol están relacionadas con la presencia de nanopartículas. Estas fracciones se pueden dividir en tres:

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

Para la confirmación de la presencia o no de nanopartículas de plata, se tomaron también distintas fracciones de las muestras a esos tiempos de elución para una posterior observación de las muestras por TEM (Figura 23). La muestra original sin separación también se observó a través de TEM (Figura 23 a).

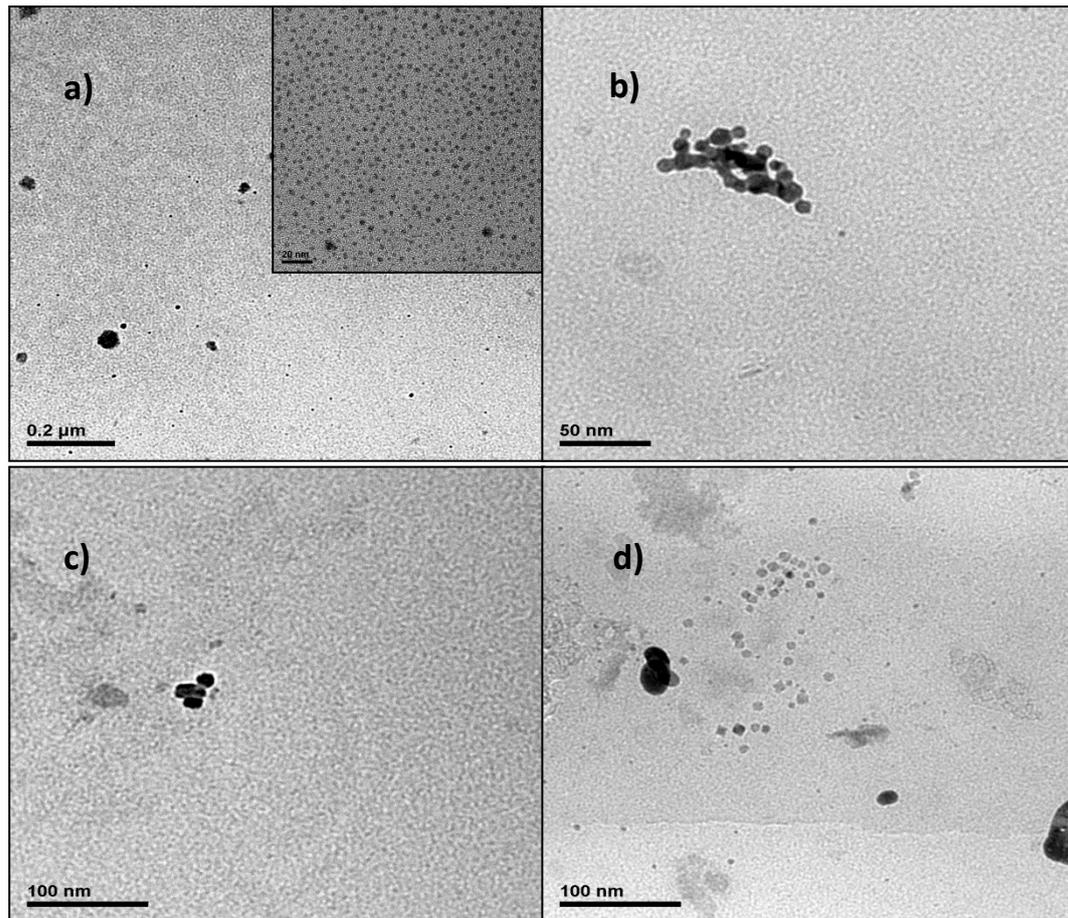


Fig 23 Imágenes TEM de la muestra de células tratadas con Colargol: a) muestra solubilizada sin separación 15000X Y 100000X (cuadrado pequeño). Fracciones de muestra recogidas del sistema AsFIFFF a b) 7 min 60000X; c) 11 min 40000X y d) 17 min 40000X.

Estas imágenes muestran nanopartículas con un rango de tamaños relativamente amplio, desde diámetros de 35-40 nm hasta numerosas nanopartículas de 3-4 nm, vistas a una mayor resolución (cuadrado pequeño Fig. 23 a, correspondiente a la muestra original, sin inyectar en el canal). Estas pequeñas nanopartículas se deberían eluir a tiempos menores de 10 min. Sin embargo, las imágenes correspondientes a la fracción recogida a los 7 min muestran la presencia de AgNPs en un rango de tamaños de 5-10 nm (Fig. 23 b), pero no menores. La gran dilución dentro del canal (la masa inyectada en 100 μ L es eluída en 30 mL) y la baja resolución de tamaño del TEM utilizado, cercana a 2-3 nm, puede justificar la ausencia de estas pequeñas nanopartículas en las imágenes obtenidas. Es posible que el pico a 7 min corresponda a AgNPs de 3-4 nm sin resolver de la Ag (I) asociada a macromoléculas no solubilizadas en la disolución restante.

Las imágenes de la fracción recogida a 11 min únicamente revelan unas pocas nanopartículas de alrededor de 15 nm de tamaño. A pesar de la poca cantidad de nanopartículas observadas, estos resultados están de acuerdo con la información obtenida por los fractogramas dada la

alta absorbancia a 405 nm asociada a este pico. En el pico correspondiente a un tiempo de 11 min, se aprecia en la muestra tratada con Colargol el típico efecto plasmón de las nanopartículas de plata a 400 nm. Este efecto no se observa en la muestra tratada con AgNO_3 al mismo tiempo de elución (Figura 24).

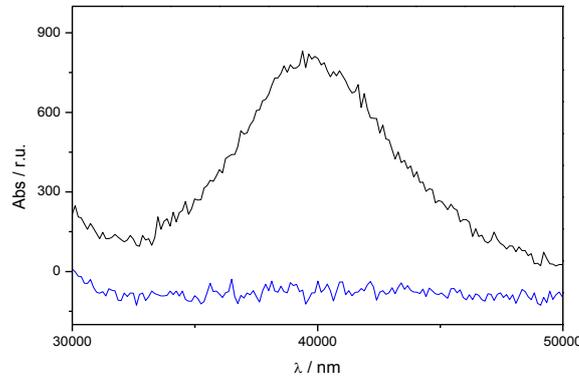


Fig 24 Espectro UV-Vis para un tiempo de 11 min. La señal de color negro corresponde a la muestra tratada con Colargol; la señal azul se refiere a la muestra tratada con AgNO_3 .

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

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

4.1.7. Recuperación del canal.

Un parámetro importante que hay que controlar cuando se lleva a cabo una separación a través de FFF es la recuperación del analito. Para caracterizar y cuantificar de manera adecuada las AgNPs, es necesario minimizar las posibles interacciones entre las AgNPs y los componentes del canal. Si estas interacciones se corresponden con procesos irreversibles, conllevan a la pérdida de nanopartículas introducidas en el canal [23].

Los cálculos de recuperación se hicieron con tres inyecciones de la muestra y de un patrón respectivamente, sin aplicar ningún crossflow en el canal AsFFFF (tampoco se aplica

ninguna etapa de inyección). Después, se integraron las áreas de los picos y se realizó una estimación de la recuperación de plata en el canal según:

$$\% \text{ Recuperación Ag} = \frac{\text{Área de la señal del factograma (AsFIFFF)}}{\text{Área de la señal sin canal (FIA)}} \cdot 100$$

La recuperación de plata en el canal se calcula para una muestra de AgNPs de 500 ppb y para las muestras de células solubilizadas que habían sido cultivadas con Colargol y AgNO₃ (Tabla 5).

Tabla 5 Recuperación de plata en el canal.

Muestra	% Recuperación Ag
AgNPs 500 ppb	75,2 ± 9,2
Células + Colargol 30 mg·L ⁻¹	71,1 ± 6,0
Células + AgNO ₃ 4 mg·L ⁻¹	93,8 ± 10,8

Hay que indicar que estos valores están en consonancia con los obtenidos con los patrones de AgNPs comerciales. Estos valores de recuperación indican que un pequeño porcentaje de la muestra es adsorbido de forma irreversible en el interior del canal, sobre la membrana de permeación, siendo este efecto más acusado para la Ag en forma de AgNPs que asociada a formas de materia orgánica, como se ha comprobado en estudios anteriores. El mayor valor de recuperación en el caso de la muestra cultivada con AgNO₃ puede ser debido a este hecho, o bien a que ésta fue la última en ser inyectada, por lo que podría arrastrar parte de la plata no eluída en las muestras anteriores.

4.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PLATA TOTAL EN LAS CÉLULAS MEDIANTE SOLUBILIZACIÓN CON TMAH. VALIDACIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Tras realizar la solubilización de las muestras con TMAH se hace la cuantificación de plata presente en las mismas a través de ICP-MS.

Para la cuantificación de plata se inyectan en el AsFIFFF las muestras y un patrón de Ag (I) directamente en el canal, es decir, sin aplicar ningún tipo de crossflow. Integrando las áreas

de los picos correspondientes al patrón (de concentración conocida) y a la muestra se puede cuantificar la cantidad de plata presente en los cultivos celulares solubilizados (Tabla 6).

Tabla 6 Cantidades de plata encontradas tras realizar la solubilización con TMAH.

Muestra	Concentración de plata, μg
Células + Colargol $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$77,2 \pm 9,9$
Células + AgNO_3 dosis $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$7,4 \pm 1,1$

Las cantidades de Ag obtenidas por ataque ácido en estos mismos cultivos se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7 Cantidades de plata encontradas en las muestras tras ataque ácido.

Muestra	Concentración de plata, μg
Células + Colargol $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	75 ± 1
Células + AgNO_3 $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$6,76 \pm 0,04$

Aplicando un test t con un nivel de confianza del 95 % se puede afirmar que el procedimiento de solubilización con TMAH da similares resultados a los obtenidos mediante un ataque ácido de los medios celulares. No se encuentran diferencias significativas entre ambos métodos.

Esto confirma que el procedimiento de solubilización con TMAH permite la puesta en disolución de la plata presente en las muestras de células de forma completa y sin pérdidas significativas por procesos de precipitación.

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

5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones del presente trabajo pueden resumirse en los siguientes puntos:

1. Se ha desarrollado una metodología de puesta en disolución de plata para medios celulares que permite su cuantificación, además de la identificación de la presencia de nanopartículas mediante el empleo de un agente de solubilización como es el TMAH.
2. Esta metodología se ha aplicado a la cuantificación de plata en muestras reales procedentes de medios celulares cultivados con distintas formas de plata (como plata iónica y nanopartículas), validándose mediante la comparación de los resultados obtenidos con aquellos procedentes de la aplicación de un ataque ácido.
3. Se ha desarrollado una estrategia global de caracterización de nanopartículas de plata en medios celulares por AsFIFFF como técnica de separación y UV-Vis e ICP-MS como técnicas de detección. La caracterización de nanopartículas se ha confirmado con imágenes TEM.
4. Con los resultados obtenidos, se puede afirmar que al adicionar la plata sobre cultivos celulares en forma de AgNPs, éstas o bien se quedan adheridas sobre las paredes celulares o la atraviesan como NP, y una vez dentro liberarían Ag (I).

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

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Woodrow Wilson International Center for Scholars. Nanotechnology consumer product inventory. Available at <http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/>. Project of Emerging Nanotechnologies, Washington, DC.
2. Hansen S.F., Michelson E.S., Kamper A., Borling P., Stuer-Lauridsen F., Baun A. Categorization framework to aid exposure assessment of nanomaterials in consumer products. *Ecotoxicology* (2008), 17:438-447.
3. Kim J.S., Kuk E., Yu K.N., Kim J.H., Park S.J., Lee H.J. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* (2007), 3:95-101.
4. Shrivastava S., Bera T., Roy A., Singh G., Ramachandrarao P., Dash D. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles (2007) *Nanotechnology* 18:225103.
5. Benn T., Westerhoff P. Titanium Nanomaterial Removal and Release from Wastewater Treatment Plants. *Environmental Science & Technology* (2008), 42:4133–4139.
6. Andreescu S., Njagi J., Ispas C., Ravalli M.T. Applications of Advanced nanomaterials for environmental monitoring. *Journal of Environmental Monitoring* (2009), 11:27–40.
7. Howard A.G. On the challenge of quantifying man-made nanoparticles in the aquatic environment. *Journal of Environmental Monitoring* (2010), 12:135-142.
8. Chen X., Schluesener H. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicology Letters* (2008), 176:1-12.
9. Lok C.N., Ho C.M., Chen R., He Q.Y., Yu W.Y., Sun H. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* (2007), 12:527-534.
10. Chen X., Schluesener H.J. Nanosilver: A nanoparticle in medical application. *Toxicology Letters* (2008), 176:1-12.
11. Wijnhoven S. W. P., Peijnenburg Willie J. G. M., Herberts Carla A. Nano-silver - a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology* (2009), 3, 109–138.
12. Marambio-Jones C., Hoek Eric M. V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research* (2010), 12:1531-1551.
13. Domingos R.F., Baalousha M.A., Ju-Nam Y., Reid M.M., Tufenkji N., Lead J.R., Leppard G.G., Wilkinson K.J. Characterizing Manufactured Nanoparticles in the Environment: Multimethod Determination of Particle Sizes. *Environmental Science & Technology* (2009), 43:7277-7284.

14. Contado C., Pagnoni A. TiO₂ in commercial sunscreen lotion: Flow field-flow fractionation and ICP-AES together for size analysis. *Analytical Chemistry* (2008), 80:7594-7608.
15. Jing-fu L., Su-juan Y., Yong-guang Y., Jing-bo C. Methods for separation, identification, characterization and quantification of silver nanoparticles. *Trends in Analytical Chemistry* (2012), 33:95-106.
16. Dudkiewicz A., Tiede K., Loeschner, Jensen L.H.S., Jensen E., Wierzbicki R., Boxall A.B.A., Molhave K. Characterization of nanomaterials in food by electron microscopy. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* (2011), 30:28-43.
17. Tiede K., Boxall A.B.A., Tear S.P., Lewis J., David H., Hasselov M. Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. *Food additives and Contaminants part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* (2008), 25:795-821.
18. Benn T.M., Weterhoff P. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environmental Science & Technology* (2008), 42:7025-7026.
19. Burda C., Chen X.B., Narayanan R., El-Sayed M.A. Chemistry and properties of nanocrystal of different shapes. *Chemical Reviews* (2005), 105:1025-1102.
20. Tessier P.M., Velev O.D., Kalambur A.T., Rabolt J.F., Lenhoff A.M., Kaler E.W. Assembly of gold nanostructured films templated by colloidal crystals and use in surface-enhanced Raman spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* (2000), 122:9554-9555.
21. Mulvaney P. *Langmuir* (1996), 12:788-800.
22. Zook J.M., Long S.E., Cleveland D., Geronimo C.L.A., MacCuspie R.I. Measuring silver nanoparticle dissolution in complex biological and environmental matrices using UV-visible absorbance. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2011), 401:1993-2002.
23. Bolea E., Jimenez-Lamana J., Laborda F. Size characterization and quantification of silver nanoparticles by asymmetric flow field-flow fractionation coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2011), 401:2723-2732.
24. Jingyu L., Robert H.H. Ion Release Kinetics and Particle Persistence in Aqueous Nano-Silver Colloids. *Environmental Science & Technology* (2010), 44:2169-2175.
25. von der Kammer F., Legros S., Larsen E.H., Loeschner K., Hofmann T. Separation and characterization of nanoparticles in complex food and environmental samples by field-flow fractionation. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* (2011), 30:425-436.

26. Navarro E., Piccapietra F., Wagner B., Marconi F., Kaegi R., Odzak N., Sigg L., Behra R. Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology* (2008), 42:8959-8964.
27. Jin X., Li M.H., Wang J.W., Marambio-Jones C., Peng F.B., Huang X.F., Damoiseaux R., Hoek E.M.V. High-Throughput Screening of Silver Nanoparticle Stability and Bacterial Inactivation in Aquatic Media: Influence of Specific Ions. *Environmental Science & Technology* (2010), 44:7321-7328.
28. El Badawy, A.M., Silva R.G., Morris B., Scheckel K.G., Susain M.T., Tolaymat T.M. Surface Charge-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles. *Environmental Science & Technology* (2011), 45:283-287.
29. Trefry J.C., Monahan J.L., Weaver K.M., Meyerhoefer A.J., Markopolous M.M., Arnold Z.S., Wooley D.P., Pavel I.E. Size Selection and Concentration of Silver Nanoparticles by Tangential Flow Ultrafiltration for SERS-Based Biosensors. *Journal of the American Chemical* (2010), 132:10970-10972.
30. Dubascoux S., Le Hecho I., Gautier M.P., Lespes G. On-line and off-line quantification of trace elements associated to colloids by AsFIFFF and ICP-MS. *Talanta* (2008), 77:60-65.
31. Stolpe B., Hasselov M., Andersson K., Turner D.R. High resolution ICP-MS as an on-line detector for field-flow fraction; multi-element determination of colloidal size distributions in a natural water sample. *Analytica Chimica Acta* (2005), 535:109-121.
32. Martins P., Pozebon D., Dressler V.L. Determination of trace elements in biological materials using tetramethylammonium hydroxide for sample preparation. *Analytica Chimica Acta* (2002), 470:195-204.
33. Schmidt B., Loeschner K., Hadrup N., Mortensen A., Sloth J.J., Koch C.B., Laesen E.H. Quantitative Characterization of Gold Nanoparticles by Field-Flow Fraction Coupled Online with Light Scattering Detection and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* (2011), 83:2461-2468.
34. Kittler S., Greulich C., Diendorf J., Koller M., Epple M. Toxicity of Silver Nanoparticles Increases during Storage Because of Slow Dissolution under Release of Silver Ions. *Chemistry of Materials* (2010), 22:4548-4554.
35. Grosse S., Evje L., Syversen T. Silver nanoparticle-induced cytotoxicity in rat brain endothelial cell culture. *Toxicology in vitro* (2012), 27:305-313.
36. Hussain S.M., Hess K.L., Gearhart J.M., Geiss K.T., Schlager J.J. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in vitro* (2005), 19:975-983.

37. Lankoff A., Sandberg W.J., Wegierek-Ciuk A., Lisowska H., Refsnes M., Sartowska B., Schwarze P.E., Meczynska-Wielgosz S., Wojewodzka M., Kruszewski M. The effect of agglomeration state of silver and titanium dioxide nanoparticles on cellular response of HepG2, A549 and THP-1 cells. *Toxicology Letters* (2012), 208:197-213.
38. Nóbrega J.A., Santos M.C., de Sousa R.A., Cadore S., Barnes R.M., Tatro M. Sample preparation in alkaline media. *Spectrochimica Acta* (2006), 61:465-495.

7. ANEXOS

A1. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS DE Ag EN LAS CONDICIONES DEL ENSAYO DE SOLUBILIZACIÓN CON TMAH Y CISTEÍNA

En las figuras 1, 2, 3 se muestran los espectros de UV-Vis obtenidos a lo largo del tiempo al poner en contacto las AgNPs del Colargol con 4 mL de TMAH y cisteína en distintas proporciones (0,002 %, 0,02 % y 0,1 %).

1. Colargol + 4 mL TMAH + cisteína 0,002 %

En este ensayo se deja Colargol en agitación en presencia de 4 mL de TMAH y cisteína 0,002 %. En los ensayos anteriores en los que se empleaba cisteína 0,1 %, la cisteína estaba en gran exceso respecto a la cantidad de plata (relación molar Ag:cisteína 1:88). En este caso la relación molar entre Ag y cisteína es 1:3,5.

En la Figura 1 se muestra el espectro obtenido a través de EAM-UV-Vis.

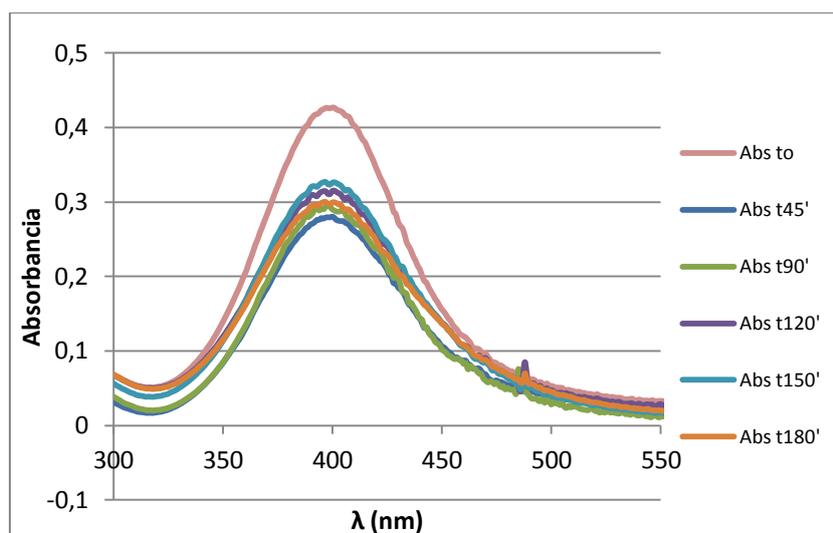


Fig 1 Espectro de absorción de Colargol (5 mg·L⁻¹) frente al tiempo. Ensayo en presencia de TMAH 5 %, cisteína 0,002 %.

2. Colargol + 4 mL TMAH + cisteína 0,02 %

En este ensayo se deja Colargol en agitación en presencia de 4 mL de TMAH y cisteína 0,02 %. La relación molar entre plata y cisteína es 1:35.

El espectro completo se puede ver en la Figura 2

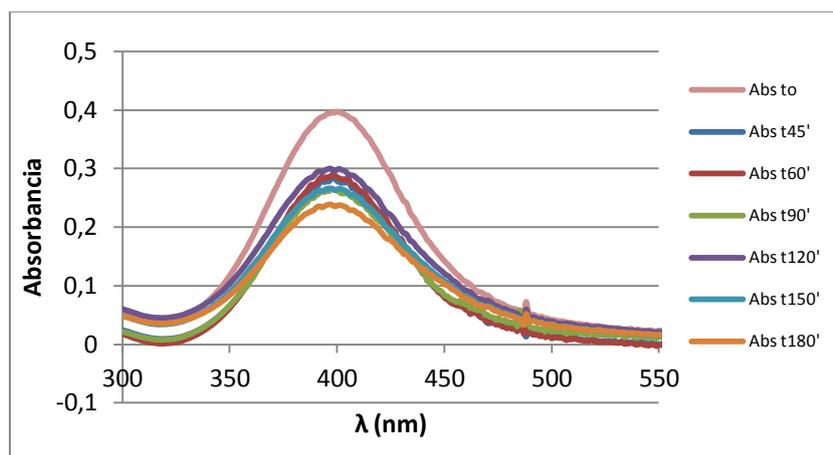


Fig 2 Espectro de absorción de Colargol ($5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) frente al tiempo. Ensayo en presencia de TMAH 5 %, cisteína 0,02 %.

3. Colargol + 4 mL TMAH + cisteína 0,1 %

Se pone Colargol en presencia de TMAH y en presencia de cisteína 0,1 % para ver la influencia que ésta tiene sobre las nanopartículas. En este caso la relación molar entre plata y cisteína es de 1:88.

El espectro de absorción obtenido corresponde con Figura 3.

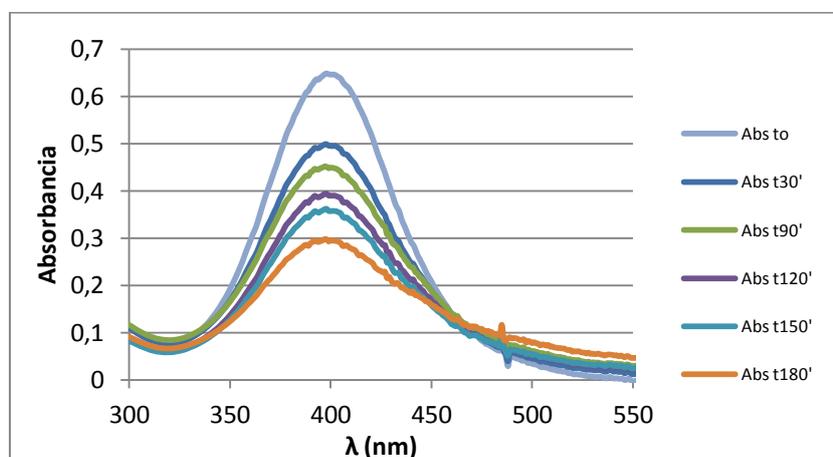


Fig 3 Espectro de absorción de Colargol ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) frente al tiempo. Ensayo en presencia de TMAH 5 %, cisteína 0,1 %.

A2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE SEPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN ASFIFFF. PROGRAMA DE FLUJO CRUZADO.

A2.1. Ensayos de optimización sobre células de control

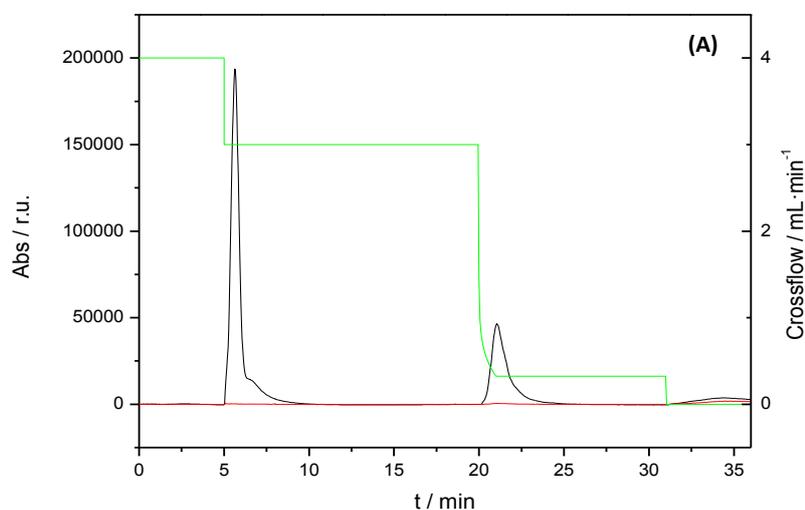
Para encontrar el programa adecuado que nos permita separar las nanopartículas de plata y el material orgánico presente en las muestras de los cultivos, se realiza una solubilización de una de las muestras de control y se prueba con distintos programas. Asimismo, se adicionan posteriormente AgNPs a ese medio de control ya solubilizado para observar la separación.

En la Tabla 1 se muestran las condiciones de uno de los programas de separación.

Tabla 1 Método de inyección y de crossflow utilizado para las medidas de fraccionamiento en flujo mediante campo asimétrico (AsFIFFF) con un flujo a la salida del detector de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Etapa del programa	Tiempo, min		Crossflow, $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
Inyección/focalización	5	Flujo de Inyección, $0.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$	4
Separación	15	Constante	3
	1	Caída exponencial	3 a 0.325
	10	Constante	0.325
	5	Constante	0

Con el programa descrito en la Tabla 1 se inyectan células de control solubilizadas y esas mismas células con una adición de AgNPs posterior a la solubilización. Las Figura 4 muestra los fractogramas obtenidos en ambos casos.



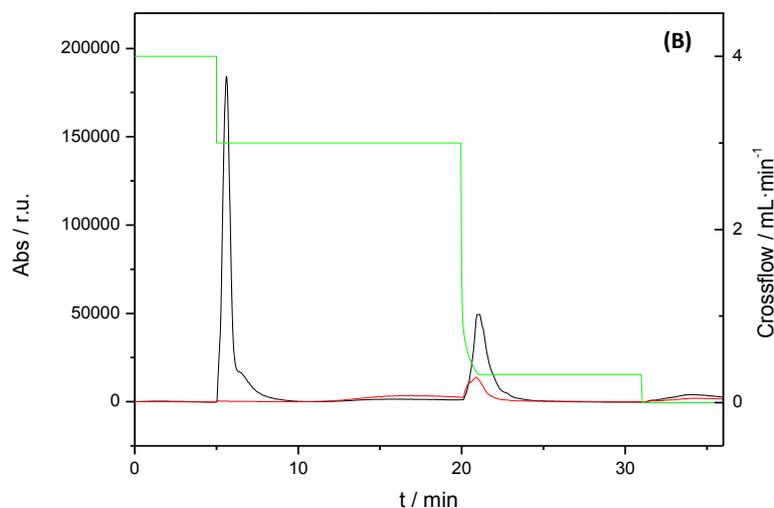


Fig 4 Fractogramas correspondientes a los ensayos con células de control solubilizadas (A) y a esas mismas células con una adición posterior de AgNPs (B) al aplicar el programa de separación descrito en la Tabla 5. Las señales en negro hacen referencia a las señales obtenidas en UV-Vis a 254 nm, las de color rojo a las de 405 nm.

En los fractogramas anteriores se observan las señales a 254 nm debidas a materia orgánica al principio y al final del programa. Asimismo, en el fractograma de la muestra de control con adición de AgNPs se ve el pico correspondiente a 405 nm.

En la búsqueda de un programa que permita la separación se inyectan las muestras según el programa lineal indicado en la Tabla 2.

Tabla 2 Método de inyección y de crossflow utilizado para las medidas de fraccionamiento en flujo mediante campo asimétrico (AsFIFFF) con un flujo a la salida del detector de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Etapa del programa	Tiempo, min		Crossflow, $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
Inyección/focalización	5	Flujo de Inyección, $0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$	4
Separación	15	Caída lineal	3 a 0
	5	Constante	0

Las muestras a las que se les aplica este programa se corresponden con muestras de células de control con adición de AgNPs, y una muestra de AgNPs en el medio de solubilización. En la figura 5 se muestran los fractogramas que se obtienen.

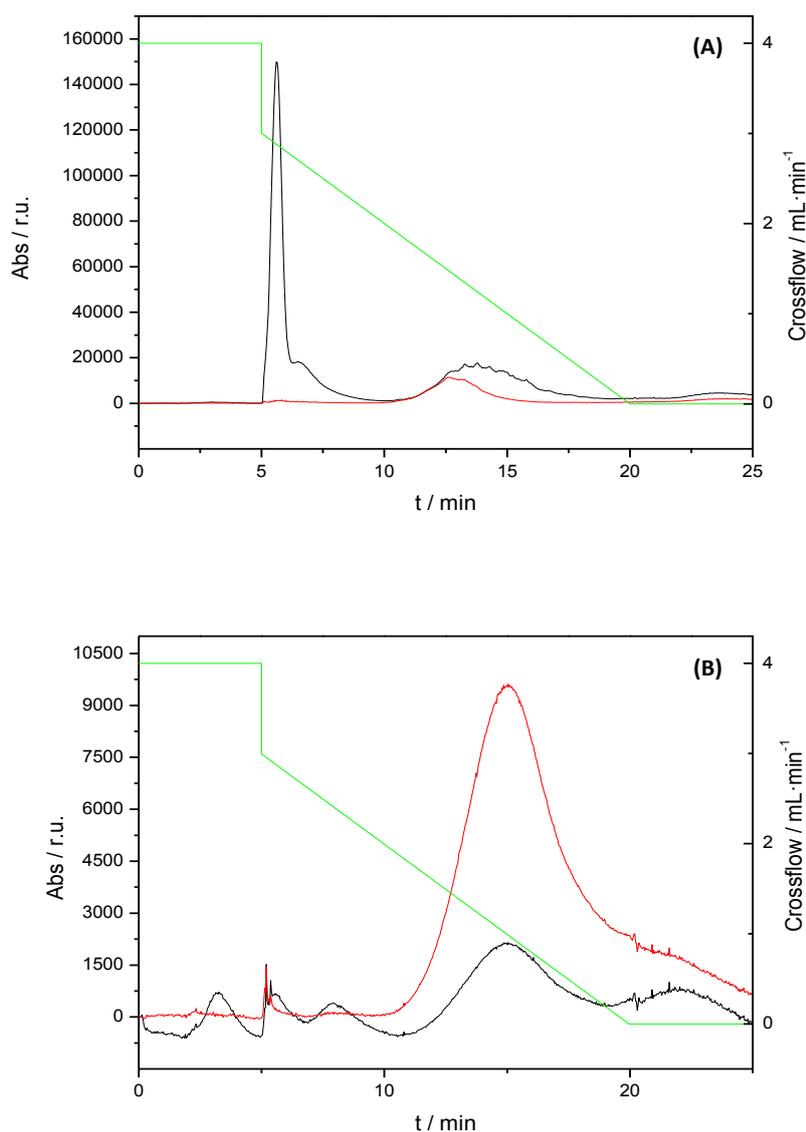


Fig 5 Fractogramas correspondientes a los ensayos de células de control solubilizadas con adición posterior de AgNPs (A) y AgNPs en el medio de solubilización (B) al aplicar el programa de separación descrito en la Tabla 2. Las señales en negro hacen referencia a las señales obtenidas en UV-Vis a 254 nm, las de color rojo a las de 405 nm.

En este caso la separación de las AgNPs se da dentro del programa de crossflow para la muestra de células solubilizadas con adición posterior de AgNPs (Fig. 5A). Sin embargo, en el ensayo realizado únicamente con AgNPs en el medio de solubilización (Fig 5B) se observa que una vez que se deja de aplicar crossflow todavía no ha terminado de descender la señal del pico correspondiente.