

Trabajo Fin de Máster

Caracterización de las propiedades
nanométricas de un silicato de aluminio
y sodio amorfo: desarrollo del protocolo
OECD 318

Autora

Carlota Mur Mur

Directores

Jorge José Pérez Cacho

Ana Isabel Elduque Palomo

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Nanomateriales	3
2.2 Formas de medida de tamaños	4
2.2.1. Métodos de cribado	4
2.2.2. Métodos de confirmación	5
2.3 SODASIL®P95. Silicatos.....	5
2.3.1. SODASIL®P95	5
2.3.2. Silicatos	7
3. OBJETIVOS.....	9
4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	10
4.1. Estudios previos	10
4.1.1. OECD 105	10
4.1.1.1. Ampliación del OECD 105	12
4.1.2. Evaluación del tamaño de partícula.....	13
4.2. OECD 318.....	19
4.2.1. Resultados del OECD 318.....	22
5. CONCLUSIONES	23
6. REFERENCIAS	24
ANEXO A: Métodos analíticos utilizados para el control de calidad del producto.....	26
ANEXO B: OECD 105	36
ANEXO C: Evaluación del tamaño de partícula	42
ANEXO D: OECD 318	57

RESUMEN

En los últimos años, el aumento de la producción y el uso generalizado de nanomateriales manufacturados han acrecentado la probabilidad de encontrarlos en sistemas naturales acuosos. Esta situación ha dado lugar a un debate sobre si los protocolos actuales de prueba reglamentarios para los materiales son suficientes y adecuados para evaluar el destino final y el impacto de los nanomateriales en los sistemas naturales de interés.

En 2011, la Comisión Europea adoptó la Recomendación (2011/696/EU) en la definición de nanomaterial, categorizándolo como aquel material que al menos una de sus dimensiones es menor a 100 nm.

A pesar de los avances técnicos desarrollados en los últimos años, no se dispone de un procedimiento operativo universal y estandarizado para preparar una muestra arbitraria y medir la distribución de tamaño de sus partículas constituyentes.

Cada material requiere de un tratamiento específico, aunque hay ciertos aspectos comunes y esenciales que deben tenerse en cuenta a la hora de preparar la muestra para su análisis. La OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico) ha desarrollado diferentes guías de pruebas para la caracterización de los nanomateriales.

En este Trabajo Fin de Máster se desarrolla el protocolo OECD 318 sobre la estabilidad de dispersión de nanomateriales en medios ambientes simulados, utilizando para ello el SODASIL[®]P95 un silicato de aluminio y sodio amorfo fabricado por Industrias Químicas del Ebro (IQE).

A través de este protocolo y los demás ensayos realizados de caracterización del material se ha podido evaluar el alcance del SODASIL[®]P95 en medios acuosos. Se ha determinado una baja estabilidad de dispersión para el material en condiciones ambientales de: pH alcalinos, una alta concentración salina y la ausencia de materia orgánica disuelta. Así mismo el material se ha categorizado como muy poco soluble según la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) siguiendo el protocolo desarrollado del OECD 105. Además, mediante ensayos de centrifugación se ha determinado la concentración de silicio en el rango nanométrico y por medio de microscopía electrónica (SEM/TEM) se ha intentado determinar la morfología de las partículas primarias, agregados y aglomerados formados por el material.

1. INTRODUCCIÓN

El presente Trabajo Fin de Máster ha sido desarrollado en las instalaciones de Industrias Químicas del Ebro, empresa matriz del Grupo IQE.

La empresa está especializada en la comercialización, desarrollo, fabricación e investigación de materiales en el campo de la química inorgánica básica. IQE fabrica silicatos sódicos y potásicos, sulfatos de aluminio, metasilicato, zeolitas, aluminatos sódicos y potásicos, sílice precipitada, silicato de aluminio amorfo e hidróxido de aluminio amorfo.

Dentro de esta gran diversidad de productos se encuentra uno de los nanomateriales con mayor presencia comercial, la sílice precipitada; así como otros nanomateriales comerciales como los silicatos de aluminio amorfo.

El aseguramiento de la seguridad de los productos que produce una empresa es uno de los elementos clave en su trabajo y en el éxito de su desempeño. Dentro del aseguramiento de la seguridad se encuentra la protección de la salud humana y del medio ambiente contra los riesgos que puedan presentar las sustancias producidas y comercializadas. Existe un completo y complejo conjunto de normas legislativas que guían esta actividad, donde los nanomateriales se caracterizan por su tamaño, ofreciendo oportunidades de mejora de muchas aplicaciones. Pero en paralelo, debido al incremento de su producción industrial y su uso, han surgido una serie de dudas sobre su correcta evaluación del riesgo¹. A través de este Trabajo Fin de Máster y utilizando la guía 318 propuesta por la OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico) para la caracterización de un nanomaterial se ha dado un paso más en su conocimiento.

Es fundamental que los productos cumplan con la normativa vigente propuesta por la ECHA (Agencia Europea de los Productos Químicos)² y estén registrados correctamente en el REACH (Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de sustancias y preparados químicos), caracterizados así correctamente a través de ensayos fisicoquímicos, eco-toxicológicos y toxicológicos actualizados.

El OECD 318 es uno de los 150 métodos de prueba acordados internacionalmente entre gobiernos, laboratorios independientes e industrias químicas, con los que buscan caracterizar los peligros potenciales que puedan producir productos químicos. En concreto el 318, está incluido dentro de la sección 3 “Destino y comportamiento ambiental” e intenta medir la dispersión y agregación de los nanomateriales.

Por ello el OECD 318 se plantea como un estudio eco-toxicológico que evalúe el destino de los nanomateriales en medios acuosos bajo unas condiciones establecidas.

Este Trabajo Fin de Máster también promueve dos de los objetivos marcados en las ODS (Objetivos de Desarrollo Sostenible). Estos son:

- el objetivo número 9 “Construir infraestructuras resilientes, promover la industrialización inclusiva y sostenible y fomentar la innovación”.
- el objetivo número 15 “Proteger, restablecer y promover el uso sostenible de los ecosistemas terrestres, gestionar los bosques de forma sostenible, luchar contra la desertificación, detener e invertir la degradación de las tierras y poner freno a la pérdida de la diversidad biológica”.

2. ANTECEDENTES

2.1. Nanomateriales

En 2011 la Comisión Europea (CE) adoptó una recomendación sobre la definición de nanomaterial, definiéndolo como:

“Por «nanomaterial» se entiende un material natural, secundario o fabricado que contenga partículas, sueltas o formando un agregado o aglomerado y en el que el 50% o más de las partículas en la granulometría numérica presente una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaño comprendido entre 1 nm y 100 nm.

En casos específicos y cuando se justifique por preocupaciones de medio ambiente, salud, seguridad o competitividad, el umbral de la granulometría numérica del 50% puede sustituirse por un umbral comprendido entre el 1% y el 50%”³

Los nanomateriales pueden presentarse de forma natural en muchas nanoformas y nanoestructuras. Es en el documento de trabajo de la Comisión de la Unión Europea SWD (2012) 288 final, donde se recogen los tipos y usos de nanomateriales⁴. Categoriza a los nanomateriales en nano-objetos o en materiales nanoestructurados. Los nano-objetos pueden ser nanoplacas, nanofibras, nanopartículas, nanosuspensiones y aerosoles de un sólido nano-objeto. Y por otro lado los materiales nanoestructurados los agrupa en aglomerados o agregados de nano-objetos.

Los nanomateriales pueden tener propiedades diferentes a las del mismo material en un tamaño no nano. Es decir, la relación superficie/masa es mucho más alta en la fracción nanométrica que en la fracción no nano, por lo que el rendimiento catalítico de las nanopartículas puede ser mayor. También un menor número de átomos en el sólido

modifica la estructura de bandas, pudiendo modificar la conductividad del material. Estas propiedades y otras diferentes hacen que los nanomateriales sean más atractivos para numerosas aplicaciones.

Se estima que la cantidad anual de nanomateriales comercializados en todo el mundo es de alrededor de 11,5 millones de toneladas con un valor de mercado aproximadamente de 20 mil millones de euros, según los datos de SRI Internacional⁵

Tienen aplicaciones en sectores como el aeroespacial, el automovilístico, el agroalimentario, la construcción, la sanidad, la cosmética, entre otros muchos. Ejemplos de ellos además de la sílice son: el dióxido de titanio, el óxido de zinc, fullerenos, grafeno, nanotubos de carbono, ...

2.2 Formas de medida de tamaños

El Centro Común de Investigación (JRC) publicó un informe⁶ en el que detalla los métodos analíticos necesarios para la identificación de nanomateriales de acuerdo con la Recomendación de la Comisión Europea sobre la definición de nanomaterial. Para clasificar un material como nanomaterial es necesario que al menos el 50% de las partículas tengan una o más dimensiones externas (tamaño) entre 1 nm y 100 nm, por lo que para evaluar el tamaño de las partículas es necesario evaluar la distribución de tamaño de partículas d50.

El JRC agrupa las técnicas de medida en dos grupos, uno como métodos de cribado y otro como métodos de confirmación. El primero incluye técnicas rápidas y más económicas que permiten por igual identificar los materiales como nanomateriales. En cambio, los métodos de confirmación incluyen técnicas de medida más costosas, menos rápidas que las anteriores y proporcionan una información más fiable.

El documento del JRC presenta también un extenso capítulo sobre preparación de muestras donde aparecen conceptos clave como pre-dispersión, des-aglomeración, estabilidad de dispersión o el efecto de la sonicación. También se muestra la posibilidad de realizar medidas indirectas.

2.2.1. Métodos de cribado

Los métodos de cribado asumen que las partículas a identificar son esferas ideales.

Los métodos de cribado son ocho: DLS (dispersión dinámica de luz), CLS (centrífuga de sedimentación líquida), sp-ICP-MS (espectroscopía de masas con plasma de acoplamiento inductivo en modo de detección de partículas individuales), SAXS

(dispersión de rayos X por ángulo reducido), PTA (análisis de seguimiento de partículas), ...

Estas técnicas son dependientes de la preparación de muestra. A veces no pueden distinguir entre partículas individuales (primarias), de agregados o aglomerados, lo que daría lugar a una clasificación incorrecta del material.

A nivel industrial, el DLS es el método normalmente utilizado para la creación de especificaciones de un producto.

2.2.2. Métodos de confirmación

Los métodos de confirmación son usados cuando existen dudas o cuando los métodos de cribado no se pueden utilizar. Son solo dos los métodos de confirmación, la microscopía electrónica (SEM/ TEM) y la microscopía de fuerza atómica.

Éstos deben ser capaces de poder identificar y medir las partículas primarias dentro de los agregados y aglomerados, sin realizar la aproximación de partícula esférica. Y a su vez proporciona datos sin procesar, es decir, únicamente basados en la distribución de tamaño de partícula.

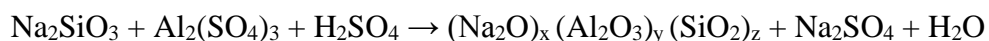
Como puntos negativos señalar que el número de objetos de observación son limitados salvo que se produzca un gran trabajo estadístico, y además el método de preparación de muestra puede afectar a los valores obtenidos.

2.3 SODASIL[®]P95. Silicatos

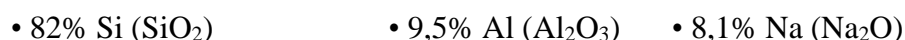
2.3.1. SODASIL[®]P95

Para la realización de este TFM se ha usado el SODASIL[®]P95, un producto comercial de la empresa IQE.

El SODASIL[®]P95 es un silicato de aluminio y sodio amorfo de color blanco que se obtiene mediante la reacción de un silicato sódico soluble, sulfato de aluminio y ácido sulfúrico como se describe a continuación:



Siendo su composición química:



El SODASIL[®]P95 forma parte de la familia de silicatos amorfos, entre los que la sílice precipitada amorfa es el producto industrial de mayor relevancia y sobre el que existe un importante debate legislativo para que éste sea un modelo en los procesos de aseguramiento de la seguridad industrial. Las principales propiedades físico-químicas se recogen en la Tabla 1.

Datos físicos y químicos de SODASIL® P95:	
Superficie específica BET	70 m ² /g
Tamaño de partícula	6 μm
Densidad de compactación	250 g/L
Pérdida por desecación	6%
Conductividad, suspensión acuosa al 10%	<1 mS/cm
Absorción de DOA	160 mL/100g
pH, suspensión acuosa al 5%	10,5

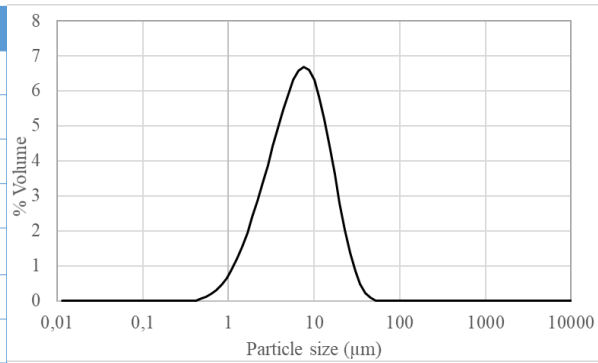


Tabla 1- Propiedades físico-químicas del SODASIL®P95

Gráfica 1 – Distribución de tamaño del SODASIL®P95 por LS

Los métodos analíticos utilizados se describen en el anexo A. El SODASIL®P95 se analiza mediante difracción laser (LS) para calcular el tamaño de partícula secundario, que resulta en torno a 6 μm (Gráfica 1).

A través de las microfotografías del microscopio electrónico de barrido (SEM) se puede observar los aglomerados y agregados que forman el material (Imagen 1).

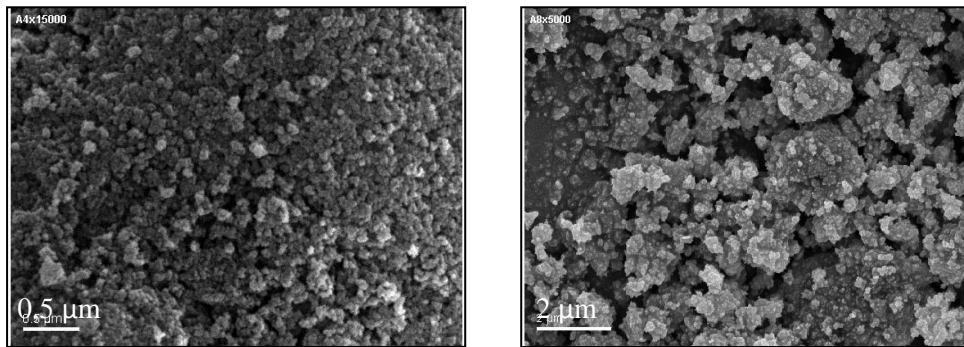


Imagen 1- Microfotografías de SEM del SODASIL®P95

Y junto con las microfotografías de TEM (Microscopio electrónico de transmisión, Imagen 2), se puede comprobar que el tamaño de partícula primaria del material es en torno a 25-100 nm y la apariencia esférica de la partícula primaria.

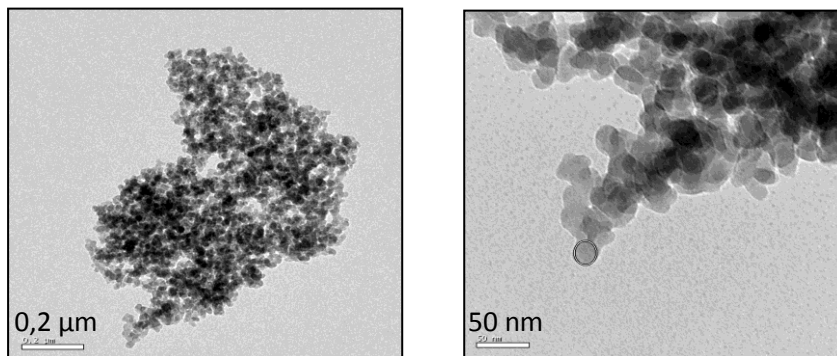


Imagen 2- Microfotografías de TEM del SODASIL®P95

Este tamaño de partícula primaria entra dentro del rango establecido por la CE para las nanopartículas, al tener un tamaño inferior a 100 nm, por lo que es necesario realizar una correcta caracterización de la parte nanométrica del SODASIL®P95.

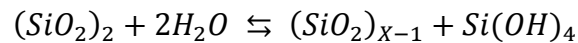
2.3.2. Silicatos

Los silicatos tienen una estructura básica formada por un tetraedro de silicio (SiO_4)⁴⁻ y para compensar la carga pueden formar enlaces con otros cationes como Al^{3+} , dando lugar así a los aluminosilicatos.

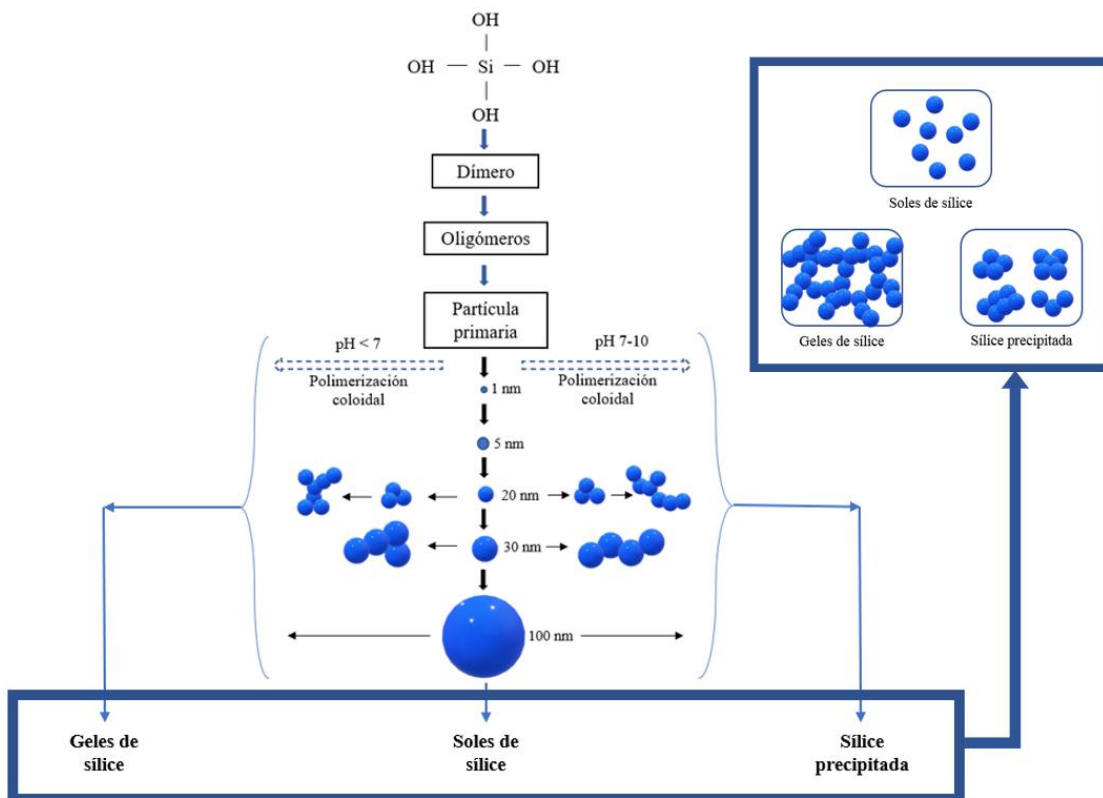
Los aluminosilicatos constituyen uno de los grupos de minerales más abundantes en la corteza terrestre y pueden emplearse en la fabricación de piezas técnicas de caucho hasta como pigmento blanco en pinturas, entre otros. Hay diferentes aluminosilicatos, tanto cristalinos (ej: bentonita, feldespato, ...) como amorfos que son los usados en este trabajo. El sector industrial ya a finales del siglo XIX fijó estos productos como objetivo a replicar y desarrollar. Y no fue hasta principio del siglo XX cuando aparecieron procesos industriales de fabricación de la sílice precipitada y sus sales⁷.

Estructura de la sílice precipitada amorfa (SAS) y de los silicatos de aluminio amorfo

La sílice es un óxido muy poco soluble en agua, pero la pequeña parte que si se solubiliza reacciona con los iones hidroxilo según la reacción:



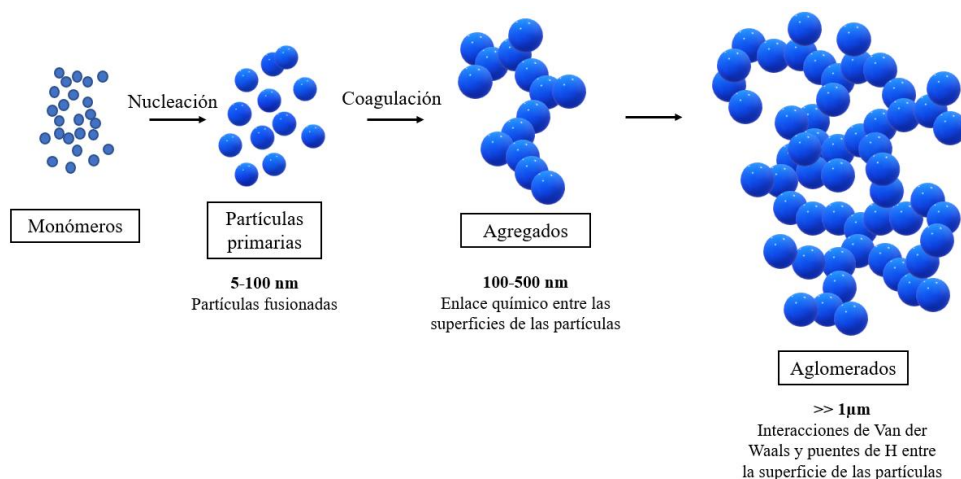
Esta reacción de hidratación y deshidratación está controlada por iones OH^- . En equilibrio, la concentración de $Si(OH)_4$ a 25°C está en el rango de 70 ppm de SiO_2 , pero claramente este valor es variable en función de las diferentes condiciones y materiales⁷.



Esquema 1- Polimerización de la sílice amorfa

Una disolución saturada de silicato puede formar soles de sílice, sílice precipitada o geles de sílices. Es decir, la sílice no es estable en esas condiciones y polimeriza para obtener diferentes tipos de sílices amorfas sintéticas (SAS) (Esquema 1).

Las moléculas individuales (monómeros) y oligómeros se unen para formar partículas primarias de tamaño 5-100 nm y éstas a su vez se unen formando agregados a través de enlaces siloxano. El tamaño de los agregados depende del grado de polimerización coloidal conseguido, es decir, del número de partículas coloidales que se han unido, por lo que su tamaño se encuentra en torno 100-500 nm. Posteriormente estos agregados también pueden unirse entre sí por medio de enlaces siloxano y estabilizarse a través de puentes de hidrógeno e interacciones de tipo Van der Waals entre los grupos silanoles de distintos agregados, formando lo que se denomina aglomerados. Su tamaño es superior a 1 μm , por lo que está en el rango entre 1-100 μm (Esquema 2).



Esquema 2- Aglomeración de las partículas

Diferentes condiciones de reacción como el pH y la concentración salina, entre otras, ... determinan el crecimiento de las partículas elementales, o también la generación de nuevas partículas primarias. La reacción de adsorción y desorción de sílice sobre partículas sólidas se han explicado por el llamado “Ostwald ripening” principio con el que se ha modelado el proceso de polimerización, tanto la unión de monómeros y oligómeros en partículas ya formadas, como la unión entre partículas elementales.

La superficie y la estructura interna de las partículas de sílice amorfa se caracterizan por estar formada por grupos Si-O-Si (enlace siloxano) y por grupos silanoles que se forman durante la polimerización del ácido silícico en la superficie.

3. OBJETIVOS

El aumento de la producción y el amplio uso de nanomateriales ha acrecentado la probabilidad de encontrarlos en el medioambiente, donde el transporte y la distribución de éstos es principalmente a través de medios acuosos.⁸

El SODASIL[®]P95 (n^oCAS: 1344-00-9) está registrado en el REACH y éste no está clasificado como sustancia peligrosa⁹. No existe un informe que evalúe los riesgos de las nanoformas de la sílice por lo que la caracterización, y su posterior evaluación a través de estudios físico-químicos, eco-toxicológicos y toxicológicos, es esencial.

Con la realización de este TFM se pretende caracterizar la fracción nanométrica del SODASIL[®]P95 de acuerdo con las distintas guías de caracterización físico-químicas de trabajo recomendadas por la OECD, así como evaluar el efecto de dicho material en medios ambientes acuosos a través de otros protocolos eco-toxicológicos.

Algunos de los protocolos eco-toxicológicos más relevantes y tradicionales son:

OECD 201: Test de inhibición del crecimiento de algas y cianobacterias en agua dulce;

OECD 202: Test agudo de inmovilización aguda en Daphnia; OECD 203: Test de toxicidad aguda en peces;

OECD 207: Test de toxicidad aguda en lombrices de tierra;

OECD 209: Test de inhibición de la respiración en lodos activos.

Con los protocolos anteriormente mencionados se ha cuestionado la eficacia de éstos para materiales con una fracción nanométrica, y se han desarrollado numerosos trabajos para mejorarlos.

En primer lugar, se ha caracterizado la fracción nano del SODASIL[®]P95 desarrollando el protocolo OECD 105¹⁰ para determinar la solubilidad. Se ha ampliado dicho estudio a través de una evaluación del tamaño de partícula donde se ha determinado la variación de la distribución del tamaño del material sometido a diferentes condiciones de centrífuga y se ha caracterizado el porcentaje de partículas “nano” en el material.

A partir de los datos obtenidos en los estudios previos se abordó la realización del estudio principal de este TFM que trata del OECD 318¹¹. Un protocolo eco-toxicológico específico para nanomateriales donde se propone cuantificar la alta, baja o intermedia estabilidad de dispersión del material en diferentes condiciones ambientales que se podrían dar en la naturaleza. Es decir, evaluar la capacidad de un nanomaterial para formar una dispersión coloidal y en qué condiciones se conserva dicha dispersión.

Para representar estas condiciones se utilizan diferentes concentraciones de aniones y cationes presentes en las aguas naturales, varios pH y la presencia o ausencia de materia orgánica disuelta (NOM).

La estabilidad de la dispersión depende de las características fisicoquímicas del propio material, las características fisicoquímicas del medio de suspensión, la preparación de la suspensión, la concentración del nanomaterial y de otras sustancias que puedan encontrarse en el medio.

Este parámetro es muy dinámico y está controlado por la cinética de la reacción. Por lo que la información sobre la estabilidad de la dispersión de los nanomateriales, el comportamiento de aglomeración, agregación y la velocidad de disolución son unos factores importantes a tener en cuenta para poder caracterizar un material de carácter nanométrico. Según las últimas evaluaciones de ecotoxicidad se destaca la estabilidad de la dispersión como el elemento clave como parámetro de control de riesgo en materiales de carácter nano. Los nanomateriales en el medio ambiente pueden interactuar de cuatro maneras posibles:

1. Efecto directo sobre la biota, es decir, toxicidad.
2. Cambios en la biodisponibilidad de toxinas o nutrientes.
3. Efectos indirectos en el ecosistema, como modificar la dispersión de las sustancias orgánicas naturales.
4. Cambios en las microestructuras del medio ambiente.

Una alta dispersión de las nanopartículas incrementará la disponibilidad de éstas en los ecosistemas.¹² Por lo que la estabilización de las nanopartículas favorece su presencia en la columna de agua, aumentando la posibilidad de transporte y difusión.

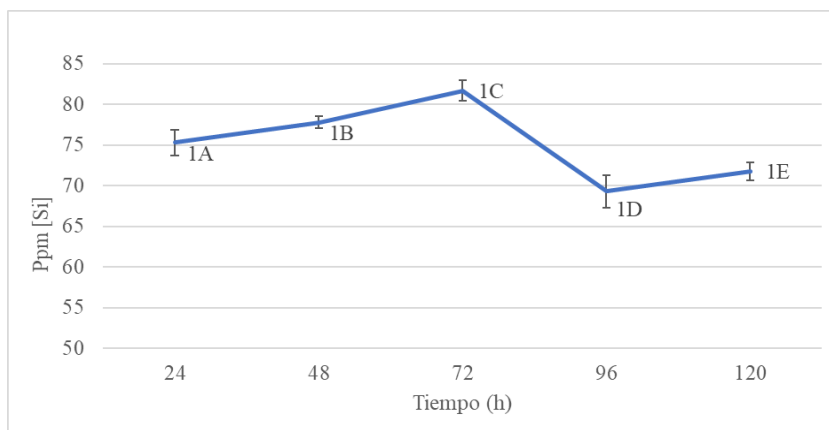
4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1. Estudios previos

4.1.1. OECD 105

El protocolo OECD 105 es un estudio que tiene por objeto determinar la solubilidad de un material. Se evaluará el tiempo necesario para lograr la saturación de 5 disoluciones de SODASIL[®]P95 sometidas a agitación constante (300 rpm).¹⁰ La solubilidad es una de las propiedades que el JRC⁶ utiliza para evaluar, conocer el material e identificar su posible riesgo.

Se ha utilizado el análisis mediante Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-OES) del silicio como forma para cuantificar la solubilidad del SODASIL[®]P95, donde el silicio es el elemento mayoritario del producto (32,2% frente a Si, 68,8% frente a SiO₂). Las condiciones optimizadas de trabajo del ICP-OES se describen en el anexo A, utilizando una recta de calibrado de 0,5-20 ppm de Si de patrón monovalente. El desarrollo del procedimiento del análisis ha sido una parte original del trabajo. El estudio OECD 105 completo se explica en detalle en Anexo B. Se toma muestra del sobrenadante de 5 disoluciones acuosas con una concentración aproximadamente de 50g/L a temperatura ambiente, con el pH propio del material en el medio (pH en torno a 9,8) y con agitación (300 rpm) durante un máximo de 120 horas (tiempos intermedios de 24 - 48 -72 y 96 horas). Estas muestras se centrifugan, se filtran (filtros de 0.45 y 0.2 μm) y se determinan mediante ICP-OES sin ningún tipo de tratamiento adicional.



Gráfica 2- Solubilidad del SODASIL[®]P95 según el OECD 105

Se concluye que la concentración de Si en el sobrenadante aumenta hasta un máximo transcurridas 72 horas de agitación de $81,7 \pm 1,3$ ppm (174,8 ppm de SiO₂, 254,1 ppm de SODASIL[®]P95), representando un 0,50% de Si en el sobrenadante respecto a la concentración inicial de la muestra. La cuantificación de Si en el periodo de 24 a 120 h se muestra en la Gráfica 2, con valores constantes dentro de un error experimental.

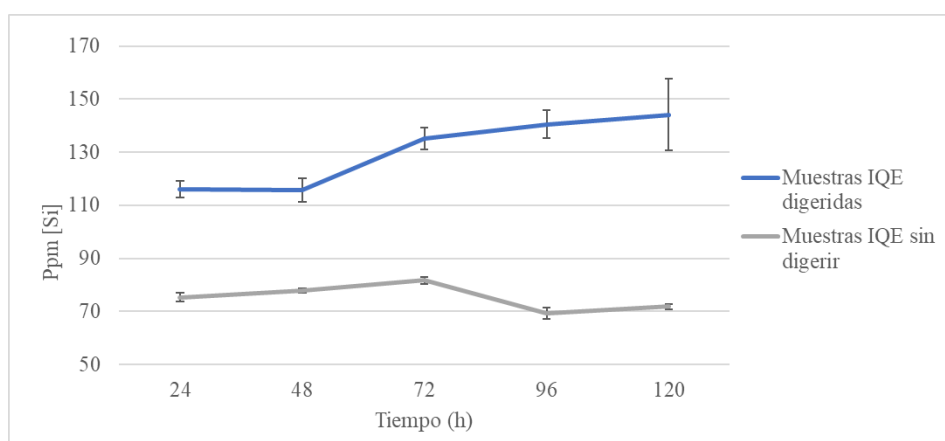
Con los valores obtenidos y según el criterio seguido por la EFSA el SODASIL[®]P95 se clasifica como material muy poco soluble, ya que se obtienen valores en el sobrenadante de 0,25 g/L y entran dentro del rango de 0,1-1 g/L. Si el valor estuviera por debajo de 0,1 g/L se denominaría como insoluble y según la Farmacopea Europea quedaría definido como prácticamente insoluble¹³. Señalar también que el valor obtenido para la concentración del ion aluminio en los sobrenadantes es inferior a 1 ppm, (0,02 ppm como Al₂O₃), confirmando la conocida baja solubilidad del ion aluminio en medios naturales⁸.

4.1.1.1. Ampliación del OECD 105

Para validar los resultados se realizan dos modificaciones dentro de la determinación analítica ICP-OES del Si. Se ha modificado primero el tratamiento de muestra, digiriendo las muestras de manera ácida en el bloque digestor, y en segundo lugar se ha repetido la cuantificación realizando la recta de calibrado con el blanco de digestión. Los resultados extendidos se encuentran en el anexo B.

No se han observado diferencias significativas entre las rectas realizadas con blanco de digestión o agua, concluyendo que el ICP-OES no tiene interferencias de efecto matriz.

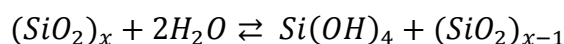
Por otro lado, los resultados obtenidos tras la digestión de 1 mL del sobrenadante de las muestras centrifugadas muestran valores de silicio ligeramente superiores. Se obtiene el máximo de concentración a las 120 horas de agitación, obteniéndose $145,4 \pm 13$ ppm de Si, que representa 0,31 g/L de SiO₂ (0,45 g/L de SODASIL®P95).



Gráfica 3- Comparación de la solubilidad del SODASIL®P95

Este valor sigue estando dentro del rango 0,1-1 g/L categorizado por la EFSA como muy poco soluble, lo que confirma las conclusiones ya descritas.

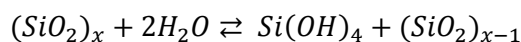
La forma soluble mayoritaria de las sílices y silicatos amorfos, entre ellos del SODASIL®P95, corresponde al ácido silícico, Si(OH)₄. Éste se mantiene en estado monomérico en agua a 25°C en concentraciones inferiores a $2 \cdot 10^{-3}$ M, manteniendo un equilibrio con las fases sólidas según la ecuación:



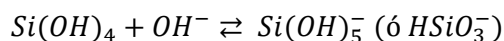
El ácido silícico es esencialmente no iónico en medios neutros o ligeramente ácidos y los dos procesos más comunes de su química son:

- Polimeriza de forma rápida cuando incrementa su concentración formando a) ácidos polisilícicos de bajo peso molecular y b) especies poliméricas mayores llamadas coloides. Existe un valor de tamaño y peso molecular (rango de 50 Å y

peso molecular de 100.000) barrera, a partir del cual las fases poliméricas inestables y transitorias (oligómeros, ácidos polisilícicos o “sílice activa”) se convierten en partículas sólidas estables (sílice coloidal)



- b) Desde pH 9 a pH 10,7 aparece un incremento de solubilidad por la aparición del ion silicato con una carga negativa, $Si(OH)_5^-$ ó $HSiO_3^-$, en equilibrio con el ácido silícico. Por encima de 10,7 toda la sílice en fase sólida se disuelve y pasa a fase soluble, desapareciendo el ácido silícico formándose distintas fases iónicas poliméricas según la concentración



El silicio determinado con la primera recta de calibrado (Gráfica 2) buscaba cuantificar todo el silicio soluble (ácido silícico, oligómeros/”sílice activa” e iones silicatos). Pero los datos obtenidos mediante ICP-OES no son suficientes para poder establecer el estado del material, y queda la duda de la correcta evaluación de los oligómeros al utilizar un patrón monovalente y trabajar en un rango de pH elevado. Con la segunda recta de calibrado (Gráfica 3) y con un ataque que incluiría las fases sólidas, se ha cuantificado no sólo las fases solubles sino también los sólidos/coloides que han pasado la filtración de 200 nm. La diferencia de resultados señala la presencia o bien de oligómeros o bien de partículas coloidales, señalando en todo caso unos valores inferiores al 0,5% del material en análisis.

4.1.2. Evaluación del tamaño de partícula

Las partículas constituyentes de los productos químicos del mundo real presentan morfologías muy variadas, y por lo tanto su tamaño puede describirse o definirse mediante diferentes dimensiones características siendo el “diámetro equivalente” el más utilizado. Fuera de partículas completamente esféricas y monomodales donde el diámetro define completamente el tamaño, la complejidad del resto de materiales es mucho mayor. Así, las partículas de silicatos y sílices amorfas, tal y como se ha descrito en el punto 2.3 de esta Memoria, están formados por aglomerados, que son uniones de otras estructuras menores (agregados y partículas elementales o constituyentes). Los parámetros que definen un tamaño pueden determinarse experimentalmente a través de diferentes técnicas analíticas, aplicando diferentes principios de medida físicos y diferentes algoritmos de cuantificación que utilizan suposiciones o aproximaciones de la forma, densidad o índice de refracción. La mayoría de los instrumentos o técnicas no miden

directamente la característica fundamental del tamaño de partícula, miden otras propiedades que se correlacionan con la dimensión de partícula.

También la determinación de la propiedad del “tamaño de partícula” debe recoger las diferentes estrategias de a) preparación de la muestra y b) la vehiculización de la misma hasta la zona de medida; éstas deben definirse o especificarse según el método de medida. Es decir, el valor “tamaño de partícula” es dependiente del método de medida elegido para su cuantificación, y una evaluación correcta exige una completa descripción del método de medida, incluyendo el principio físico que soporta la técnica, del procedimiento de análisis de datos y de la forma de preparación de muestras. Además, los rangos efectivos de trabajo de los métodos pueden ser significativamente menores a los rangos teóricos de determinación descritos por los fabricantes de equipos, con límites de medida dependientes del tipo de material.

Toda esta complejidad en el concepto tamaño de partícula se ve ampliada en el mundo de nanomateriales, principalmente en el de materiales nanoestructurados con presencia de partículas con una dispersión en un rango de tamaños superior al de cuatro ordenes de magnitud (partículas elementales en el rango de decenas de nanómetros a aglomerados en el rango de centenares de micrómetros).

En este trabajo se pretende valorar las limitaciones de algunas de las técnicas de medida de tamaño de partícula tradicionalmente utilizadas en la caracterización del SODASIL[®]P95. En concreto, se van a utilizar tres técnicas de medida el LS, DLS y SEM.

Éstos son varios de los métodos analíticos de cribado y de confirmación propuestos por el JRC para la identificación de nanomateriales⁶.

Otro de los requisitos necesarios para la identificación de los nanomateriales y su correcta evaluación eco-toxicológica, dentro de la determinación de distribución de tamaño, es conocer el porcentaje de la fracción nanométrica que tiene el material. Este trabajo buscará seleccionar el mejor procedimiento experimental para hacerlo.

La base del estudio, junto al uso de varias técnicas, es la caracterización del sobrenadante de una dispersión de SODASIL[®]P95 sometida a diferentes condiciones de centrifugación acelerada, partiendo siempre de unas mismas condiciones iniciales. La centrifugación va a permitir separar fracciones de tamaño, y de alguna manera separar en función del tamaño.

En todas estas fracciones se cuantificará la cantidad de SODASIL®P95 mediante ICP-OES, permitiendo así tener una versión completa del material uniendo los tamaños y las cantidades de los diferentes sobrenadantes analizados.

Además, para evaluar la importancia de la forma de preparación de muestras, se repetirá el estudio sobre dos disoluciones stock de SODASIL®P95 al 1,5% en peso, pero con diferentes condiciones de sonicación: una de forma intensa (2000 W·s/mL) y otra de forma suave (100 W·s/mL). Estas dos suspensiones posteriormente son sometidas a las mismas pruebas de sedimentación acelerada (Imagen 4).

La metodología más extendida y los resultados obtenidos se encuentran en el anexo C.

La forma de sonicación utilizado se realiza a través de un dispositivo ultrasónico digital de HIELSCHER, modelo UP400St y sus parámetros utilizados se describe según el esquema adjunto:

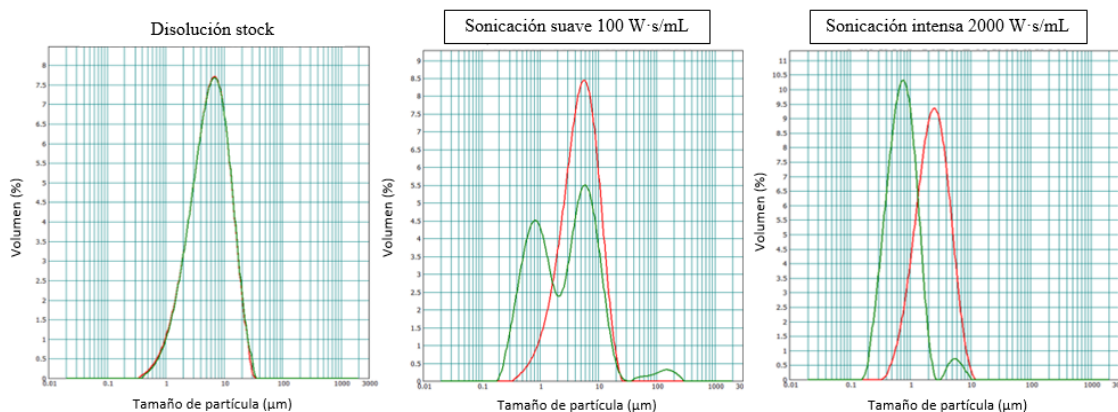
Producto	Concentración (%)	Volumen (mL)	Tiempo (min)	Intensidad $\left(\frac{W}{cm^2}\right)$	Energía total aportada (W · s)	Energía específica $\left(\frac{W \cdot s}{mL}\right)$
SODASIL®P95	1,50	250	3	92	25 000	100
		125	31	87	250 000	2 000

Esquema 3 – Parámetros del sonotrodo HIELSCHER utilizados para las dos dispersiones stock

Para comprobar la homogeneidad de las disoluciones de stock de SODASIL®P95 y ver la distribución de tamaños se analizaron las muestras mediante difracción láser por vía húmeda (forma de medida más común).

Los datos obtenidos se encuentran en la Tabla 2 y se observa cómo la técnica de medida es capaz de cuantificar cambios en la forma de las partículas de SODASIL®P95 según el grado de sonicación.

La Gráfica 4 muestra la evolución del tamaño según la sonicación, donde se puede comprobar que tras una sonicación intensa el material está más fragmentado y el tamaño de partícula medio (d50) es de 2,549 µm. En cambio, para una sonicación suave el tamaño de partícula medio es de 4,634 µm, no muy lejano del resultado obtenido según el procedimiento estándar que es 5,509 µm, procedimiento desarrollado en la empresa IQE siguiendo la norma ISO 13320:2020, donde se introduce una débil sonicación que permite homogeneizar la suspensión.



Verde: Disolución sonicada sin el proceso de reacondicionamiento

Rojo: Disolución sonicada después del proceso de reacondicionamiento

Gráfica 4- Disolución de stock, disolución de stock sonicada de forma suave y disolución de stock sonicada de forma intensa

Las muestras sonicadas deberán seguir un protocolo de reacondicionamiento para el aseguramiento de la homogeneización de la muestra y la integridad de la misma.

Seguidamente dos disoluciones de stock sonicadas se someten a un procedimiento de centrifugación bajo diferentes condiciones de velocidad y tiempo (Esquema 4).

		Fuerza centrífuga							
		100 G					200 G	1000 G	2000 G
Sonicación	Intensa	5'	10'	20'	30'	45'	60'	60'	60'
	Suave								

Esquema 4- Descripción experimental del proceso de centrifugación

La centrifugación se lleva a cabo a temperatura ambiente y a pH natural de producto (en torno a 9,8). Se utiliza una centrífuga LUMIFuge de LUM GmbH (Imagen 4). Para ello, se pipetea 4mL de la disolución inicial correspondiente (disolución sonicada de forma intensa o suave), se introduce en una celda de poliamida (longitud de trayectoria de 10 mm, Imagen 3) y se aplica la fuerza centrífuga correspondiente (100 G, 200 G, 1000 G o 2000 G) durante los tiempos establecidos en el esquema anterior.

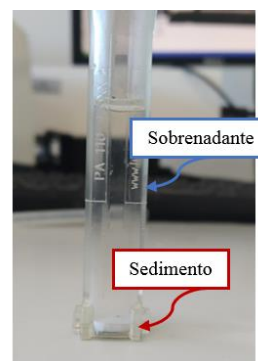


Imagen 3 – Celda de poliamida

Es decir, se toma muestra del sobrenadante de las muestras centrifugadas a 100 G a los 5, 10, 20, 30 y 45 minutos y de las muestras centrifugadas a 200 G, 1000 G y 2000 G a los 60 minutos. Para su posterior caracterización por LS, DLS e ICP-OES. Por otro lado, para la caracterización por SEM se toma solo una alícuota de las muestras centrifugadas a 1000 G y 2000 G durante 60 minutos.



Imagen 4 – Centrífuga LUMIFuge

A través de las posteriores centrifugaciones se observa cómo conforme aumenta el tiempo y la velocidad de centrífuga el tamaño de partícula medio disminuye progresivamente. Los valores de diámetro equivalente aparecen en la Tabla 2, junto a la determinación del silicio a través del ICP-OES.

Condiciones de centrifuga		Tipo de ultrasonidos	ICP-OES (ppm)		Diámetro de partícula (nm)			
Fuerza centrifuga	Tiempo (min)		ppm Si	± IC	LS			DLS
					d10	d50	d90	d50
0	0	intensa	4915,779	0,000	1207	2549	4820	652
		suave	4915,779	0,000	2175	4634	8674	-
100 G	5	intensa	2826,808	477,620	755	1365	2398	439
		suave	2601,720	1016,511	723	1337	2419	470
	10	intensa	3575,998	688,703	554	1081	1992	380
		suave	2015,193	668,964	503	924	1559	102
	20	intensa	2151,919	203,168	139	469	1185	347
		suave	1319,026	308,959	142	106	1071	332
	30	intensa	1705,284	216,910	150	195	1088	307
		suave	1164,634	359,643	146	128	1032	307
45	intensa	1321,315	81,140	136	268	769	246	
	suave	965,062	404,489	159	276	571	151	
200 G	60	intensa	974,475	29,369	127	198	298	189
		suave	544,841	442,283	119	157	276	205
1000 G	60	intensa	391,132	185,431	-	-	-	144
		suave	553,947	196,682	-	-	-	151
2000 G	60	intensa	202,785	124,194	-	-	-	136
		suave	168,032	136,354	-	-	-	151
2000 G	300	intensa	-	-	-	-	-	92
		suave	-	-	-	-	-	-

Tabla 2 – Resultados de la evaluación del tamaño

Se observa cómo es necesaria una centrifugación de 300 min a 2000G para obtener un tamaño medio de partícula (d50) por debajo de 100 nm (d50 = 92 nm). En la Gráfica 5 aparecen resumidas las propiedades del sobrenadante tras 60 min y 2000G para una muestra con una sonicación intensa.

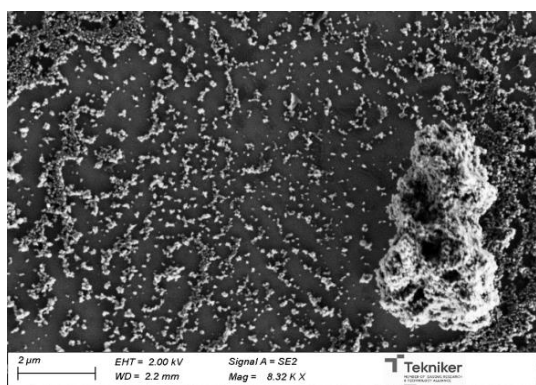
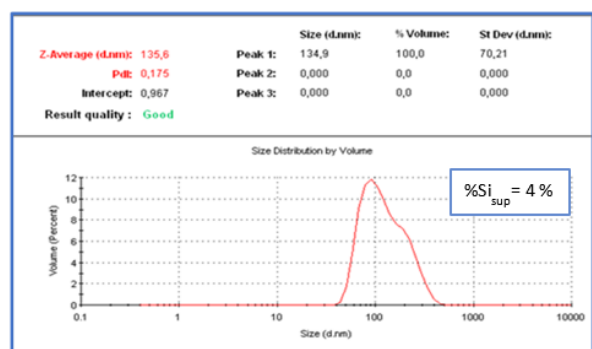


Imagen 5 – Microfotografía SEM, 60 min a 2000G. Sonicación intensa previa



Gráfica 5 – DLS del sobrenadante, 60 min a 2000G. Sonicación intensa previa

El uso combinado de la centrifugación para separar las partículas menores, su cuantificación por ICP-OES, la medida de tamaño de partícula con DLS y su confirmación por SEM permite caracterizar fracciones de pequeño tamaño en silicatos. Por ejemplo, como se observa en la Gráfica 6, los resultados para el sobrenadante de la centrifugación tras 60 min y 200G, muestra que existe un 11% del material con tamaños con d50 por debajo de 200 nm.

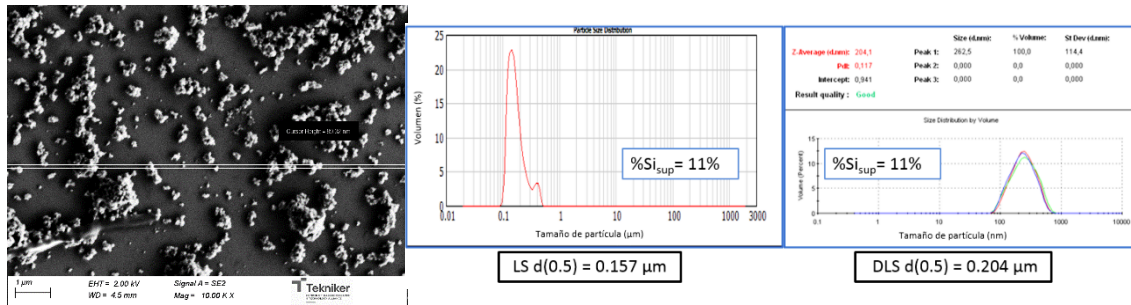
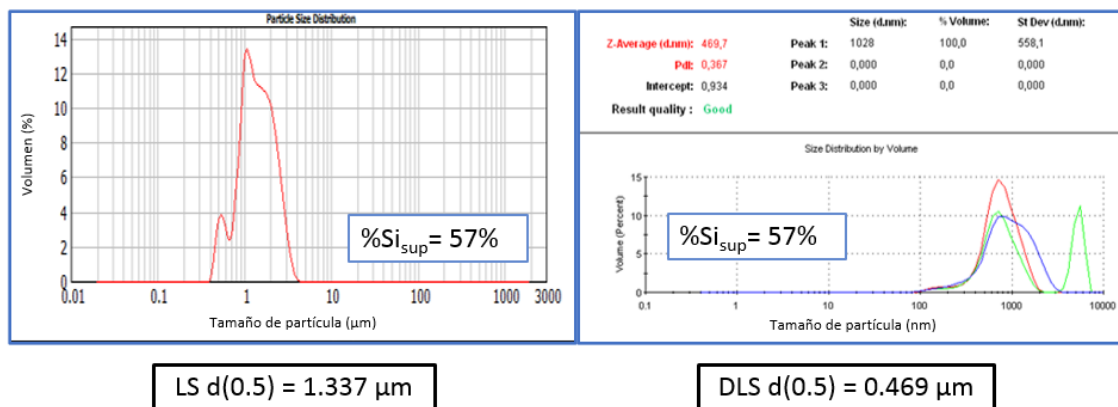


Imagen 6 - Microfografía de 60 min a 200G. Sonicación suave previa. Gráfica 6 – Determinación del tamaño a 60 min a 200G. Sonicación suave previa

Otras ideas que se pueden extraer del estudio serían:

1.- La técnica LS ofrece una imagen completa y más cercana a la realidad del material, pero no es capaz de cuantificar correctamente la fracción de pequeño tamaño, minusvalorando la fracción por debajo de 1 µm. La técnica de difracción láser no es la adecuada para valorar fracciones “nano”.

2.- La técnica DLS ofrece valores correctos para dispersiones estables, pero en cuanto existe materiales con tendencia a la decantación ofrece valores alejados de la realidad del material, tal y como se observa en la Gráfica 7 donde se observa el sobrenadante de la centrifugación tras 5 min a 100G.



Gráfica 7- Determinación del tamaño a 5 min a 1000G. Sonicación intensa previa

3.- La técnica de SEM es una técnica de confirmación, pero no es recomendable como técnica de caracterización y cuantificación.

4.- La forma de preparación de muestra (agitación) es importante en los resultados para la técnica LS, pero no en los resultados de cuantificación “nano”, fracción <100nm.

4.2. OECD 318

Según los resultados obtenidos a partir de los estudios previos (OECD 105 y evaluación del tamaño de partícula) y la optimización de los equipos, se aborda el objetivo principal de este TFM: El desarrollo de la guía 318¹⁰ para la caracterización de las propiedades nanométricas del SODASIL[®]P95, a través de la determinación de la estabilidad dispersiva del material en medios ambientes simulados.

Es el primer ensayo estandarizado para nanomateriales, donde se compara la estabilidad dispersiva del material en el tiempo en condiciones ambientales, relevantes y representativas, a través de la determinación de la concentración del silicio en el sobrenadante de las diferentes dispersiones preparadas durante un máximo de 6 horas, aunque para este TFM se propone una toma de muestra adicional a las 24 horas de reacción. El objetivo de esta guía es desarrollar un procedimiento estandarizado ecotoxicológico para el SODASIL[®]P95 y poder evaluar el destino final de este material en medios ambientes acuosos. El protocolo OECD 318 simula las condiciones ambientales de una amplia gama de aguas naturales (90-95% del agua natural fresca). Para ello se utilizan diferentes concentraciones de electrolito ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), distintos pH (4-7-9) y la ausencia o presencia de materia orgánica disuelta (NOM). Los experimentos propuestos con las condiciones establecidas se resumen en el Esquema 5.

Las variables establecidas por el OECD 318 son las siguientes:

Test con NOM				
pH	Ca(NO ₃) ₂ mM			Total (muestras)
	0	1	10	
4	3X	3X	3X	9
7	3X	3X	3X	9
9	3X	3X	3X	9

Test con NaHCO₃ (5mM)				
pH	Ca(NO ₃) ₂ mM			Total (muestras)
	0	1	10	
4	3X	3X	3X	9
7	3X	3X	3X	9
9	3X	3X	3X	9

Esquema 5- Experimentos del OECD 318

- Medio alternativo: Las proporciones de aniones y cationes más representativos que se encuentran en los medios acuosos naturales son $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 4:1 y $\text{NO}_3^-/\text{SO}_4^{2-}$. El método establece el $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ como electrolito seleccionado y éste se usa en 3 concentraciones diferentes (0, 1, 10 mM). El $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ está en una mayor proporción en las aguas y el catión Ca^{2+} tiene un mayor efecto de agregación en comparación con otros cationes monovalentes y trivalentes.
- pH: Se establecen 3 pHs distintos: 4, 7 y 9, para evaluar el material en diferentes medios. Ya que el pH puede modificar la polaridad de la carga superficial de las

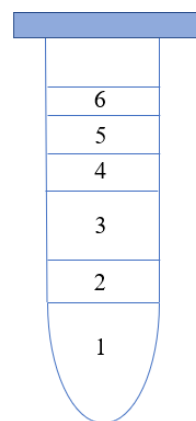
partículas y modificar las repulsiones electrostáticas. Para emular los pHs se preparan 2 disoluciones de 0,01M de HNO₃ y 0,1 M NaOH.

- Concentración de materia orgánica disuelta (DOM): Para representar los sistemas ambientales acuáticos reales se utiliza una materia orgánica disuelta, que emule las posibles interacciones del SODASIL®P95 frente a los contaminantes. Por ello se realiza el experimento por duplicado para comparar la presencia y ausencia del DOM. Cabe esperar que la presencia del DOM cambie la polaridad de la partícula y acompleje el Ca²⁺, aumentan la estabilidad de la dispersión disminuyendo el proceso de sedimentación. Para ello se preparará una disolución stock de 200 mg/L a partir de un patrón de referencia certificado propuesto ya por la misma guía, el 2R101N Suwanne River NOM. Y como propuesta alternativa a la presencia del DOM, se prepara una disolución de 0,1M de NaHCO₃.
- Concentración de las partículas: El OECD 318 propone una disolución stock de de 0,5-5 · 10¹² partículas/L del material. Este factor es clave para poder estimar el número de colisiones entre partículas y la velocidad de aglomeración del proceso. Para ello se prepara una disolución stock del SODASIL®P95 de 5 g/L.

Los experimentos se realizan por triplicado como se muestra en Esquema 5 y se preparan en unos viales de reacción graduados de propileno de 50mL

Se añaden los volúmenes correspondientes de todos los reactivos en el siguiente orden:

1. Se añade 20 mL de la disolución stock de SODASIL®P95.
2. Dependiendo de la matriz del medio:
 - a. Se añade 2 mL de 0,1M NaHCO₃
 - b. Se añade 2 mL de la disolución de stock del DOM
3. Se añaden los mL necesarios para obtener una concentración de 0 o 1 o 10 mM de Ca(NO₃)₂.
4. Se enrasa el vial con agua miliQ hasta 35 mL.
5. Se ajusta el pH establecido utilizando HNO₃ o NaOH.
6. Se enrasa el vial con agua miliQ hasta 40 mL
7. Finalmente, se le aplica ultrasonidos durante 30s con una potencia aproximada de 50W, utilizando para ello un Ultrasons P Selecta, serie 0448356.



V_T = 40mL

Por último, se dejan reposar los viales de reacción en una superficie plana, a temperatura y presión ambiente (22°C y 1 atm) y se va tomando 1 mL del sobrenadante de todos los

viales. La toma de muestra es decisiva y debe ser tomada de la parte superficial del vial, para minimizar el impacto en el vial.

Todas las alícuotas son tratadas con una digestión ácida a través de un bloque digestor. Para ello se añade 5mL de HF y 15 mL de H₂O y se calienta en el bloque digestor a 90°C durante aproximadamente 6 horas. Por último, una vez enfriado el vial se enrasa con agua miliQ y se lleva a un volumen final conocido de 25 mL.

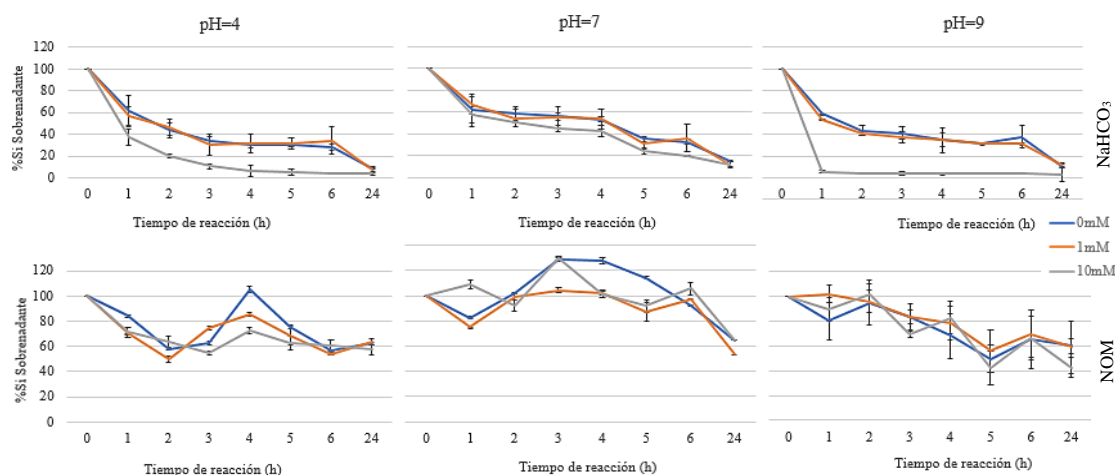
Entonces se determina la concentración de silicio en los viales mediante ICP-OES bajo las condiciones optimizadas en el anexo A. Los resultados se interpolan en dos rectas de calibración de 5-150 ppm de Si o de 0,5-50 ppm de Si, preparadas a partir de un patrón monovalente de Silicio comercial (Anexo A).

Todo esto nos ayudará a conocer cuál es estabilidad de dispersión del material en los medios de reacción propuestos a través de la concentración de silicio determinada.

El OECD 318 establece como una alta estabilidad de la dispersión cuando $\geq 90\%$ del material permanece en suspensión en el sobrenadante a lo largo de 6 horas de reacción. En cambio, define como una baja estabilidad de la dispersión cuando $\leq 10\%$ de la concentración inicial permanece en el sobrenadante.

A través de este estudio eco-toxicológico se pretende conocer la estabilidad de dispersión del nanomaterial para poder evaluar el impacto de éste en medios acuosos reales. Al igual que con la solubilidad determinada en el OECD 105, una alta estabilidad de dispersión favorece la presencia del nanomaterial en suspensión favoreciendo la difusión en medios acuosos. Por ello conocer las condiciones ambientales que minimicen esta posibilidad son vitales para minimizar el impacto en el medio ambiente y conocer sus posibles efectos. Y por el contrario, conocer las condiciones ambientales en las que se favorezca la aglomeración/agregación del material, disminuyendo su presencia en la columna de agua. Puede ayudar a establecer un protocolo de actuación en caso de encontrarlo en el medio ambiente, mejorando la seguridad química del material.

La metodología utilizada y los resultados obtenidos más extensos se encuentran descritos en el anexo D. Los resultados globales conseguidos a través del OECD 318 se muestran en la Gráfica 8.



Gráfica 8- Resultados OECD 318

4.2.1. Resultados del OECD 318

Finalmente, a la luz de los datos experimentales obtenidos y según la clasificación establecida por el OECD 318¹¹, podemos decir que a pH 4, en presencia de NaHCO₃, con una alta concentración de electrolito y transcurridas 6 horas el SODASIL®P95 tiene una baja estabilidad de dispersión. Pero con una baja o nula concentración de electrolito (0-1 mM Ca(NO₃)₂) tiene una baja/intermedia estabilidad de dispersión.

A pH 7 y pH 9 con NaHCO₃ tiene una baja/intermedia estabilidad de dispersión.

Y en cambio, todas las muestras con NOM presentan una alta/intermedia estabilidad de dispersión, aumentando así la posible biodisponibilidad de las nanopartículas en la columna de agua de medios acuosos.

Las condiciones ideales en las cuales encontraríamos el Si en una baja proporción en ecosistemas acuosos sería a pH alcalinos, con una alta concentración en sales y una baja presencia de materia orgánica.

Como se puede comprobar con el estudio, conforme aumenta el pH la velocidad de sedimentación es superior. Según los resultados obtenidos en la primera hora de reposo a pH 9 (con NaHCO₃) con una mayor concentración de electrolito solo queda un 6% de Si inicial en el sobrenadante frente a la concentración inicial. En cambio, para pH 4 (con NaHCO₃), el 36% de Si todavía está en el sobrenadante. Una disminución del pH conduce a la neutralización o inversión de la carga superficial y por lo tanto, a la disminución de la adsorción de los cationes.¹²

Esta tendencia a pH altos se da por igual cuando tenemos NOM en el medio de reacción, es decir, la precipitación y la aglomeración de la sílice está favorecida.

Si analizamos los resultados desde otro punto de vista: desde la concentración de electrolito presente observamos que conforme aumenta la concentración de éste, más

rápido precipita el compuesto. Esto concuerda con lo anteriormente predicho, el Ca^{2+} tienden a desestabilizar la dispersión y aumentar la agregación. Los electrolitos tienden a desestabilizar las dispersiones de partículas al comprimir la doble capa eléctrica a medida que aumenta la concentración de electrolitos. La barrera energética se reduce hasta el punto que la energía cinética de estas partículas condiciona la cinética de agregación de éstas.¹² Así mismo también si tenemos en cuenta el movimiento browniano, más partículas en un mismo espacio de volumen da lugar a más colisiones, lo que resultaría en una agregación más rápida.¹⁴

Sin embargo, los resultados obtenidos con el NOM nos indica que el SODASIL®P95 puede adsorberse en la superficie de las nanopartículas o coprecipitarse durante la agregación de nanopartículas. Por lo que la materia orgánica va a provocar una mayor dispersión de la disolución, ya que va a impedir que el producto se aglomere, se agregue y precipite.

La utilización de la materia orgánica natural (NOM) frente al NaHCO_3 va a hacer que el SODASIL®P95 quede suspendido por más tiempo y ni a lo largo de las 24 h de reacción va a llegar a porcentajes de Si tan bajos como obteníamos con el NaHCO_3 .

En presencia del NOM las concentraciones no disminuyen progresivamente, esto podría explicarse debido a que la interacción de la sílice con la materia orgánica no fuera lineal y existiera un gradiente de concentración en el vial.

5. CONCLUSIONES

A través de los diferentes estudios realizados se ha podido conocer en más profundidad el SODASIL®P95, producto fabricado en IQE, y se ha podido caracterizar de una forma más precisa la parte nanométrica de este producto.

A través del estudio OECD 105 se determinó que el SODASIL®P95 es un material poco soluble, que alcanza su máxima solubilidad a las 72 horas con agitación constante. La solubilidad obtenida representa un 0.50% (254,1 ppm) de la concentración inicial de la muestra, 50g/l, trabajando a temperatura ambiente y al pH natural de producto (pH =9,8). Se ha presentado un completo estudio sobre la distribución de tamaño de partícula del SODASIL®P95 combinando diferentes técnicas de medida y preparación, buscando conocer y cuantificar su fracción nanométrica. Para conseguir obtener una suspensión con solo material nanométrico se ha necesitado realizar una centrifugación de 2000 G durante 300 minutos, retirando fracciones de tamaño superior y separando únicamente partículas

con un diámetro de partícula medio de 92 nm y obteniendo una concentración inferior al 3-4% de la carga inicial de, 15 g/l. El uso combinado de la centrifuga, ICP-OES, LS, DLS y SEM ha permitido caracterizar la fracción nanométrica del material. También se han obtenido interesantes conclusiones sobre las limitaciones del uso de las técnicas de medida de tamaño de partícula de forma individual.

Los resultados del OECD 318 mostraron que el SODASIL[®]P95 tiene una baja o intermedia estabilidad de dispersión bajo la presencia de NaHCO₃ transcurridas 6 horas. En cambio, si en el medio existe materia orgánica (NOM) la estabilidad de la dispersión aumenta, permaneciendo estable. En esas condiciones se categoriza al material como un material de una alta estabilidad de dispersión.

También se ha demostrado que en medios donde hay una alta concentración de sales y pHs alcalinos la estabilidad de dispersión del SODASIL[®]P95 disminuye, favoreciendo su precipitación.

Con estas propiedades físico-químicas se puede predecir de forma más exacta el alcance de la descarga de uno de los nanomateriales de mayor producción, el silicato de aluminio y sodio (NAS), en el medio ambiente. Se ha demostrado que las nanopartículas son sistemas complejos, por lo que aunque se busquen procedimientos estandarizados que midan la seguridad desde diferentes puntos de vista, como son los protocolos OECD 318 y OECD 105, muchas veces se requieren interpretaciones o adaptaciones según las propiedades de los materiales.

Es indispensable seguir evaluando el riesgo de los materiales a través de una correcta caracterización fisicoquímica, ecotoxicológica y toxicológica. Nuevos protocolos para reforzar el aseguramiento de la seguridad de los productos industriales serán necesarios para facilitar este trabajo.

6. REFERENCIAS

1. European Commission. Guidance on the protection of the health and safety of workers from the potential risks related to nanomaterials at work - Guidance for employers and health and safety practitioners. Published online 2013:63.
2. Inicio - ECHA. Accessed July 12, 2021. <https://echa.europa.eu/es/home>
3. Comisión Europea. Recomendación de la Comisión de 18 de Octubre de 2011

- relativa a la definición de nanomaterial. *D Of la Unión Eur.* 2011;696/EU(2005):275/38-275/40.
4. European Commission. *Commission Staff Working Paper: Types and Uses of Nanomaterials, Including Safety Aspects.*; 2012.
 5. SRI INTERNATIONAL. SRI International – American Nonprofit Research Institute. Accessed October 29, 2021. <https://www.sri.com/>
 6. Rauscher H, Mech A, Gibson N, et al. *JRC SCIENCE FOR POLICY REPORT: Identification of Nanomaterials through Measurements Identification of Nanomaterials through Measurements.* Publications office of the european union; 2019. doi:10.2760/053982
 7. K.Iler R. *The Colloid Chemistry of Silica and Silicates.* First edit. Cornell university press; 1955.
 8. Abdolahpur Monikh F, Praetorius A, Schmid A, et al. Scientific rationale for the development of an OECD test guideline on engineered nanomaterial stability. *NanoImpact.* 2018;11(December 2017):42-50. doi:10.1016/j.impact.2018.01.003
 9. ECHA. Silicic acid, aluminum sodium salt-Registration Dossier. Accessed October 29, 2021. <https://echa.europa.eu/es/registration-dossier/-/registered-dossier/15116/7/3/1>
 10. OECD. Water Solubility. *Dict Geotech Eng Geotech.* 2014;(July):1512-1512. doi:10.1007/978-3-642-41714-6_230714
 11. OECD. Dispersion Stability of Nanomaterials in Simulated Environmental Media. *Oecd Guidel Test Chem.* 2017;(October):1-4. http://biotecnologiebt.com/guide/OECD_227.pdf
 12. Christian P, Von der Kammer F, Baalousha M, Hofmann T. Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. *Ecotoxicology.* 2008;17(5):326-343. doi:10.1007/s10646-008-0213-1
 13. More S, Bampidis V, Benford D, et al. Guidance on technical requirements for regulated food and feed product applications to establish the presence of small particles including nanoparticles. *EFSA J.* 2021;19(8). doi:10.2903/j.efsa.2021.6769
 14. Kim I, Taghavy A, DiCarlo D, Huh C. Aggregation of silica nanoparticles and its impact on particle mobility under high-salinity conditions. *J Pet Sci Eng.* 2015;133:376-383. doi:10.1016/j.petrol.2015.06.019

ANEXO A: Métodos analíticos utilizados para el control de calidad del producto

La caracterización fisicoquímica del SODASIL®P95, así como la mayoría de los silicatos y sílices amorfas se lleva a cabo de la siguiente manera¹:

1. Determinación de la humedad del producto sólido

Se determina la humedad del SODASIL®P95 controlando la pérdida de peso a una temperatura constante de 105°C y ésta se expresa en porcentaje frente al peso inicial. Se usa la termobalanza Mettler Toledo, HE73 (Imagen 7).

El procedimiento consiste en pesar en la termobalanza alrededor de 2,5 g de SODASIL®P95 y se somete a 105°C durante 10 minutos. Una vez finalizado el tiempo muestra los datos de humedad en porcentaje.

El método analítico sigue la norma ISO 787-2: “General methods of test for pigments and extenders- Part 2: Determination of matter volatile at 105 degrees C”.



Imagen 7- Termobalanza Mettler Toledo HE73

2. Determinación de la conductividad en agua

Los iones presentes en el agua conducen la electricidad proporcionalmente a su concentración para concentraciones lo suficientemente bajas.

El procedimiento consiste en pesar 5 g de SODASIL®P95 y añadir agua hasta 100 g. Se agita la disolución y se introducen los electrodos de medida. Cuando se estabiliza la lectura muestra un valor de conductividad en milisiemens.

Se utiliza un conductímetro de Thermo Scientific, Orion Star A212 (Imagen 8).



Imagen 8- Conductímetro Thermo Scientific

El método analítico sigue la norma ISO 7888: “Water quality-Determination of electrical conductivity”

3. Determinación del pH

Para determinar el pH se utiliza un electrodo sensible a protones ya que la diferencia de potencial es proporcional a la concentración de los mismos en el medio.

El procedimiento consiste en tomar 5 g de SODASIL®P95 y añadir agua hasta los 100 g.

Se agita la disolución y se introduce el electrodo de pH conectado a un pHmetro calibrado (Imagen 9) y se toma el valor de pH una vez se ha estabilizado el valor de medida.

El método analítico sigue la norma ISO 787-9:2019: “General methods of test for pigments and extenders - Part 9: Determination of pH value of aqueous suspension”.



Imagen 9- pH meter Crison

4. Determinación de la absorción de Dioctiladipato (DOA)

Sirve para determinar la capacidad de absorción de líquidos no polares del SODASIL®P95. Los silicatos amorfos y sílices se caracterizan por su alta capacidad de absorción.

Para ello se pesan 12,5 g del producto, se introduce en la cámara de mezclado y se cierra. Seguidamente se coloca la bureta encima de la cámara de mezclado y se pone en marcha el absortómetro. Éste adiciona 4 mL por minuto y amasa la mezcla a 125 rpm. La cámara de mezclado está formada por unas palas que controlan el torque al girar.

El torque se va incrementando conforme se añade DOA, pero cuando supera los 1000 mN·m y alcanza su máximo, el limitador detiene tanto la bureta de adición como el amasado. El volumen añadido dividido por la masa del SODASIL®P95 en la cámara es el volumen absorbido. Para dicho cálculo se utiliza el software del absortómetro HITEC (Imagen 10) que da el valor de absorción de DOA en mL/100 g de producto.

El método analítico sigue la norma ISO 19246:2016: “Rubber compounding ingredients-Silica- Oil absorption of precipitated silica”.



Imagen 10- DBP absortómetro

5. Determinación de la superficie específica BET

Se determina la superficie específica accesible a la molécula de nitrógeno en el SODASIL[®]P95 a una temperatura de 77,35K utilizando la aproximación matemática de Brunauer-Emmet-Teller (BET).

Se puede considerar el método BET como una adsorción física, al ser las fuerzas de atracción de Van der Waals las responsables de la adsorción del nitrógeno sobre la superficie. Este método se considera un método indirecto de cálculo de tamaño de partícula elemental ya que las moléculas de nitrógeno forman una monocapa sobre las partículas elementales del material.

Para obtener el valor del área de BET se llevan a cabo los siguientes pasos:

- Primero se pesa $0,2000 \text{ g} \pm 0,0020 \text{ g}$ y se desgasifica a 200°C durante 45 minutos con un flujo continuo de nitrógeno.
- Una vez desgasificado se deja enfriar a temperatura ambiente
- A continuación, se introduce en el puerto de análisis y se determina la cantidad de nitrógeno que adsorbe a diferentes presiones relativas.
- La medida se lleva a cabo a través del equipo TriStar II Plus (Imagen 11) que



Imagen 11- BET micromeritics TriStar II PLUS

proporciona directamente el valor de área BET.

El método analítico sigue la norma ISO 5794-1:2010: “Rubber compounding ingredients- Silica, precipitated, hydrated -Part 1: Non-rubber tests”.

6. Determinación del tamaño de partícula

El tamaño de partícula y la distribución del tamaño de partícula secundario se determina a través del equipo Mastersizer 2000 Malvern (Imagen 12). La realización de la medida del SODASIL®P95 se lleva a cabo mediante vía húmeda. Se forma una suspensión del producto con ayuda de un agitador y, si lo requiere el estudio, se utiliza una sonda de ultrasonidos. Se pasa a través de unas lentes sobre las que se hace incidir un rayo láser que es dispersado por las partículas en función de su tamaño. La luz difractada es analizada y a través de un tratamiento matemático podemos obtener la distribución de tamaños de partícula.

El equipo nos proporciona los valores en % sobre todos los canales, la curva granulométrica (distribución de tamaño de partícula) y valores estadísticos como d50, d10, d90, moda, ...

Los parámetros optimizados introducidos en el SOP sobre las propiedades ópticas del SODASIL®P95 son:

- Índice de refracción: 1,65
- Índice de absorción: 1

Se utiliza como dispersante el agua (IR 1,33) y se elimina la etapa de ultrasonidos del método de medida, ya que dicha etapa podría modificar el estado de dispersión en el que se encontrara las partículas.

El método analítico sigue la norma ISO 13320:2020: “Particle size analysis- Laser diffraction methods”



Imagen 12 - Mastersizer 2000 Malvern

Como se ha descrito a lo largo del trabajo este tamaño se correlaciona con el tamaño del agregado seco, y depende de las condiciones de medida como es la sonicación de la disolución.

7. Determinación de la densidad compactada

Para calcular la densidad compactada se llena una probeta de 250 mL con SODASIL®P95, se anota la pesada, se lleva al volúmetro (Imagen 13) y allí se golpea la probeta 2500 veces.

Una vez finalizado se pesa de nuevo la probeta y se mide el volumen ocupado por el producto.

La densidad compacta se calcula mediante esta fórmula:

$$\rho \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{\text{peso del SODASIL®P95 en polvo (g)}}{\text{volumen del SODASIL®P95 en polvo (L)}}$$

El método analítico sigue la norma ISO 787-11:1981: “General methods of test for pigments and extenders -Part 11: Determination of tamped volumen and apparent density after tamping”.



Imagen 13 – Volúmetro Engelsmann AG

8. Determinación de la blancura

Se utiliza un colorímetro Dr.Lange. (Imagen 14) para medir las propiedades de luminosidad del SODASIL®P95. Para ello se coloca la muestra en una cubeta comprimiéndola hasta que no queden ni huecos ni sombras. Se realiza la medida por triplicado, desplazando en cada vez la cubeta y se toma constancia del valor del parámetro L.

El método analítico sigue la norma ISO 3262-1:2020 “Extenders -Specifications and methods of test – Part 1: Introduction and general test methods”



Imagen 14 - Colorímetro

9. Fluorescencia de Rayos X (FRX)

La fluorescencia de rayos X es una técnica espectroscópica que utiliza la emisión secundaria o fluorescente de radiación provocada al excitar una muestra con una fuente de radiación de rayos X.

La radiación incidente o primaria expulsa electrones de capas interiores del átomo. Los electrones de capas más externas ocupan los lugares vacantes y el exceso energético resultante de esta transición se disipa en forma de fotones, radiación X fluorescente o secundaria, con una longitud de onda característica que depende del gradiente energético entre los orbitales electrónicos implicados, y una intensidad directamente relacionada con la concentración del elemento en la muestra.

Esta técnica permite cuantificar la composición química del producto final con los porcentajes de SiO_2 , Al_2O_3 y Na_2O ; además de permitir análisis semicuantitativos y una valoración de impurezas por encima de 100 ppm. Para una correcta cuantificación es necesaria la preparación de rectas de calibrado propias para cada metal sobre matrices equivalentes.

Estas medidas se realizan en el Servicio de Difracción de Rayos X y Análisis por Fluorescencia del Servicio General de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Zaragoza (SAI-UNIZAR) en un espectrómetro secuencial de Fluorescencia de rayos X de Thermo Electron, serie ARL, modelo ASVANTXP, con un tubo de rayos X de Rodio (Rh).

Las muestras se preparan en IQE utilizando una perladora (Imagen 15). Se pesa un gramo del producto con 10 g borato de litio, se añaden 2 gotas de bromuro de litio (25% peso) y se calienta a 1000°C . Así obtenemos la perla lista para poder ser medida.



Imagen 15 – Perladora KATANAX

10. ICP-OES (Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy)

La espectroscopía de emisión atómica de plasma por acoplamiento inductivo es una técnica analítica utilizada para detección y cuantificación de elementos químicos. Para el

SODASIL®P95 en IQE existen métodos desarrollados para la cuantificación del Fe, Ti, Ca, K, Cr, Mn, Cu, Al, Si, Na, Zn y Zr mediante ICP-OES.

Para este trabajo ha sido necesario el desarrollo de un método analítico propio del silicio. En primer lugar, para la cuantificación en ICP-OES (Imagen 16) se debe atacar la muestra para asegurar que el analito de interés se encuentra en la forma adecuada para su cuantificación. El procedimiento de ataque, así como la preparación de patrones y la recta de calibración es otro de los puntos críticos en esta técnica.

Se introduce la muestra líquida con un caudal de 2 mL/min mediante el automuestreador automático Cetac Technologies ASX-280 que lleva la muestra a través de una bomba peristáltica al nebulizador. Allí mediante un flujo de argón y el efecto Benoulli la muestra se transporta hasta la punta del nebulizador, donde pasan a la cámara de nebulización (Esquema 6). Como consecuencia de la alta velocidad del gas el líquido se divide en gotas finas que llegan al interior de la antorcha, las gotas de mayor tamaño se descartan por la parte inferior de la cámara de nebulización². Está recubierta de teflón por el tratamiento ácido previo que llevan las muestras.

La antorcha está formada por 3 tubos concéntricos a través de los cuales fluye argón y se calienta hasta 10.000 K por la acción de una bobina de inducción. Los dos tubos concéntricos superiores están hechos de cuarzo y el tubo concéntrico interior está hecho de alúmina por la acidez de las propias muestras.

La muestra se atomiza y se excita mediante el plasma de argón que se forma dentro de una antorcha, la cual está rodeada por una bobina de inducción refrigerada y a su vez acoplada a una fuente de argón.

Cuando los átomos excitados vuelven a su estado fundamental emiten luz en forma de fotón, que es reflejada y recogida por un sistema Echelle, que llega al detecto de tipo CID (charge injection devices). Éste es capaz de detectar cualquier longitud de onda entre 165 a 1050 nm.

El ICP tiene un sistema de visión dual, que permite detectar la luz emitida en forma axial y/o radial, según las necesidades de la muestra. Esta indicado que las muestras con una concentración más alta en el metal seleccionado deben determinarse utilizando el modo radial.

Por último, el equipo está provisto de un software llamado QTegra, a través del cual se puede modificar las diferentes condiciones de trabajo del equipo y se puede realizar el tratamiento de datos.

El método analítico sigue la norma UNE-EN ISO/IEC 17025: “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración”. Y sigue las indicaciones propias del manual del equipo: iCAP 7000 Plus Series ICP-OES Operating Manual. BRE0004150 Revision B Noviembre 2016

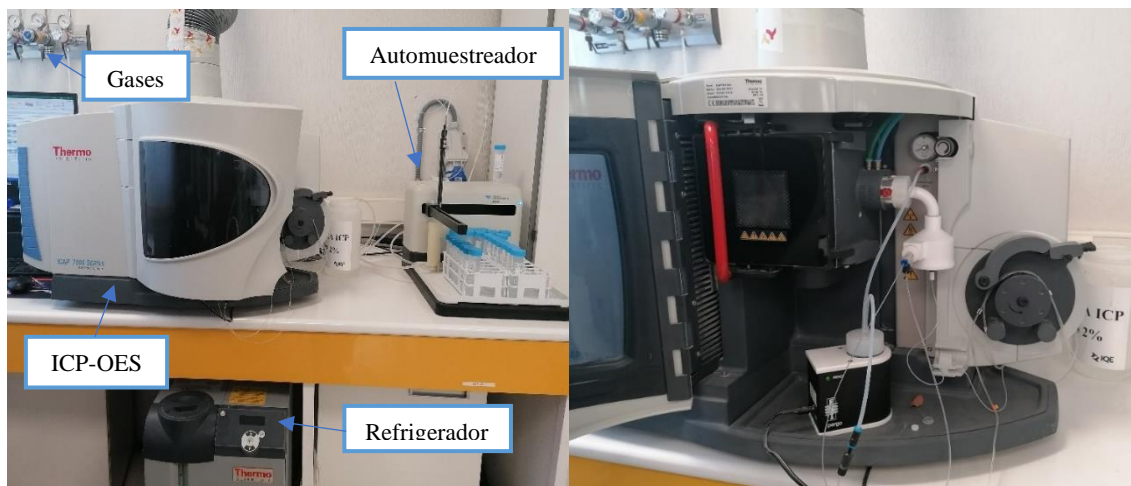
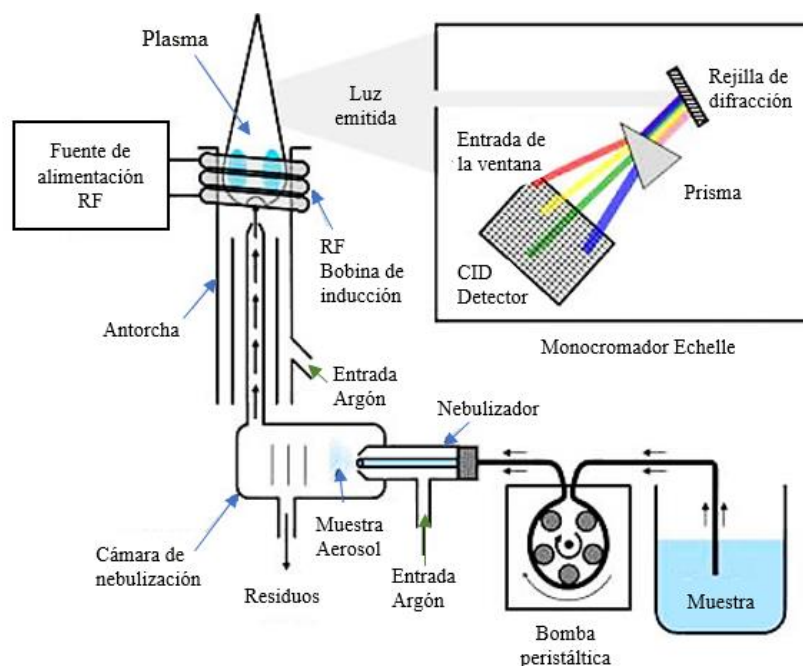


Imagen 16 – ICP-OES, ICAP 7000 Series



Esquema 6 – Funcionamiento del ICP-OES

○ **Límite de detección del equipo**

Se realizaron 10 medidas continuas (Tabla 4) del blanco alternadas con una concentración de Si de 5 ppm, preparada a partir del patrón de Si monovalente de 1000 ppm.

El límite de detección fue calculado conforme el libro de Espectroscopía de Absorción Atómica³ y resulta de una concentración de 0,497 ppm.

Este límite de detección no es constante ya que una fuente de incertidumbre de medida es la propia agua miliQ, ya que su concentración fluctúa diariamente. Por lo que el límite de detección del ICP-OES puede variar cada día de medida.

Los datos obtenidos fueron:

Lectura	Intensidad pico	Desviación	Desviación^2
1	12,796	0,051	0,003
2	12,627	-0,118	0,014
3	12,350	-0,394	0,155
4	12,365	-0,380	0,144
5	12,416	-0,329	0,108
6	12,424	-0,320	0,102
7	12,477	-0,267	0,071
8	12,235	-0,510	0,260
9	13,339	0,595	0,354
10	14,415	1,670	2,790

Tabla 3

$$LD = 2 \cdot \frac{\text{concentración patrón Si}}{\text{valor medio intensidad}} \cdot \sqrt{\frac{\sum(X - \bar{X})^2}{n}}$$

$$LD = 2 \cdot \frac{5,007}{12,744} \cdot \sqrt{\frac{4,002}{10}} = 0,497 \text{ ppm}$$

○ **Especificaciones equipo**

Tipo: Thermo Fisher Scientific ICAP 7000 Series

Automuestrador: Cetac Technologies ASX-280

Refrigerador: ThermoFlex 900 Recirculating Chiller

Software: Thermo Scientific Qtegra™ Intelligent Scientific Data Solution™ (ISDS)

○ **Patrón de referencia mono elemental**

Para la preparación de las rectas de calibrado se utiliza un patrón de silicio comercial de 1000 mg/L de la casa comercial Inorganic Ventures.

Esta empresa está acreditada según la ISO 17034 “Requisitos generales para la competencia de los productos de materiales de referencia”, también la ISO/IEC 17025 “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración” y además también cuenta con el certificado de la ISO 9001 “Requisitos para un sistema de gestión de la calidad”.

	Intensidad (cps)
Agua	3,684
P1	16,909
Agua	4,543
P1	17,325
Agua	4,854
P1	16,957
Agua	4,36
P1	16,459
Agua	3,829
P1	16,123
Agua	3,586
P1	15,907
Agua	3,38
P1	15,734
Agua	3,134
P1	15,262
Agua	2,921
P1	16,148
Agua	2,697
P1	16,926
Agua	2,326

Tabla 4

Descripción del producto

Código producto: Disolución de absorción atómica de analito único

Número del catálogo: AASI1

Número de lote: S2-SI707226

Matriz: tr HNO₃ / tr HF

Valor/Analito: 1000 µg/mL: silicio

Valores certificados e incertidumbres

Valor certificado: 1000 ± 10 µg/mL

Densidad: 1,003 g/mL (medido a 20 ± 4 °C)

○ Parámetros optimizados para la determinación del silicio

Analito: Silicio

Longitud de onda (λ): 251,611 nm

Intensidad relativa máximo: 600000cps

Caudal gas auxiliar (argón): 0,5 L/min

Plasma RF potencia: 1150W

Modo de medida: axial / radial (dependiendo de la concentración de medida)

Requisitos de intensidad de medida: antes de medir la recta de calibrado es necesario limpiar el circuito mínimo con dos medidas de agua y que la intensidad de éstas sea inferior a 3.000 cps.

Elementos del equipo: Se debe sustituir del ICP-OES el sistema de nebulización convencional por uno recubierto de teflón. Y a su vez el tubo concéntrico interno de la antorcha debe ser de alúmina en lugar de cuarzo. Para evitar toda contaminación posible.

Referencias

1. Información Interna Industrias Químicas del Ebro S.A.
2. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. *Principios de Análisis Instrumental*. Sexta edic. (González SC, ed.). Cengage Learning; 2008.
3. Herraiz LX. *Espectroscopía de Absorción Atómica*. Analíticas Europeas; 1987.

ANEXO B: OECD 105

1. Objetivo

La guía número 105¹ propuesta por la OECD también está incluida en los 150 métodos de ensayo acordados internacionalmente entre gobiernos, industrias y laboratorios independientes para identificar y caracterizar los peligros potenciales de las sustancias químicas. Este estudio está dentro de la sección 1, el cual cubre todas las propiedades fisicoquímicas. En concreto el OECD 105 describe el método para determinar la solubilidad en agua de una sustancia. También la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) utiliza esta guía² para medir la solubilidad de los materiales y los clasifica como muy soluble, totalmente soluble, soluble, moderadamente soluble, ligeramente soluble, muy poco soluble o insoluble. Y define el concepto de solubilidad como la proporción de soluto en un disolvente bajo las condiciones de equilibrio.

Siguiendo esta guía se determina cuál es el tiempo necesario para lograr la saturación de la disolución, a través de la determinación de la concentración de silicio en el sobrenadante a diferentes tiempos de agitación. Usando para ello el ICP-OES (Espectroscopía de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo) bajo las condiciones optimizadas.

Este método fisicoquímico se utiliza normalmente para explicar el efecto eco-toxicológico y toxicológico de las sustancias. Todo material con una alta solubilidad entra en el cuerpo humano y, a través de un proceso natural de eliminación, éste es expulsado evitando su bioacumulación. En nanomateriales además de la solubilidad se considera necesario evaluar la evolución de las suspensiones, por lo que se ha propuesto también el OECD 318 para completar la caracterización.

Para la evaluación de la solubilidad se utiliza el SODASIL[®]P95, se realiza con las condiciones naturales del material a $20 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y pH en torno a 9,8.

2. Metodología

Se preparan 5 disoluciones con una concentración aproximada de 50 g/L de SODASIL[®]P95. Se disuelve homogéneamente con ayuda de un baño de ultrasonidos (Ultrasons P Selecta, serie 0448356) durante 1 minuto con una potencia de 50W.

Se pone en agitación progresivamente las 5 disoluciones a 300 rpm hasta un máximo de 120 horas de agitación, utilizando un agitador orbital IKA[™] 0002980000 (Imagen 17).



Imagen 17 - Agitador orbital IKA™ 0002980000

Para ello el día 1 del experimento se ponen a agitar la disolución 1C, 1D y 1E, 24 horas más tarde se pone la disolución 1B y 24 horas más tarde se pone la disolución 1A. El día 4 del experimento se cuantifica las disoluciones 1A, 1B y 1C, éstas llevarán una agitación de 24 h, 48h y 72h. El día 5 se cuantifica la disolución 1D con un tiempo de agitación de 96 h y el día 6 se determina la disolución 1E con un tiempo de agitación de 120 horas.

		DÍAS					
		1	2	3	4	5	6
DISOLUCIONES	1A			X	O		
	1B		X	X	O		
	1C	X	X	X	O		
	1D	X	X	X	X	O	
	1E	X	X	X	X	X	O

X Agitación
 O Cuantificación

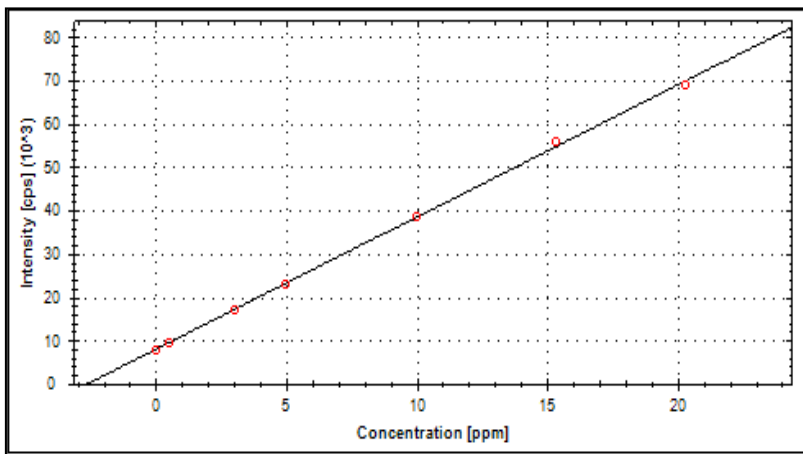
Esquema 7- Experimentos del OECD 105

Una vez pasado el tiempo de agitación pautado se centrifuga a 4000 rpm durante 5 minutos. Luego se pasa por dos filtros de membrana, el primero de 0,45 µm de nylon y luego por otro de 0,2 µm de nylon. Y posteriormente se toman los correspondientes volúmenes. Para las disoluciones 1A, 1B y 1C se toma un volumen de alícuota de 2,5 g del sobrenadante y para las disoluciones 1D, 1E un volumen de 1,25 g. Todas las alícuotas se llevan a un volumen final de 25 mL y se determina su concentración a través del ICP-OES.

Las muestras líquidas se introducen en el equipo mediante un automuestreador automático y un nebulizador que convierte el líquido en un aerosol. El plasma de argón excita los átomos y las emisiones de éstos se direccionan mediante un sistema óptico, basado en un policromador que los lleva al detector CID (capaz de detectar λ entre 165-1050 nm). Se obtienen así los espectros de emisión del Si y a través del software del equipo se integra el área de los picos de emisión y se cuantifica la concentración del Si de las muestras.

La solubilidad es un parámetro dependiente del pH. En este ensayo no hay control de este parámetro, por lo que el valor del pH es el generado por la muestra. Se controla con el equipo descrito en la parte experimental obteniéndose valores en el entorno de $9,8 \pm 0,1$.

3. Resultados



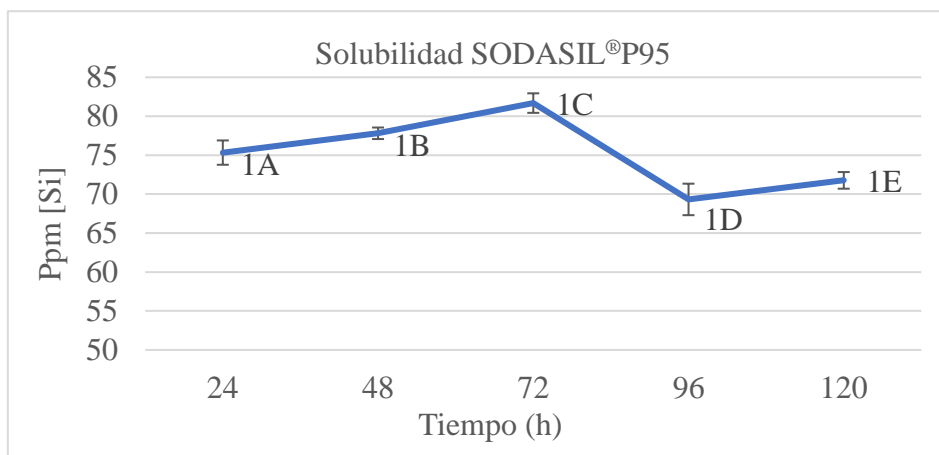
$$y = 3046,950x + 8006,606$$

$$R^2 = 1$$

Gráfica 9 – Recta de calibrado de 0,5-20 ppm

Las intensidades de emisión obtenidas se interpolan dentro de una recta de calibrado de 0,5 - 20 ppm (Gráfica 9). La recta de Si se prepara a partir de un patrón de referencia comercial de silicio (Anexo A).

Los valores obtenidos se muestran en la Gráfica 10 y Tabla 5.



Gráfica 10- Solubilidad SODASIL®P95

Disoluciones	Ppm [Si] medido	± IC	Intensidades [cps](10 ³)	Tiempo de agitación (h)	Muestras Sodasil P95 [g/L]
1A	75,331	1,561	23,577	24	50,008
1B	77,811	0,740	24,402	48	49,999
1C	81,688	1,254	26,784	72	50,278
1D	69,319	2,024	10,492	96	50,118
1E	71,765	1,068	10,697	120	50,053
Blanco	2,131	0,062	6,493	-	-

Tabla 5 – Resultados OECD 105

Como se puede observar, las concentraciones de silicio son muy similares en todos los experimentos. Se obtiene una concentración máxima de 81,688 ppm de Silicio a las 72 horas de agitación, que representa un 0,50 % de silicio frente a la disolución de stock de 50,278 g/L que tiene 16.477,037 ppm de silicio.

4. Ampliación del OECD 105

Se realizan dos modificaciones del procedimiento normalizado anteriormente descrito:

- a. Para comprobar la concentración total de silicio de las muestras se modifica el tratamiento de muestra y se procede a la digestión ácida de la muestra.
- b. Se realiza la comparativa de dos rectas de calibrado hechas con patrón de silicio monovalente, pero con diferente disolvente. En una de ellas se utiliza blanco de digestión y en la otra se utiliza agua miliQ.

4.1. Tratamiento de muestra

Se preparan por igual 5 disoluciones con una concentración nominal de 50 g/L de SODASIL[®]P95 y se ponen en agitación progresiva.

Una vez pasado el tiempo de agitación establecido, se filtra el sobrenadante, se toma 1mL de éste y se realiza una digestión ácida a través del bloque digestor. Para ello se añade 5 mL de HF, 15 mL de H₂O y se pone en el bloque digestor a 90°C durante aproximadamente 6 horas.

Se realiza el experimento por duplicado y se enrasan todas las muestras a 25 mL.

4.2. Determinación del Si

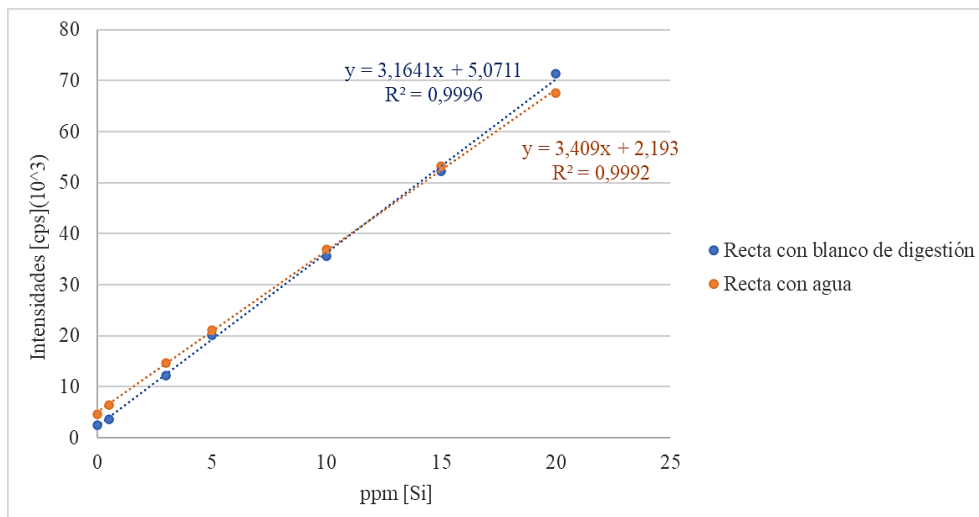
Se cuantifica el mismo analito, con las mismas condiciones optimizadas descritas en el Anexo A sobre el ICP-OES.

Pero esta vez para comprobar si hay efecto matriz de la muestra y podemos minimizar fuentes de errores. Se realiza la comparativa de una recta realizada con patrón

monovalente y agua miliQ, frente a una recta realizada con patrón monovalente y blanco de digestión.

4.3. Resultados ampliación del OECD105

Las rectas obtenidas realizadas con blanco de digestión y agua miliQ, son las siguientes:



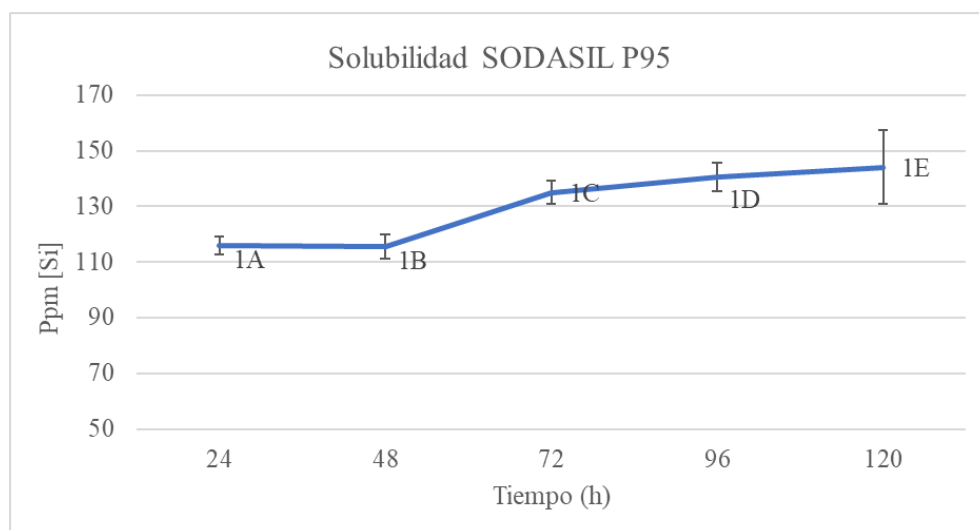
Gráfica 11 – Rectas de calibrado del OECD 105

Como podemos comprobar la regresión de las rectas es prácticamente igual, no hay apenas diferencias entre las pendientes y los coeficientes de regresión son buenos.

Podemos afirmar que no existen diferencias entre los resultados obtenidos con una recta y otra. El efecto matriz en los resultados obtenidos es mínimo.

Por lo que se establece como la recta realizada con patrón de Si monovalente y agua, como la recta predilecta para todas las medidas.

Por otro lado, los resultados obtenidos tras la digestión de la muestra se representan en la Gráfica 12 y la Tabla 6 .



Gráfica 12- Resultados OECD 105 tras la digestión ácida de la muestra

Disoluciones	Ppm [Si] medido	± IC	Intensidades [cps](10 ³)	Tiempo de agitación (h)	Muestras Sodasil P95 [g/L]
1A	117,190	3,105	15,060	24	48,908
1B	116,817	4,409	15,046	48	49,939
1C	136,244	4,135	17,474	72	49,719
1D	141,772	5,139	18,271	96	49,502
1E	145,396	13,364	18,784	120	50,137
Blanco	1,235	0,019	2,823	-	-

Tabla 6 – Valores del OECD 105 tras la digestión ácida de la muestra

El tercer día de agitación las disoluciones se estabilizan prácticamente en su totalidad, en los dos últimos 2 días la concentración de silicio en el sobrenadante no aumenta significativamente.

5. Conclusiones

El estudio descrito en este Anexo también fue realizado en un laboratorio externo, incluyendo adicionalmente medidas de Na y Al₂O₃.

Estos resultados son los siguientes (Tabla 7):

Sustancia	Método	Conc. [$\frac{mg}{L}$]	Conc. media [$\frac{mg}{L}$]	Desviación estándar [$\frac{mg}{L}$]	DSR [%]	Conc. [$\frac{kg}{m^3}$]
SiO ₂	ICP-OES	167,3	167,4	4,1	2,4	0,167
	Fotometría	167,6				
Na	ICP-OES	159,9	159,9	3,2	2	0,16
Al ₂ O ₃	ICP-OES	<0,019	<0,019	-	-	< 1,9 · 10 ⁻⁵

Tabla 7 – Resultados del OECD 105 realizados por un laboratorio externo

Estas medidas de solubilidad fueron realizadas a temperatura ambiente (22°C) y en un rango de pH de 9,8.

Referencias

1. OECD. Water Solubility. *Dict Geotech Eng Geotech*. 2014;(July):1512-1512. doi:10.1007/978-3-642-41714-6_230714
2. More S, Bampidis V, Benford D, et al. Guidance on technical requirements for regulated food and feed product applications to establish the presence of small particles including nanoparticles. *EFSA J*. 2021;19(8). doi:10.2903/j.efsa.2021.6769

ANEXO C: Evaluación del tamaño de partícula

1. Objetivo

El estudio sobre la evaluación del tamaño de partícula es el segundo estudio previo propuesto, que tiene como objetivo caracterizar el tamaño de partícula de unas dispersiones de SODASIL®P95 sometidas a diferentes condiciones experimentales.

La determinación del tamaño de partícula en silicatos y sílices precipitadas se realiza principalmente con la técnica de difracción láser (LS o ALS) según el procedimiento descrito en el Anexo A. Esta técnica presenta limitaciones y sus resultados han sido cuestionados en las evaluaciones de seguridad por infravalorar la fracción nanométrica.

Las limitaciones principales de la técnica de difracción láser son dos:

- La forma de transportar las partículas hacia el láser genera cambios en el tamaño original. En este trabajo se ha utilizado una técnica por vía húmeda con agitación y sonicación previa, que es la más comúnmente utilizada en medidas ALS.
- La difracción láser posee un rango de medida que para algunos materiales es pequeño al rango real utilizado para el producto. El rango de medida señalado por el fabricante es de 100 nm a 200 000 nm, aunque se observará que para valores inferiores a 800 nm los valores obtenidos presentan una pérdida de sensibilidad.

Experimentalmente se preparan dos disoluciones de SODASIL®P95 y se sonicán de forma controlada, una de ellas de forma muy intensa y la segunda con una sonicación más suave.

El material se caracteriza de forma paralela con una segunda técnica de determinación de tamaño de partícula, por dispersión de luz dinámica o difracción DLS. Es una técnica más sensible en el rango nanométrico, con un rango de 1 nm – 10 000 nm según el fabricante. Esta técnica no permite la sonicación durante el proceso de medida y, por lo tanto, está limitada ante los procesos de decantación propios del material. Para eliminar las incertidumbres generadas por la decantación natural del producto se realiza un proceso de sedimentación acelerada utilizando una centrífuga con control de velocidad.

El sobrenadante de las dispersiones de SODASIL®P95 sometidas a una sedimentación acelerada se han caracterizado en paralelo mediante un equipo de difracción láser por vía húmeda (LS), un equipo de dispersión dinámica de luz (DLS) y un equipo de espectroscopía de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES).

Por otro lado, algunas disoluciones se han analizado mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) para validar las conclusiones.

La sedimentación acelerada va a permitir separar el material en función de su tamaño, quedando el material de mayor tamaño en el fondo y en el sobrenadante aquellas partículas con tamaño menor, facilitando las medidas de difracción DLS.

2. Metodología

Se prepara una disolución stock de SODASIL®P95 al 1,5 % en peso. Un determinado volumen de esta disolución se sonica aplicando una energía de 100 W·s/mL, otro volumen se sonicará de forma intensa hasta 2000 W·s/mL (Esquema 8). Para ello se emplea un dispositivo ultrasónico digital de HIELSCHER, modelo UP400St (Imagen 18), según los parámetros de la tabla adjunta:

Producto	Concentración (%)	Volumen (mL)	Tiempo (min)	Intensidad ($\frac{W}{cm^2}$)	Energía total aportada (W·s)	Energía específica ($\frac{W \cdot s}{mL}$)
SODASIL®P95	1,50	250	3	92	25 000	100
		125	31	87	250 000	2 000

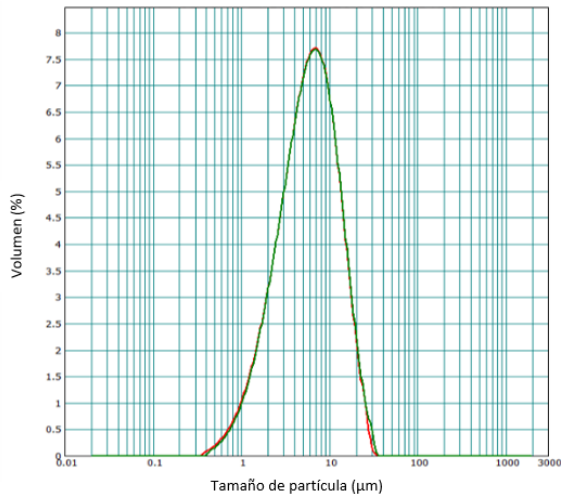
Esquema 8 – Parámetros establecidos para la sonicación de las disoluciones de stock

a. Reacondicionamiento de muestras

Antes de realizar cualquier tipo de tratamiento, las dispersiones sonicadas son reacondicionadas para asegurar la homogeneidad de la dispersión, ya que la tendencia natural del material es la decantación. Se colocan 250 mL de muestra en un vaso de precipitado de 400 mL (7,5 cm de diámetro), de tal manera que el sonotrodo queda sumergido a una profundidad de 5 cm. Y se sonica la muestra aportando una energía específica de 35 W·s/mL, con una potencia promedio de 156 W, durante aproximadamente 1 minuto.

El equipo LS (Malvern 2000) posee una cubeta de preparación con una mínima agitación para garantizar la homogeneidad del producto en agua, así como un pequeño sonotrodo para aportar ultrasonidos. Los grados de sonicación en este estudio son mayores a los aplicados de forma estándar. En la figura inferior aparece la distribución de tamaño del SODASIL®P95 en un control de calidad según el procedimiento descrito en el Anexo A por difracción láser (LS). También se muestra un tamaño de partícula medio de 5,509 μm, así como una ausencia de partículas por debajo de 300 nm.

La distribución propia de tamaño del SODASIL®P95 es la que se muestra en la gráfica (Gráfica 13).

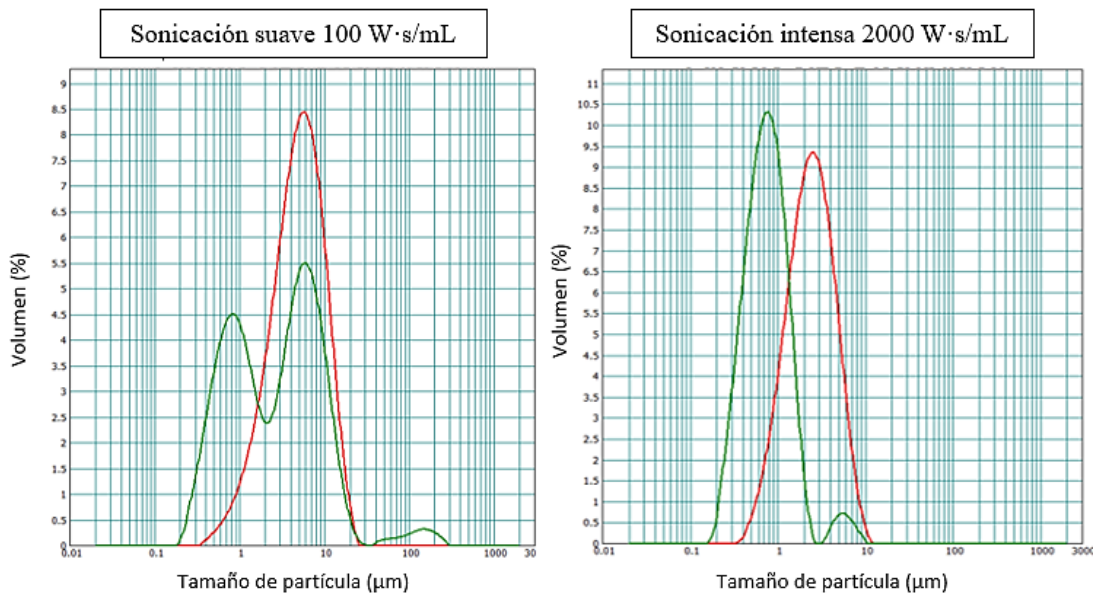


Gráfica 13 – Distribución de tamaño del SODASIL®P95



Imagen 18- Sonotrodo HIELSCHER

A continuación, se muestran en la Gráfica 14- Distribución de tamaño tras las sonicaciones descritas, su decantación natural y su reacondicionamiento.



Verde: Sin agitación, después de varios días de almacenaje

Rojo: Después de la dispersión con una sonicación de 35 W·s/mL

Gráfica 14- Distribución de tamaño tras las sonicaciones descritas, su decantación natural y su reacondicionamiento.

La conclusión de estas medidas es que es necesario el reacondicionamiento antes de cualquier caracterización. Este reacondicionamiento tiene una estabilidad de 12 horas.

b. Procedimiento de centrifuga

Una vez realizado el reacondicionamiento, las dos disoluciones sonicadas se someten a un procedimiento de centrífuga bajo diferentes condiciones de velocidad y tiempo (Esquema 9).

		Fuerza centrífuga							
		100 G					200 G	1000 G	2000 G
Sonicación	Intensa	5'	10'	20'	30'	45'	60'	60'	60'
	Suave								

Esquema 9 – Descripción experimental del proceso de centrifugación

Las medidas se llevan a cabo a temperatura ambiente y pH en torno a 10. Y se utiliza una centrífuga LUMIFuge de LUM GmbH (Imagen 20).

Se pipetea 4mL de la disolución correspondiente (disolución sonicada de forma intensa o suave), se introduce en una celda de poliamida (longitud de trayectoria de 10 mm, Imagen 19) y se aplica la fuerza centrífuga correspondiente (100 G, 200 G, 1000 G o 2000 G) durante los tiempos establecidos en la tabla anterior.

Se toma muestra del sobrenadante (Esquema 10) de las muestras centrifugadas a 100 G a los 5, 10, 20, 30 y 45 minutos y de las muestras centrifugadas a 200 G, 1000 G y 2000 G a los 60 minutos, para su posterior caracterización por LS, DLS e ICP-OES. Por otro lado, para la caracterización por SEM, se toma solo una alícuota de las muestras centrifugadas a 1000 G y 2000 G durante 60 minutos.

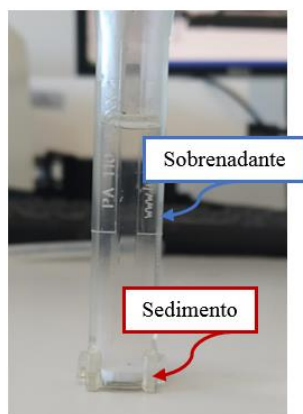
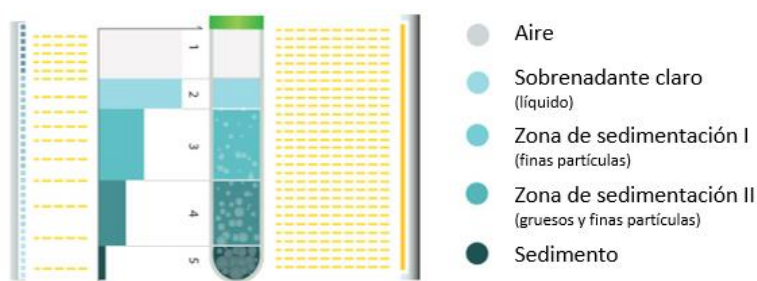


Imagen 19 – Celda de poliamida



Imagen 20 – Centrifuga LUMIFuge



Esquema 10 – Proceso de sedimentación en la celda de poliamida

3. Resultados

Los resultados obtenidos se obtuvieron utilizando los siguientes equipos:

- **LS:** Es una de las técnicas más utilizadas para la determinación del tamaño de partícula entre 100 nm a 200 000 nm. Se prepara una suspensión homogénea de SODASIL[®]P95 y se expone a un haz de luz. Se detectan los patrones angulares de la luz dispersada por los distintos tamaños de las partículas. Estos patrones obtenidos son muy característicos de cada tamaño de partícula y hace que a través de un tratamiento matemático sea sencillo conocer de una manera reproducible y exacta la distribución de tamaños¹. En este caso se utiliza el equipo Malvern Mastersizer 2000 y se optimizaron los parámetros para un índice de refracción de 1.65, un índice de absorción de 1, entre otros, ...
- **DLS:** Es una técnica muy eficaz para medir el tamaño de partícula de unos pocos nanómetros (hasta 5000 nm) y sondear la dinámica de la disolución. Para ello se mide el ensanchamiento Doppler de la luz dispersada Rayleigh como resultado del movimiento browniano de las partículas. Las partículas pequeñas hacen que fluctúe con más rapidez la intensidad de la radiación dispersada frente a las partículas grandes¹. Para ello se utiliza el equipo Malvern Zetasizer ZS
- **ICP-OES:** Es una técnica de análisis multielemental capaz de determinar y cuantificar el silicio en concentraciones muy bajas. Las muestras se digieren y se introducen de forma líquida en el equipo. Un nebulizador convierte el líquido en un aerosol y el plasma de argón excita los átomos. Las emisiones de los átomos se dirigen mediante un sistema óptico basado en un policromador que los lleva al detector CID. Obteniendo así los espectros de emisión del silicio. A través del área de los picos de emisión podemos establecer la concentración del silicio de nuestras muestras¹.

Para la cuantificación del silicio total es necesario que las alícuotas tomadas del sobrenadante se les realice una digestión ácida. Se añade 5mL de HF, 15 mL de H₂O y se calienta a 90°C durante aproximadamente 6 horas en el bloque digestor. Las muestras son llevadas a un volumen final de 20-50 mL dependiendo de la concentración esperada.

- **SEM:** es una técnica de microscopia que utiliza un haz de electrones para obtener una imagen de alta resolución de la superficie de la muestra utilizando las interacciones de electrón-materia. El detector mide la cantidad de electrones dispersados que nos ayuda a conocer cuál es la microestructura de la muestra. En este trabajo, se ha utilizado un microscopio electrónico de barrido de emisión de

campo (FE-SEM) Ultra Gemini-II de Carl Zeiss para la caracterización de algunos sobrenadantes².

3.1. Resultados LS y DLS

A continuación, se muestra la distribución de tamaño de partícula obtenido mediante LS y DLS para las muestras sometidas a una sonicación intensa o suave y centrifugadas bajo diversas condiciones (Tabla 8).

Condiciones de centrifuga		Tipo de ultrasonidos	Diámetro de partícula (nm)			
Fuerza centrifuga	Tiempo (min)		LS			DLS
			d10	d50	d90	d50
Reacondicionamiento	1	intensa	1207	2549	4820	652
		suave	2175	4634	8674	-
100 G	5	intensa	755	1365	2398	439
		suave	723	1337	2419	470
	10	intensa	554	1081	1992	380
		suave	503	924	1559	102
	20	intensa	139	469	1185	347
		suave	142	106	1071	332
	30	intensa	150	195	1088	307
		suave	146	128	1032	307
	45	intensa	136	268	769	246
		suave	159	276	571	151
200 G	60	intensa	127	198	298	189
		suave	119	157	276	205
1000 G	60	intensa	-	-	-	144
		suave	-	-	-	151
2000 G	60	intensa	-	-	-	136
		suave	-	-	-	151
2000 G	300	intensa	-	-	-	92
		suave	-	-	-	-

Tabla 8 – Resultados de la evaluación del “tamaño de partícula”

Cuando las muestras son sometidas a condiciones tan agresivas, el sobrenadante obtenido es muy transparente y no se consigue tener la suficiente obscuración para poder realizar los análisis bajo unas condiciones fiables.

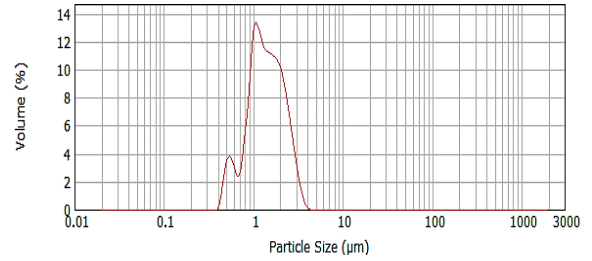
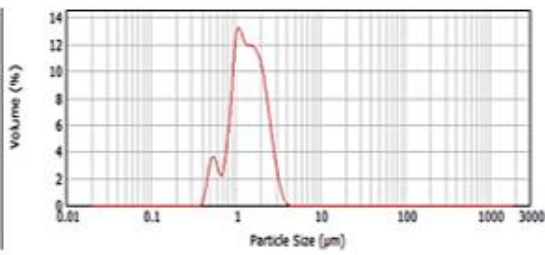
Se observa cómo la distribución de tamaño en el sobrenadante va disminuyendo conforme aumenta la velocidad de centrifuga y el tiempo de éste.

Gráficas de LS de la distribución de tamaños

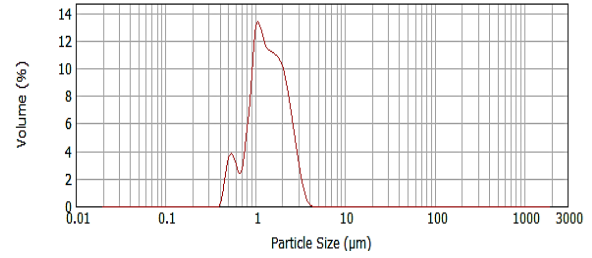
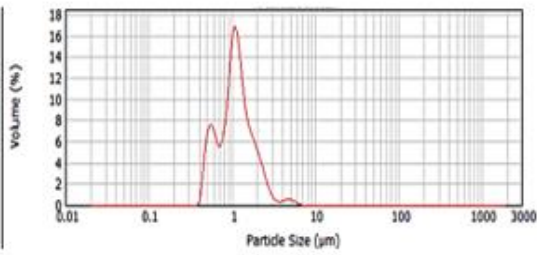
Sonicación intensa

Sonicación suave

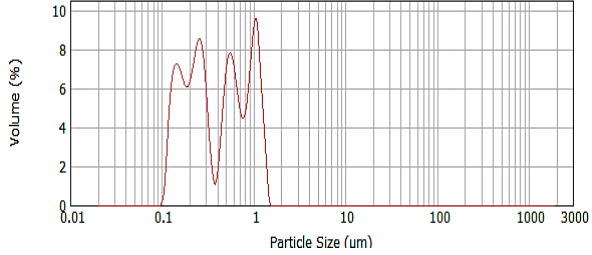
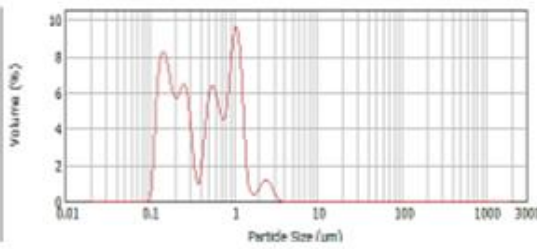
5 min a 100G



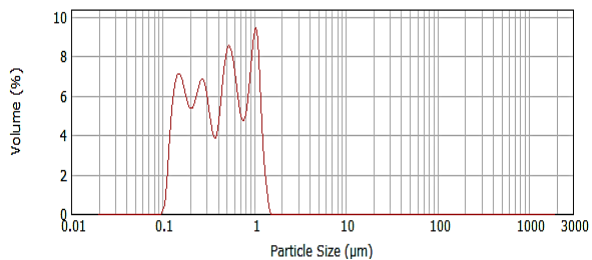
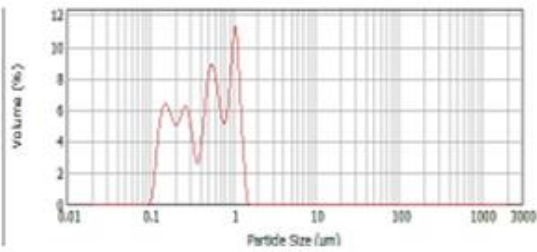
10 min a 100G



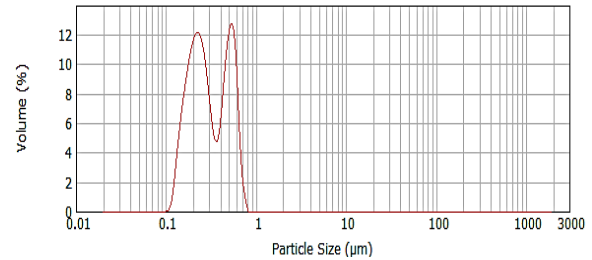
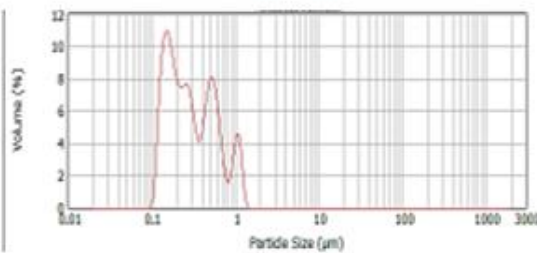
20 min a 100G



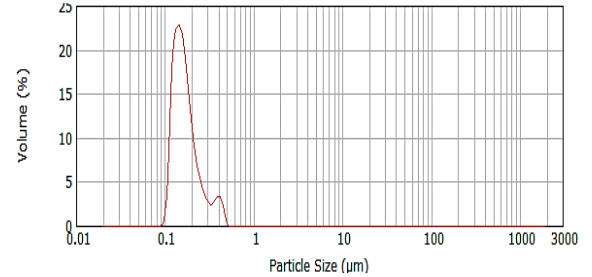
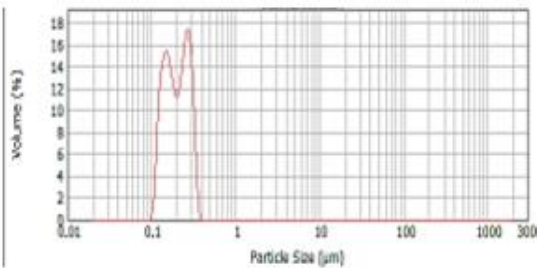
30 min a 100G



45 min a 100G



60 min a 200G



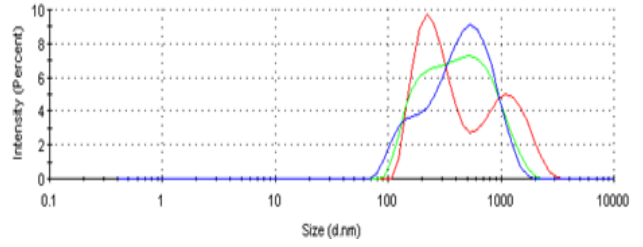
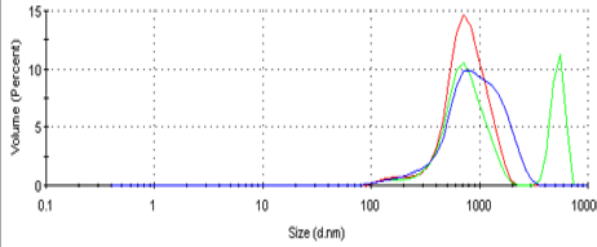
Gráficas de DLS de la distribución de tamaños

Sonicación suave

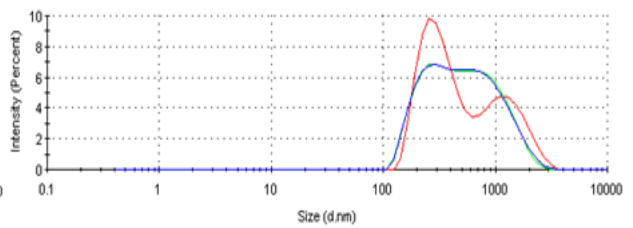
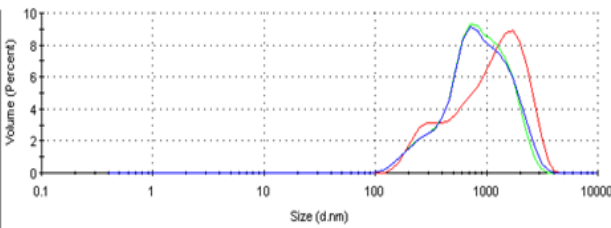
Gráficas de volumen

Gráficas de intensidad

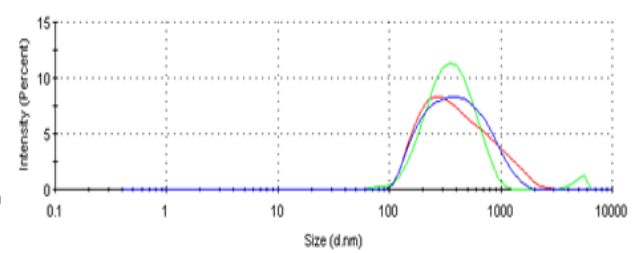
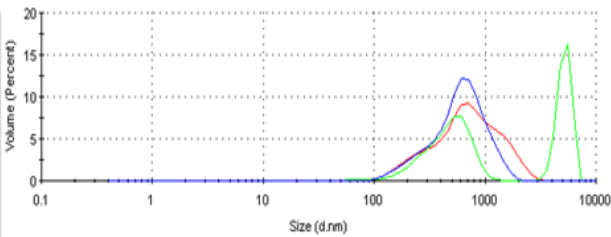
5 min a 100G



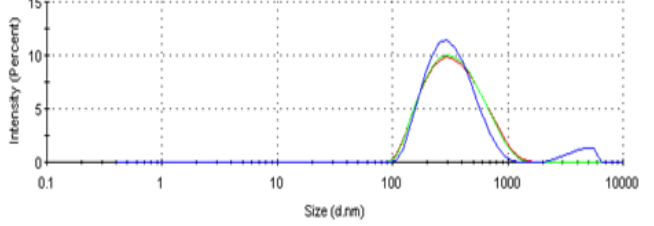
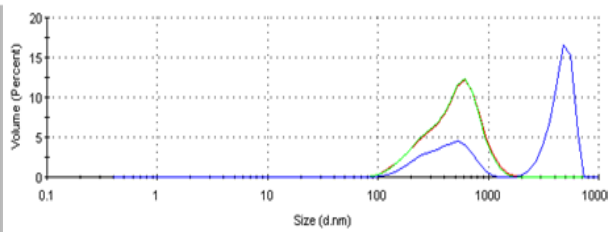
10 min a 100G



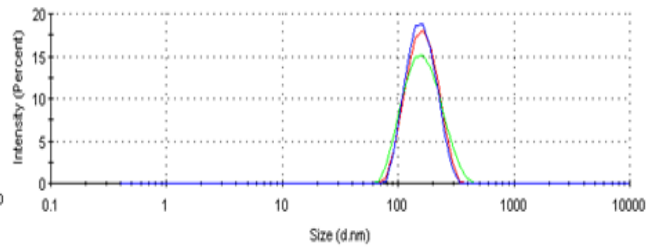
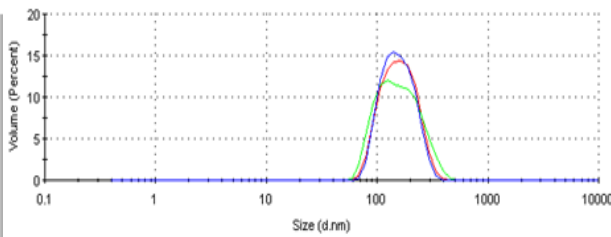
20 min a 100G



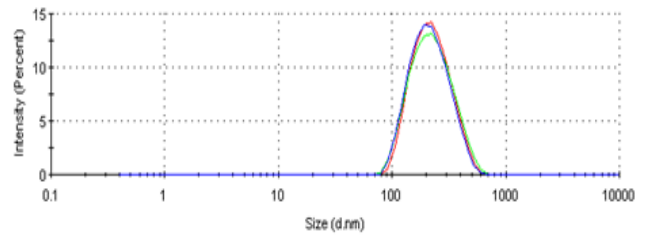
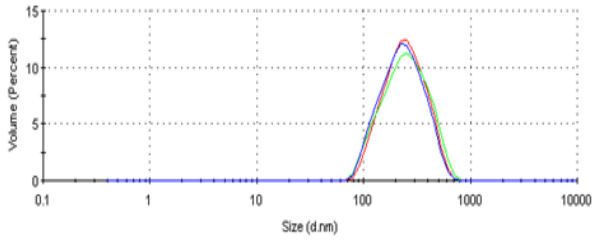
30 min a 100G



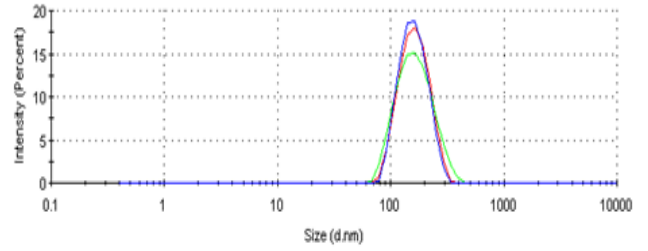
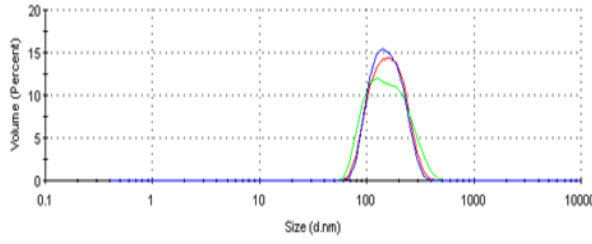
45 min a 100G



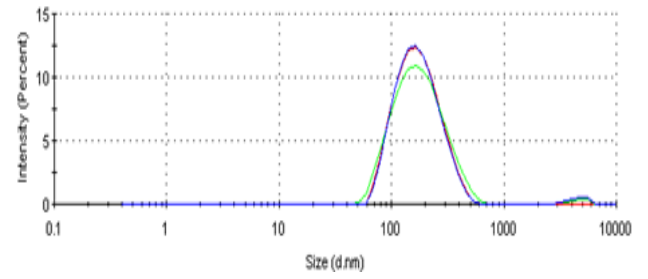
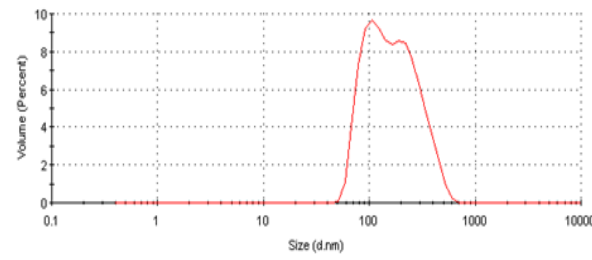
60 min
a 200G



60 min
a 1000G



60 min
a 2000



Las curvas representadas son las 3 réplicas realizadas de cada medida.

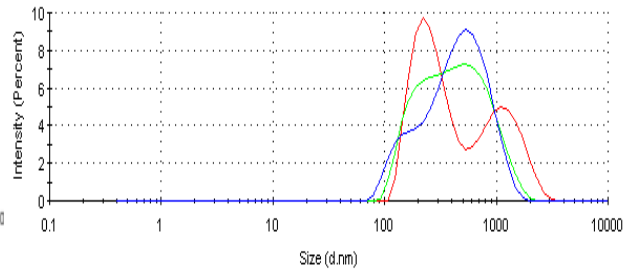
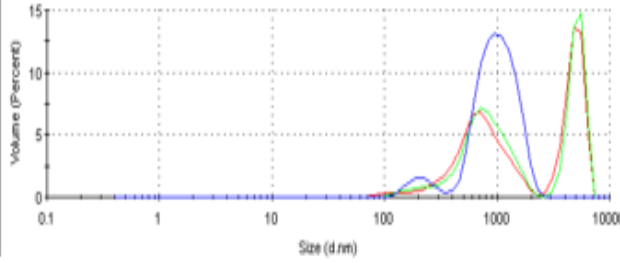
Gráficas de DLS de la distribución de tamaños

Sonicación intensa

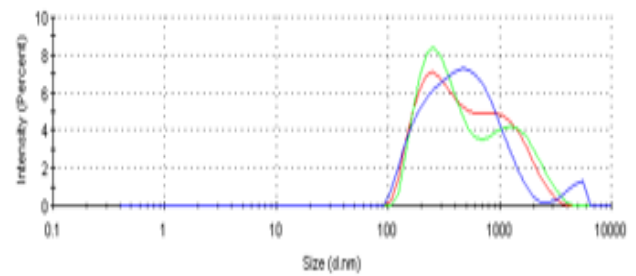
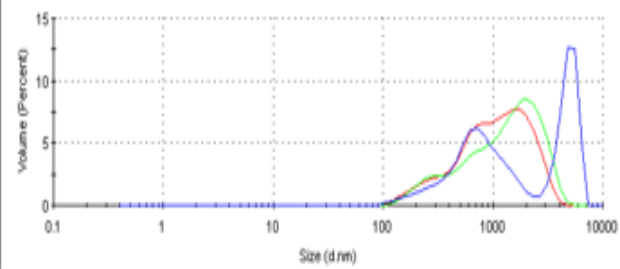
Gráficas de volumen

Gráficas de intensidad

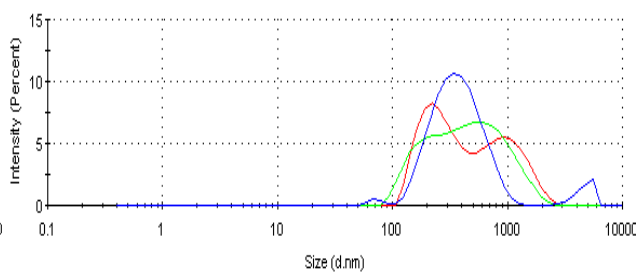
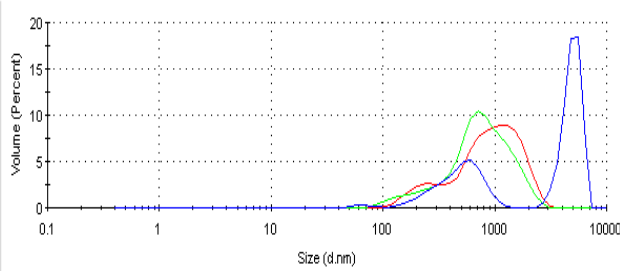
5 min a 100G



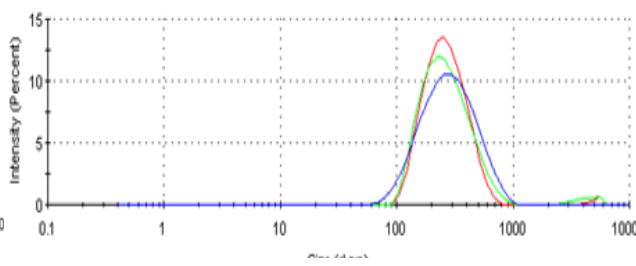
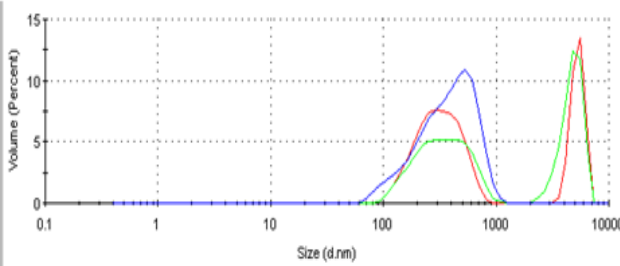
10 min a 100G



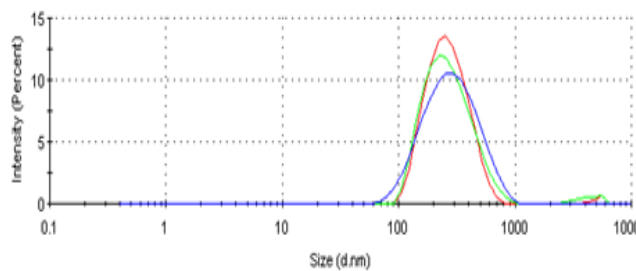
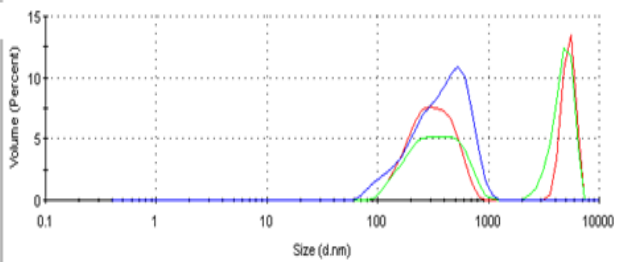
20 min a 100G



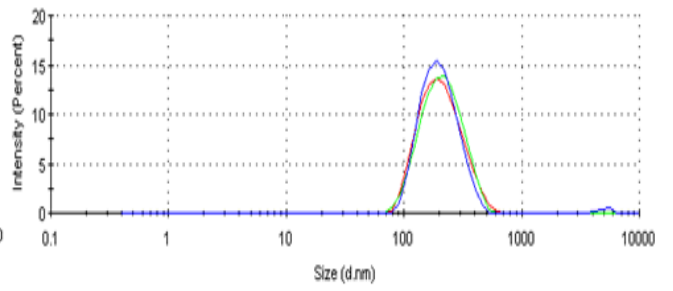
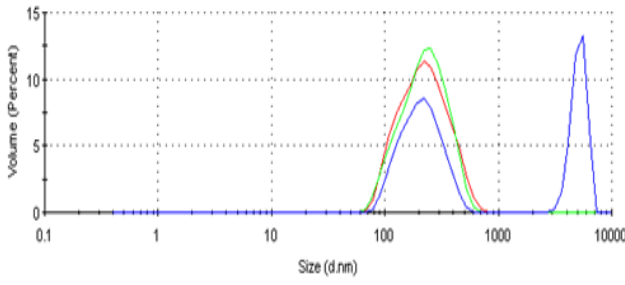
30 min a 100G



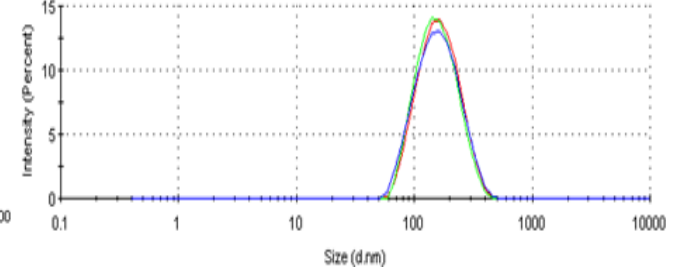
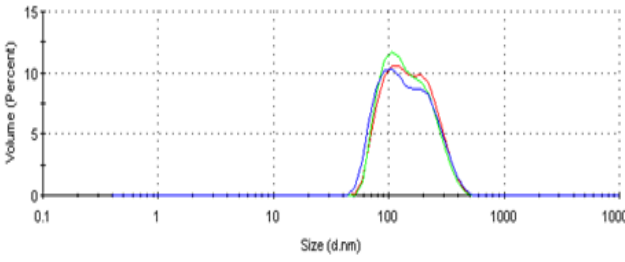
45 min a 100G



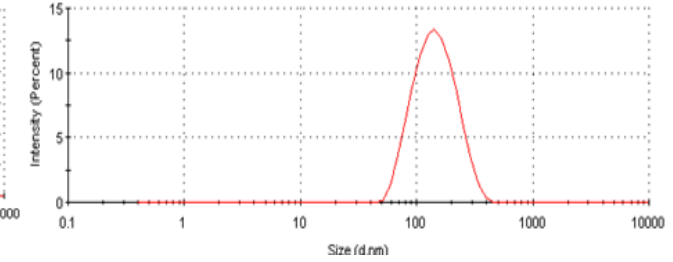
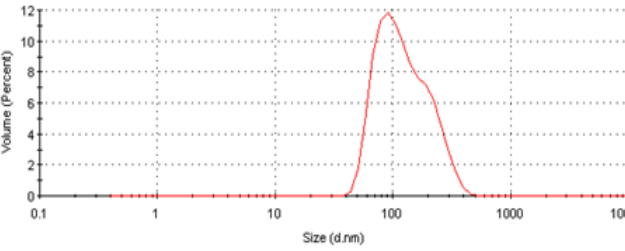
60 min
a 200G



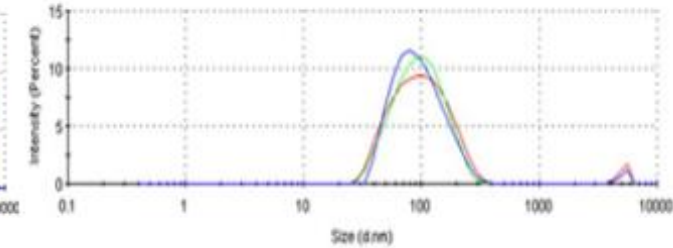
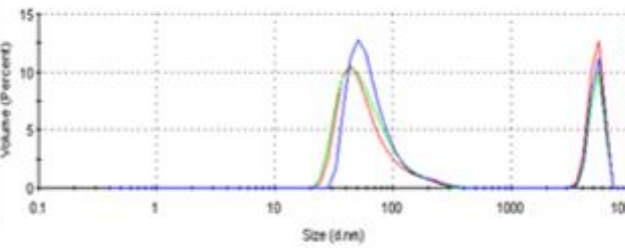
60 min
a 1000G



60 min
a 2000 G



300 min
a 2000 G



Las curvas representadas son las 3 réplicas realizadas de cada medida.

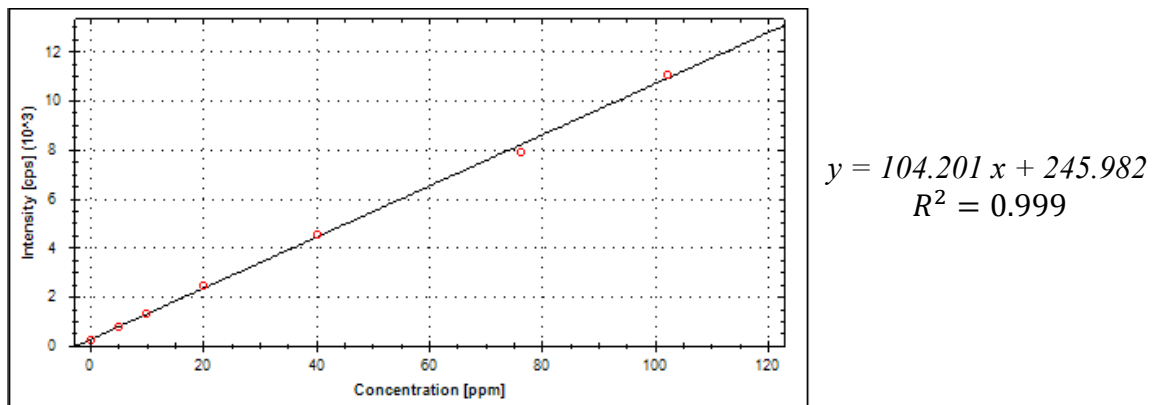
3.2. Resultados ICP-OES

Se determina la concentración de silicio del sobrenadante de las muestras centrifugadas vía ICP-OES. Para ello se necesita realizar una digestión ácida previa para conseguir fragmentar la estructura del silicato y poder determinar todo el contenido en silicio.

Una vez obtenidas las muestras digeridas se llevan a un volumen conocido. Todas las muestras tienen una dilución 1g/20 mL menos las muestras más concentradas, que son las muestras tomadas de la centrifugación de 100 G a tiempo 5 y 10 minutos que tienen una dilución 1g/50 mL.

Las muestras preparadas son medidas vía ICP-OES y las intensidades obtenidas son interpoladas dentro de una recta de calibrado de 5-100 ppm de Si.

La recta de calibrado se prepara con un patrón de silicio monovalente (Anexo A)



Gráfica 15 – Recta de calibrado de 5-100 ppm de Si

Las concentraciones obtenidas son las que se muestran en la (Tabla 9). Donde también aparece sus respectivos intervalos de confianza, que fueron calculados de la siguiente forma:

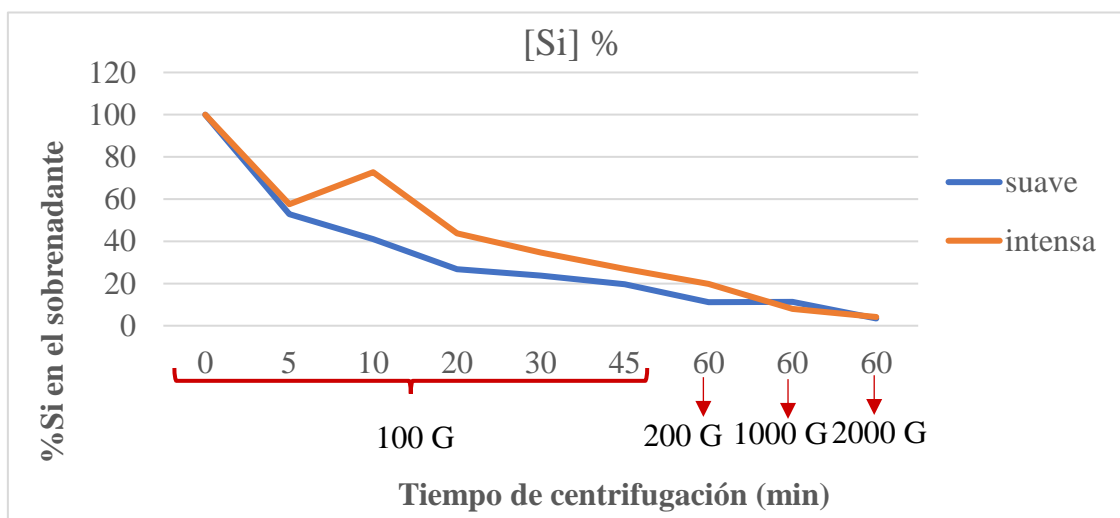
$$IC = \frac{t_{\alpha} \cdot s}{\sqrt{n}}$$

Siendo s la desviación estándar de las medidas y el valor de t-student $t_{\frac{\alpha}{2}} = 12,706$ para 1 grado de libertad y $\alpha = 0,05$.

Con estos intervalos de confianza se sabe que existe un 95% de probabilidad de que se encuentre el valor real dentro del intervalo¹.

Condiciones de centrifuga		Tipo de ultrasonidos	ICP-OES (ppm)		
Fuerza centrifuga	Tiempo (min)		ppm Si	± IC	% Si normalizado
0	0	intensa	4915,779	0,000	100
		suave	4915,779	0,000	100
100 G	5	intensa	2826,808	477,620	57,5
		suave	2601,720	1016,511	52,93
	10	intensa	3575,998	688,703	72,75
		suave	2015,193	668,964	40,99
	20	intensa	2151,919	203,168	43,78
		suave	1319,026	308,959	26,83
	30	intensa	1705,284	216,910	34,69
		suave	1164,634	359,643	23,69
45	intensa	1321,315	81,140	26,88	
	suave	965,062	404,489	19,63	
200 G	60	intensa	974,475	29,369	19,82
		suave	544,841	442,283	11,08
1000 G	60	intensa	391,132	185,431	7,96
		suave	553,947	196,682	11,26
2000 G	60	intensa	202,785	124,194	4,13
		suave	168,032	136,354	3,41

Tabla 9 – Resultados del ICP-OES



Gráfica 16 – Resultados del ICP-OES

3.3. Resultados SEM

Se realiza microfotografías de SEM para las muestras obtenidas del sobrenadante tras los procesos de centrifugación a 1000 y 2000 G durante 60 minutos, para las muestras obtenidas con ultrasonificación intensa y suave.

Para ello se toma una gota del sobrenadante obtenido tras la centrifugación correspondiente y se deposita sobre un sustrato conductor plano y se deja evaporar el agua a temperatura ambiente durante una noche. No se empleó ningún recubrimiento posterior y se utilizó un voltaje de 2 kV.

Sonicación intensa

1000G a 60 minutos

2000G a 60 minutos

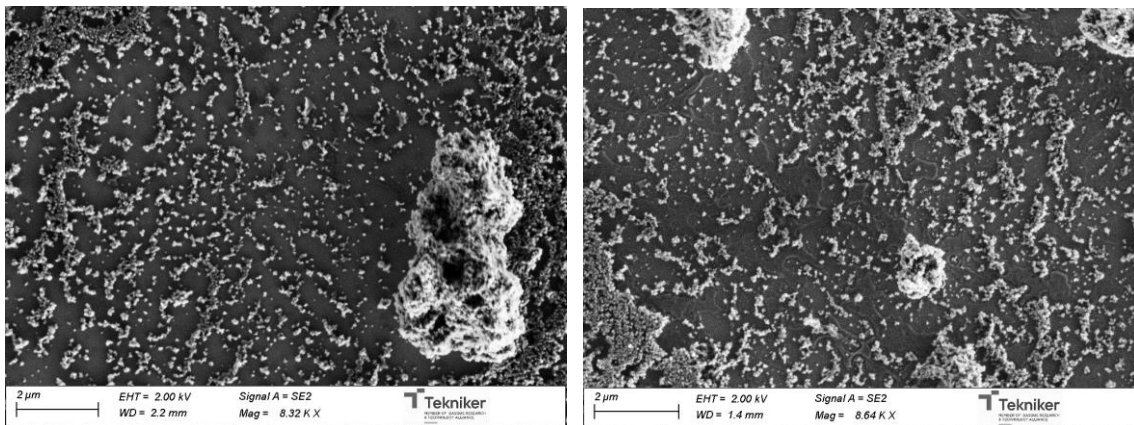


Imagen 21 – Microfotografías de SEM del sobrenadante de las centrifugaciones con sonicación intensa

Sonicación suave

1000G a 60 minutos

2000 G a 60 minutos

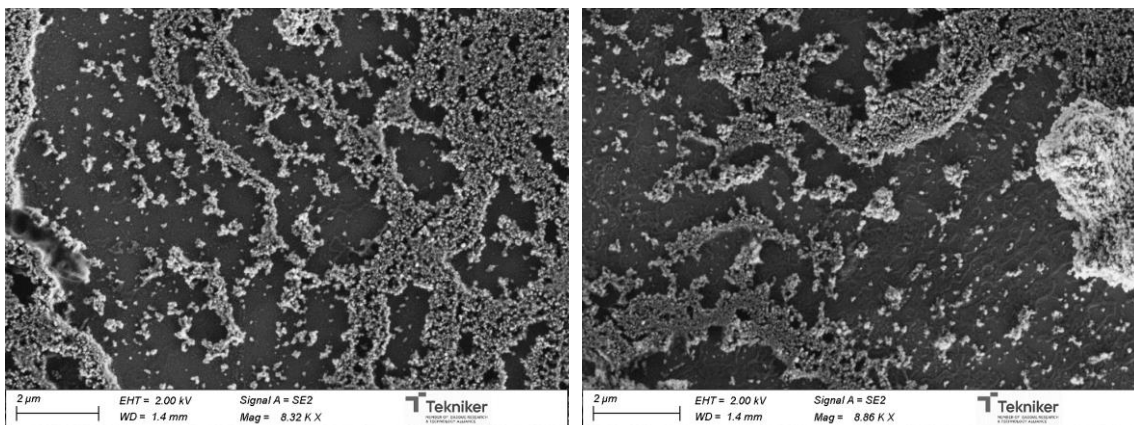


Imagen 22 – Microfotografías de SEM del sobrenadante de las centrifugaciones con sonicación suave

Referencias

1. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. *Principios de Análisis Instrumental*. Sexta edic. (González SC, ed.). Cengage Learning; 2008.
2. Egerton RF. *Physical Principles of Electron Microscopy*. Springer US; 2005. doi:10.1007/b136495

ANEXO D: OECD 318

1. Resumen

Los métodos estandarizados son una importante pieza en la evaluación de los riesgos de los nanomateriales. En este estudio se desarrolla la guía 318 establecida por la OECD, donde se determina la estabilidad dispersiva de varias disoluciones acuosas de SODASIL[®]P95, sometidas a varias condiciones ambientales reales donde podríamos encontrar el producto.

Se obtienen datos esenciales que ayudan a estimar el riesgo de estas nanopartículas y fomentan la mejora de la regulación del uso del producto. Además, la dispersión es una propiedad exigida por el JRC de la Comisión Europea para la identificación y medida de los nanomateriales¹.

A lo largo del estudio se comentan las limitaciones, la cinética de reacción y la agregación del material. Así como los resultados de la estabilidad dispersiva del SODASIL[®]P95.

2. Objetivo

La guía 318 de la OECD ², es otra de las guías propuestas por este Organismo³ y tiene como objetivo determinar la estabilidad dispersiva de nanomateriales en medios ambientes simulados. Está incluida dentro de la sección 3 “Destino y comportamiento ambiental”.

Es el primer ensayo estandarizado para nanomateriales que utiliza un programa de pruebas definidas capaces de comparar sistemáticamente diferentes estabilidades de dispersión de un nanomaterial en diferentes condiciones ambientales relevantes y representativas. Proporciona datos clave para la evaluación de riesgos de los distintos nanomateriales.

Existe un interés creciente en la comprensión del comportamiento de los nanomateriales, puesto que no son sustancias puras y pueden presentarse en diferentes nanoformas. Por ello, el uso de estas guías propuestas por la OECD busca poder conocer cuál es el potencial peligro de estos nanomateriales de una forma reproducible, estandarizada e internacionalmente aceptada.

La estabilidad de una dispersión de nanopartículas es un factor dominante que influye en el destino ambiental de éstas, ayuda a estimar la probabilidad de transporte a largo alcance en sistemas acuosos. Este trabajo ayuda a diferenciar el efecto de la solubilidad de los iones aportados por el SODASIL[®]P95 (valores evaluados en guías ya consolidadas como la OECD 105 o OECD 29) frente al efecto del material no soluble que genera las

dispersiones variando diferentes variables clave que predeterminan su comportamiento ambiental. Estas son:

- a) Concentración del material
- b) pH
- c) Iones solubles
- d) Materia orgánica

Esta estabilidad se evalúa tomando muestras, en intervalos regulares del sobrenadante de una suspensión de SODASIL®P95 sometida a diferentes condiciones ambientales. Donde se determina la capacidad de agregación y sedimentación que tiene el material durante un periodo de tiempo dado, cuantificando el porcentaje de material que permanece en suspensión⁴.

Para ello se determina la concentración de silicio en el sobrenadante de las diferentes suspensiones preparadas durante 6 horas a través del ICP-OES (Espectroscopia de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo).

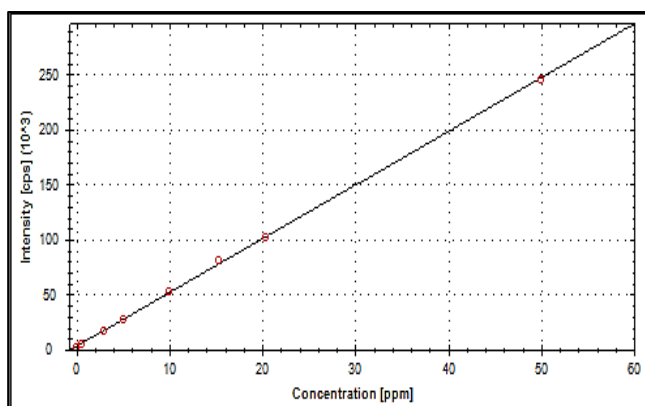
3. Método de calibración

a) Rectas de calibrado del Si vía ICP-OES

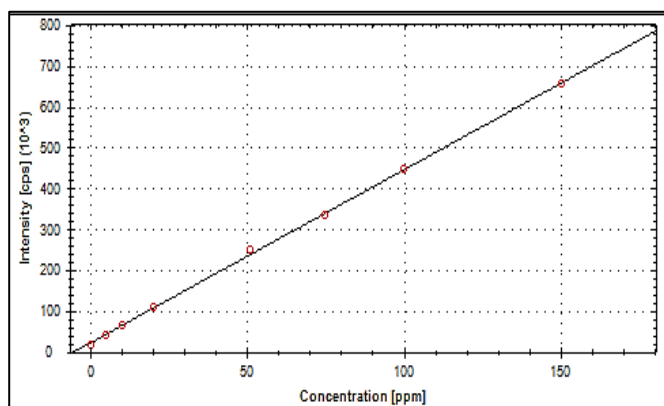
La determinación del silicio se realiza a través del ICP-OES. Las rectas de calibrado utilizadas se realizan a partir del patrón de Si monovalente anteriormente comentado.

*Recta de calibrado de 0,5-50 ppm,
para las muestras con NaHCO₃*

*Recta de calibrado de 5-150 ppm, para
las muestras con NOM*



$$y = 4881,810x + 3042,481$$
$$R^2 = 1$$



$$y = 4230,284x + 22425,621$$
$$R^2 = 0,999$$

Gráfica 17 – Rectas de calibrado para el OECD 318

Las rectas de calibrado fueron medidas todos los días para la comprobación de la correcta medida del equipo y asegurar unos resultados representativos y veraces.

b) Tratamiento de muestra

Las muestras determinadas vía ICP-OES son tratadas previamente mediante una digestión ácida en el bloque digestor. Se toma 1 mL del sobrenadante a las horas establecidas y se añade 5mL de HF y 15 mL de H₂O. Se calienta a 90°C en el bloque digestor durante aproximadamente 6 horas hasta que el volumen del vial esté por debajo de 5 mL. Es entonces cuando una vez frío el vial se lleva a un volumen conocido establecido enrasando con agua miliQ.

c) Cálculos

Todas las intensidades determinadas con el ICP-OES, son interpoladas dentro de sus respectivas rectas de calibrado. Y a las concentraciones obtenidas se les aplica el factor de dilución respectivamente. Sus intervalos de confianza son calculados de la siguiente forma:

$$IC = \frac{t_{\frac{\alpha}{2}} \cdot s}{\sqrt{n}}$$

Siendo s la desviación estándar de las medidas y el valor de t-student $t_{\frac{\alpha}{2}} = 4,30$ para 2 grados de libertad y $\alpha = 0,05$.

Con estos intervalos de confianza se sabe que existe un 95% de probabilidad de que se encuentre el valor real dentro del intervalo⁵.

4. Metodología del estudio

La guía 318 de la OECD establece una clasificación para determinar cuál es el valor de la característica de la estabilidad de dispersión de las suspensiones preparadas. Para ello analiza los datos obtenidos tras el análisis de las 7 tomas de muestra con intervalos de una hora.

Se establece una concentración inicial a tiempo 0h y se determina la concentración final a tiempo 6h. Si a lo largo de las 6 horas de reacción la concentración obtenida en el sobrenadante es menor o igual a un 10% de la concentración inicial, la disolución del material analizado se clasifica como baja estabilidad de la dispersión. En cambio, si el valor de la concentración final es superior o igual al 90% de la concentración inicial, la disolución del material se clasifica como alta estabilidad de la dispersión. Los rangos intermedios entre $10\% < x < 50\%$ se clasifica como baja/intermedia estabilidad de la dispersión y el rango entre $50\% \leq x < 90\%$ como alta/intermedia estabilidad de la

dispersión, definiéndose como estable una dispersión cuando el número de partículas por unidad de volumen permanece constante respecto al tiempo.

Para la realización experimental de esta guía se simulan las condiciones ambientales de una amplia gama de agua superficiales terrestres, como arroyos y ríos. En el que los parámetros de reacción son los siguientes:

a. Parámetros de reacción del medio

Es crucial que los parámetros de reacción representen el medio natural real en el que se pueda encontrar el material. Estos parámetros establecidos por el OECD 318 representan el 90-95% de las aguas dulces y son los siguientes descritos²:

- Iones disueltos

Las iones más comunes en medios acuosos son NO_3^- , SO_4^{2-} , Ca^{2+} y Mg^{2+} , siendo la proporción más aproximada $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 4:1 y $\text{NO}_3^-/\text{SO}_4^{2-}$ 10:1. El método establece que el $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ es el electrolito más representativo para utilizar en este estudio. Y señala el ion Ca^{2+} como el catión divalente con mayor efecto de agregación de las partículas en comparación con los demás cationes monovalentes y trivalentes. Por lo que el OECD 318 propone realizar el estudio por triplicado y determinar la estabilidad del material para la ausencia y la presencia de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (0 mM ó 1 mM ó 10 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$).

Por otro lado, el estudio también propone adicionar NaHCO_3 en parte de los experimentos, como una alternativa a la simulación de la matriz del medio, ya que los carbonatos (CO_3^{2-}) están siempre presentes en las aguas.

- pH

El pH tiene efecto sobre la carga superficial de las partículas, es decir, puede protonar o desprotonar la superficie, puede cambiar la polaridad de la carga superficial y modificar la energía de las repulsiones electrostáticas, las cuales mantienen las partículas dispersas en la disolución.⁶ Los pH establecidos nunca deben forzar que PZC (punto de carga cero) y el IEP (punto isoeléctrico) sean iguales ya que a ese pH las repulsiones electrostáticas son nulas².

Los pH establecidos por el OECD 318 son pH 4, 7 y 9.

- Concentración de materia orgánica disuelta (DOM)

Para representar los sistemas ambientales acuáticos, donde podemos encontrar el material, en este caso las nanopartículas del SODASIL[®]P95, se utiliza una materia

orgánica disuelta (DOM) que puede emular las interacciones entre los contaminantes posibles presentes en ambientes naturales.

La materia orgánica disuelta puede influir en la estabilidad de las partículas de la dispersión. Ésta tiende a estabilizar la dispersión creando un efecto amortiguador y puede adsorberse en la superficie de las nanopartículas, disminuyendo la probabilidad de aglomeración.

Este efecto aparte de depender de la concentración del NOM (materia orgánica natural) también depende del tipo de nanomaterial y en general de la química superficial provocada por el medio de reacción. Normalmente el NOM tiene una carga negativa que, al absorberse en la superficie, cambia la polaridad de la partícula.

También el DOM es capaz de acomplejar cationes y en este caso reduce el efecto de aglomeración del Ca^{2+} o de otros iones floculantes, por lo que se espera que la presencia del NOM haga que la disolución tenga una mayor estabilidad de dispersión, evitando procesos de sedimentación.

Para este experimento será necesario preparar una disolución de 200 mg/L de DOC (carbono orgánico disuelto). A cada vial se le añade 2 mL por lo que la concentración simulada es de 10 mg/L de DOC. Son concentraciones que se pueden encontrar en Cataluña, en la región italiana de Puglia, en la región inglesa de Yorkshire..., constituyendo aproximadamente la media de la concentración en Europa en los ríos⁷.

- Concentración de las partículas

La concentración de partículas del material en la dispersión es un factor que influye en la estabilidad de procesos de evolución ambiental. Este valor es clave para poder estimar el número de colisiones entre partículas y así la velocidad de aglomeración en el proceso. Por ello, la OECD propone que para materiales nanoparticulados la disolución de stock debe tener una concentración de partículas entre $0,5-5 \cdot 10^{12}$ partículas/L. Este valor se determina conociendo la densidad, el tamaño y geometría de la partícula, ya que una disolución muy saturada impediría que se pudiera ver la reactividad propia del material. Para este experimento se ha considerado necesario preparar una disolución de 5g/L de SODASIL[®]P95, con una preestimación del número de partículas.

- b. Descripción del método experimental

En este experimento se determina la concentración del silicio en el sobrenadante de los viales de reacción mediante el uso del ICP-OES bajo las condiciones optimizadas (Anexo A) durante 6 horas. Las condiciones de reacción además de las previas mencionadas son

a 25°C y 1 atm. El OECD 318 propone dos opciones de evolución: un test inicial más reducido y otro estudio extendido. En este TFM se realiza el estudio extendido más completo. Éste consiste en conocer cuál es la concentración de silicio que queda en el sobrenadante tras preparar una disolución de SODASIL®P95 de 2,5 g/L y añadirle a ésta:

- Concentraciones variables de electrolito: 0 ó 1 ó 10 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
- Unos mL de HNO_3 o NaOH para conseguir los 3 pH propuestos: 4, 7 y 9
- Una disolución de materia orgánica (NOM) o NaHCO_3 (5 mM), para emular medios acuosos reales y comprobar su capacidad amortiguadora.

Para ello se toman alícuotas periódicamente cada hora hasta llegar a las 6 horas de reacción y adicionalmente se toma otra muestra a las 24 horas de reacción. El experimento se realiza por triplicado para asegurar una buena representatividad de los resultados.

El esquema general seguido se muestra en las siguientes tablas:

Test con NOM				
pH	Ca(NO ₃) ₂ mM			Total (muestras)
	0	1	10	
4	3X	3X	3X	9
7	3X	3X	3X	9
9	3X	3X	3X	9

Test con NaHCO₃ (5mM)				
pH	Ca(NO ₃) ₂ mM			Total (muestras)
	0	1	10	
4	3X	3X	3X	9
7	3X	3X	3X	9
9	3X	3X	3X	9

Esquema 11 – Experimentos del OECD 318

Primero se preparan las disoluciones de stock, de las cuales luego se tomará el volumen correspondiente para cada vial de reacción.

Se prepara la disolución stock de SODASIL®P95 con una concentración de 5 g/L. Para asegurar una mejor homogeneización de la disolución, el OECD 318 también propone una sonicación suave previa de la disolución de stock. Se aplica a la disolución una potencia de 40W·s/mL durante aproximadamente 8 min con ayuda del sonotrodo. Con ello, según el estudio sobre la evaluación del tamaño, se sabe que se consigue dispersar la muestra y que sea más homogénea la disolución sin apenas modificar el tamaño de partícula inicial propio del material.

Por otro lado, se preparó otra disolución de stock de NOM. Para ello se utilizó un patrón de referencia certificado propuesto por la misma guía del OECD 318, el 2R101N Suwanne River NOM (SRNOM). Se realizó una disolución stock de una concentración de 200 mg/L de C, se dejó en agitación constante durante 24 horas a 300 rpm, luego se filtró a vacío con un filtro de microfibras de vidrio (GF3 grade) de un tamaño de 100 mm

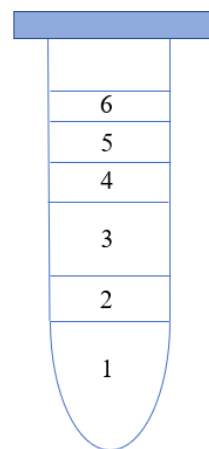
y finalmente se ajustó el pH de la disolución a 8 utilizando HNO_3 . Esta disolución se debe almacenar en un frasco ámbar refrigerado durante un periodo máximo de 4 semanas.

También se prepara una disolución de 0,1M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ para la simulación de otros electrolitos presentes en el medio acuoso. Y otra disolución de NaHCO_3 0,1 M para simular la segunda matriz propuesta.

Por último, para conseguir el pH de reacción, se elaboran dos disoluciones de 0,01 M de HNO_3 y 0,1 M NaOH .

La reacción se lleva a cabo en unos viales graduados de polipropileno de 50mL y se añade los volúmenes correspondientes de todos los reactivos en el siguiente orden:

1. Se añade 20 mL de la disolución stock de SODASIL®P95.
2. Dependiendo de la matriz del medio:
 - a. Se añade 2 mL de 0,1M NaHCO_3
 - b. Se añade 2 mL de la disolución de stock del SRNOM
3. Se añaden los mL necesarios para obtener una concentración de 0 o 1 o 10 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.
4. Se enrasa el bote hasta 35 mL.
5. Se ajusta el pH establecido utilizando HNO_3 o NaOH .
6. Y finalmente se enrasa el bote hasta 40 mL



$V_T = 40\text{mL}$

Por último, para conseguir una correcta dispersión y homogeneización se les aplica ultrasonidos (Ultrasons P Selecta, serie 0448356) a todas las muestras preparadas durante 30 segundos con una potencia aproximada de 50 W.

A continuación, se va tomando cada hora del sobrenadante una alícuota de 1mL hasta llegar a las 6 horas de reacción y adicionalmente se propone tomar una última alícuota a las 24 horas del inicio del experimento.

Seguidamente se realiza una digestión ácida, se añade 5 mL de HF y 15 mL de H_2O y se calienta a 90°C en el bloque digestor aproximadamente durante 6 horas. Una vez enfriada la muestra digerida, se lleva a un volumen final conocido de 25 mL utilizando agua miliQ.

6. Resultados

Se determina la concentración de silicio en el sobrenadante conforme al método optimizado del ICP-OES (Anexo A). Los datos obtenidos están interpolados dentro de dos rectas de calibrado preparada con silicio monovalente en una concentración de 0,5-

50 ppm y 5-150 ppm. Se utiliza para todos los experimentos una disolución de 1 g/25 mL. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

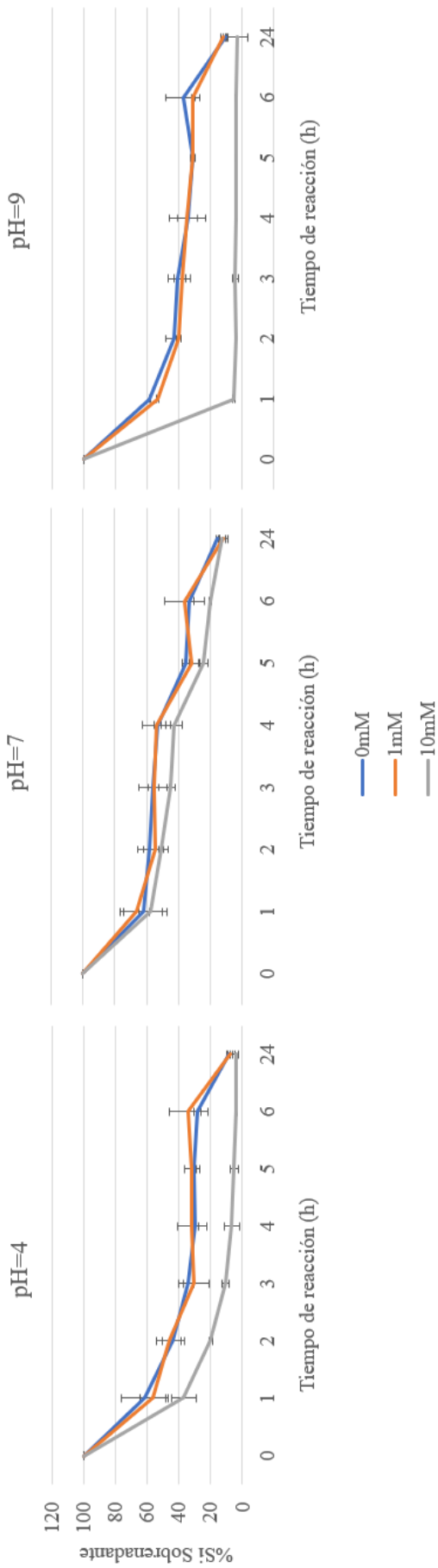
Las gráficas (Gráfica 18 y Gráfica 19) representan los diferentes tiempos de reacción con su concentración normalizada de silicio en el sobrenadante. Se toma como concentración inicial, la obtenida a tiempo 0h en cada vial.

En cada gráfica se representa para cada pH, dependiendo de la matriz (NOM o NaHCO_3), las 3 concentraciones distintas de electrolito ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$).

La tabla (Tabla 10 y Tabla 11) siguiente muestra el porcentaje de silicio en el sobrenadante frente a la concentración inicial de stock medida con el ICP-OES, junto con su intervalo de confianza (IC) del 95% obtenido de las 3 (n) réplicas realizadas.

Por último, la Tabla 12 muestra los valores sin estandarizar de las 3 réplicas realizadas.

NaHCO₃

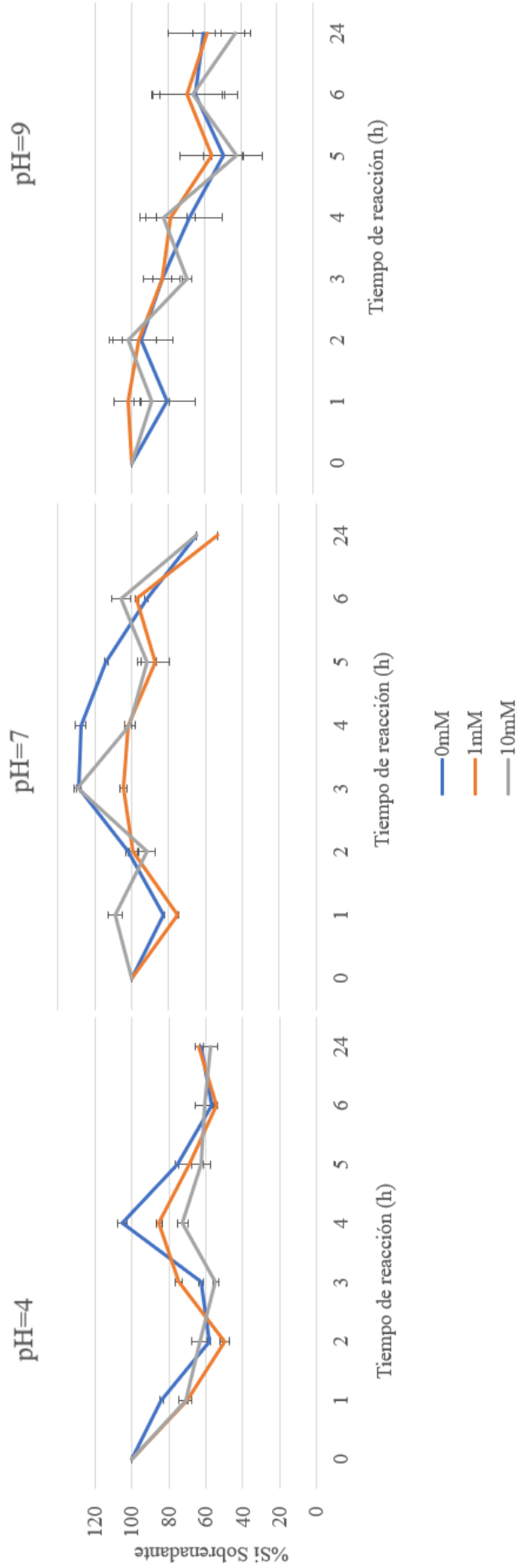


Gráfica 18 – Resultados del OECD 318 con NaHCO₃

Horas (h)	pH=4						pH=7						pH=9					
	0mM		1mM		10mM		0mM		1mM		10mM		0mM		1mM		10mM	
	% Si sobrenadante	± (IC)	% Si sobrenadante	± (IC)	% Si sobrenadante	± (IC)	% Si sobrenadante	± (IC)	% Si sobrenadante	± (IC)	% Si sobrenadante	± (IC)	% Si sobrenadante	± (IC)	% Si sobrenadante	± (IC)	% Si sobrenadante	± (IC)
0	100,00	0,000	100,00	0,000	100,00	0,000	100,00	0,000	100,00	0,000	100,00	0,000	100,00	0,000	100,00	0,000	100,00	0,000
1	61,50	14,554	56,68	8,061	7,428	7,428	61,78	15,666	66,48	9,1652	57,47	11,406	56,95	9,915	53,50	4,7809	19,98	3,658
2	43,60	7,186	46,41	7,875	1,341	1,341	58,14	13,491	54,40	5,0604	51,12	8,959	42,73	7,532	43,52	5,0860	13,52	0,955
3	34,08	3,312	30,41	9,412	2,478	2,478	56,02	1,903	55,12	8,4297	44,89	2,893	39,20	2,745	40,58	13,7660	9,70	4,095
4	29,92	2,431	31,70	8,929	5,030	5,030	53,26	13,577	53,91	8,6982	42,91	3,716	34,13	9,348	34,80	3,4015	4,90	2,685
5	30,71	1,944	31,88	4,948	2,869	2,869	35,55	13,706	31,64	12,3907	24,33	9,956	31,62	4,321	31,00	3,9097	4,27	2,602
6	28,27	2,457	34,12	12,301	0,888	0,888	33,04	7,140	36,25	4,1734	20,20	5,657	33,91	2,616	30,31	1,9140	3,80	2,621
24	8,61	0,838	7,61	2,559	1,782	1,782	15,58	12,517	12,01	11,8824	12,56	11,529	10,17	0,635	0,8510	3,82	2,738	

Tabla 10- Resultados del OECD 318 con NaHCO₃

NOM



Gráfica 19 – Resultados del OECD318 con NOM

Horas (h)	pH=4 Ca(NO ₃) ₂						pH=7 Ca(NO ₃) ₂						pH=9 Ca(NO ₃) ₂					
	0mM		1mM		10mM		0mM		1mM		10mM		0mM		1mM		10mM	
	% Si sobrenadante	± (IC)	% Si sobrenadante	± (IC)	% Si sobrenadante	± (IC)	% Si sobrenadante	± (IC)	% Si sobrenadante	± (IC)	% Si sobrenadante	± (IC)	% Si sobrenadante	± (IC)	% Si sobrenadante	± (IC)	% Si sobrenadante	± (IC)
0	100,00	0,000	100,00	0,000	100,00	0,000	100,00	0,000	100,00	0,000	100,00	0,000	100,00	0,000	100,00	0,000	100,00	0,000
1	84,05	0,849	70,20	0,099	71,16	3,814	82,82	14,358	75,03	30,5372	109,19	31,904	80,41	15,229	102,15	7,4830	89,25	9,555
2	58,14	0,835	49,55	2,555	63,48	4,396	102,20	45,697	99,56	9,1712	92,03	16,377	94,98	17,811	95,96	9,2494	102,14	8,103
3	62,81	1,230	74,50	1,793	54,80	1,697	129,06	29,120	104,56	38,9566	129,67	50,931	83,40	5,200	83,52	10,1378	69,75	2,629
4	105,31	2,697	85,30	1,734	72,57	2,944	127,79	41,884	102,07	35,0925	101,24	25,854	68,27	18,047	78,68	13,7749	82,82	12,899
5	75,46	0,951	68,95	7,633	62,63	5,196	114,10	28,716	87,47	33,3973	91,91	18,633	49,76	10,935	56,04	17,2756	42,07	13,717
6	57,01	0,668	54,09	0,763	60,35	5,100	92,08	23,971	34,8419	105,85	8,978	8,978	65,31	23,352	69,92	19,4404	66,62	17,883
24	62,27	1,157	63,70	2,290	57,34	3,818	64,92	18,173	53,19	18,4427	64,81	10,884	60,34	6,037	58,92	20,9396	42,72	8,130

Tabla 11 – Resultados del OECD 318 con NOM

NaHCO₃

NOM

Horas	Réplicas	pH=4			pH=7			pH=9		
		Ca(NO ₃) ₂			Ca(NO ₃) ₂			Ca(NO ₃) ₂		
		0 mM	1 mM	10 mM	0 mM	1 mM	10 mM	0 mM	1 mM	10 mM
0	A	31,869	27,170	28,503	48,301	44,318	40,925	33,085	33,383	33,298
	B	32,740	33,109	23,574	42,237	42,813	42,481	33,560	33,452	33,049
	C	30,369	27,512	23,447	44,541	42,813	41,694	32,711	33,367	33,423
1	A	21,359	16,260	10,084	30,591	31,455	26,181	32,776	33,275	33,137
	B	21,299	17,108	7,971	29,323	28,833	24,137	33,511	33,715	32,740
	C	15,921	16,100	9,722	23,423	26,165	21,518	32,517	32,973	32,783
2	A	12,521	13,538	5,910	25,701	25,019	23,222	32,875	33,396	32,753
	B	14,605	13,775	4,562	28,122	23,752	20,636	32,691	33,098	32,507
	C	14,248	13,154	4,605	24,338	21,950	20,031	33,669	33,308	32,704
3	A	10,353	8,798	3,449	27,524	26,705	18,664	32,527	32,697	33,147
	B	11,036	8,145	2,224	23,720	22,977	19,530	32,550	33,826	33,331
	C	10,943	9,426	2,445	24,465	22,020	17,962	32,855	32,789	32,753
4	A	9,861	10,039	2,666	25,484	24,879	18,367	33,042	33,180	32,507
	B	9,947	9,058	0,916	25,718	24,456	18,266	32,868	32,717	33,206
	C	8,632	8,473	1,605	20,550	20,754	17,027	34,650	32,799	33,085
5	A	10,123	9,482	1,938	20,798	16,193	12,307	33,866	33,429	33,308
	B	10,057	10,271	0,872	14,973	14,744	10,028	33,770	33,990	32,822
	C	9,004	8,178	1,157	12,534	10,253	8,050	32,940	33,147	32,727
6	A	8,888	9,997	1,294	16,953	16,634	6,863	33,154	32,832	33,724
	B	8,892	8,775	0,852	14,976	16,091	9,655	32,629	33,324	33,386
	C	9,035	10,748	1,012	12,719	14,396	8,797	32,957	33,117	33,587
24	A	2,668	2,215	1,203	9,663	3,579	2,177	2,869	3,586	2,591
	B	2,727	1,994	0,771	3,268	3,632	6,871	3,427	3,415	1,089
	C	2,776	2,377	1,222	8,465	8,338	6,755	3,412	3,722	1,261

Tabla 12 – Resultados del OECD 318

Las siguientes imágenes son los viales de reacción en la primera hora y sexta hora de estabilización para todos los pH y matrices propuestos.

Imágenes comparativas de viales de reacción con NaHCO_3 :

1 hora

pH = 4



0 Mm 1mM 10mM

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

pH = 7



0 Mm 1mM 10mM

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

pH = 9



0 Mm 1mM 10mM

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

6 horas

pH = 4



0 Mm 1mM 10mM

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

pH = 7



0 Mm 1mM 10mM

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

pH = 9



0 Mm 1mM 10mM

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

Imágenes comparativas de viales de reacción con NOM:

1 hora

pH = 4



0 Mm 1mM 10mM

Ca(NO₃)₂

pH = 7



0 Mm 1mM 10mM

Ca(NO₃)₂

pH = 9



0 Mm 1mM 10mM

Ca(NO₃)₂

6 horas

pH = 4



0 Mm 1mM 10mM

Ca(NO₃)₂

pH = 7



0 Mm 1mM 10mM

Ca(NO₃)₂

pH = 9



0 Mm 1mM 10mM

Ca(NO₃)₂

Referencias

1. Rauscher H, Mech A, Gibson N, et al. *JRC SCIENCE FOR POLICY REPORT: Identification of Nanomaterials through Measurements Identification of Nanomaterials through Measurements*. Publications office of the european union; 2019. doi:10.2760/053982
2. OECD. Dispersion Stability of Nanomaterials in Simulated Environmental Media. *Oecd Guidel Test Chem*. 2017;(October):1-4. http://biotecnologiebt.com/guide/OECD_227.pdf
3. Acerca de la OCDE - OECD. Accessed July 12, 2021. <https://www.oecd.org/acerca/>
4. Abdolapur Monikh F, Praetorius A, Schmid A, et al. Scientific rationale for the development of an OECD test guideline on engineered nanomaterial stability. *NanoImpact*. 2018;11(December 2017):42-50. doi:10.1016/j.impact.2018.01.003
5. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. *Principios de Análisis Instrumental*. Sexta edic. (González SC, ed.). Cengage Learning; 2008.
6. Metin CO, Lake LW, Miranda CR, Nguyen QP. Stability of aqueous silica nanoparticle dispersions. *J Nanoparticle Res*. 2011;13(2):839-850. doi:10.1007/s11051-010-0085-1
7. FOREGS-EuroGeoSurveys Geochemical Baseline Database. Geochemical Atlas of Europe- Maps. Accessed October 28, 2021. http://weppi.gtk.fi/publ/foregsatlas/maps_table.php