

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



DETERMINACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITANIO EN ALGAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE CON DETECCIÓN DE PARTÍCULAS INDIVIDUALES (SP-ICP-MS)

## **TESIS DE LICENCIATURA**

Que para obtener el título de:

Químico Farmacéutico Biólogo

PRESENTA:

## Sergio Del Angel Monroy

DIRECTOR:

Dr. Antonio Moreda Piñeiro



Ciudad de México, 2021



Universidad Nacional Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

## DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

#### AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas y brindarme las herramientas necesarias para mi formación académica y profesional durante los últimos 9 años y por permitirme vivir la experiencia de viajar al extranjero para la realización de esta tesis a través del apoyo del "Programa de Titulación para Egresados de la UNAM a Través de Estancia en el Extranjero (TEE)".

A la Dra. Patricia Campos Bedolla por todo el apoyo y los momentos que me brindó durante el Servicio Social, por el conocimiento que me ha transmitido sin los cuales el trabajo experimental, la investigación bibliográfica y la redacción para realizar esta tesis me hubieran costado más tiempo.

A la Dra. Retana sin cuya paciencia y ayuda brindadas no hubiera sido posible realizar esta tesis.

Este trabajo se realizó en la Universidad de Santiago de Compostela, España. Por lo que agradezco al Dr. Moreda y al grupo de investigación "GRUPO DE ELEMENTOS TRAZA, ESPECTROSCOPÍA Y ESPECIACIÓN (GETEE)" de la Universidad de Santiago de Compostela por aceptarme en su laboratorio, por toda la paciencia y conocimiento brindado durante mi estancia en Santiago y durante la realización de este trabajo.

A ti Monse, por ser mi compañera y mi mejor amiga durante todos estos años. Por apoyarme en todo lo que hago y brindarme tu consejo. Por estar ahí en cada momento y permitirme crecer como persona. Estoy seguro que sin ti no habría tenido la fuerza ni la confianza para hacer muchas cosas. Te amo mucho.

Finalmente, y más importante, un enorme agradecimiento a mis padres, Martha Leticia Monroy Figueroa y Sergio Del Angel Reyes, que me han apoyado durante toda mi vida. Por todo lo que han hecho para sacarnos adelante a mis hermanas y a mí, cuando pienso en todo lo que hicieron y pasaron me sigue pareciendo increíble. Son un gran ejemplo que sigo todos los días.

Para que pueda ser he de ser otro, salir de mí, buscarme entre los otros, los otros que no son si yo no existo, los otros que me dan plena existencia. Octavio Paz

## INDICE

1. INTRODUCCIÓN	6
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1 Nanomateriales	7
2.2 Nanopartículas de dióxido de titanio (TiO2)	8
2.3 Efectos adversos del uso de Nanopartículas en la salud y en el medio ambiente	10
2.3.1 Efectos adversos de las Nanopartículas de TiO <sub>2</sub>	11
2.4 Técnicas de análisis de NPs	15
2.4.1 Espectrometría de masas	18
2.4.2 Detección de nanopartículas por SP-ICP-MS	25
2.5 Determinación y caracterización de nanopartículas en matrices complejas	32
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
4. OBJETIVOS	34
4.1 Objetivo general	34
4.2 Objetivos particulares	34
5. PARTE EXPERIMENTAL	35
5.1 Muestras de algas	35
5.2 Reactivos	35
5.3 Equipo	35
5.4 Software	36
5.5 Material	36
5.6 Metodología	36
5.6.1 Limpieza de material	36
5.6.2 Preparación de las muestras	36
5.6.3 Extracción de NPs de TiO $_2$ con TMAH asistido por ultrasonido	37
5.6.4 Digestión ácida asistida por microondas para cuantificación de titanio total	37
5.6.5 Medición de NPs de TiO2 por SP-ICP-MS	37
5.6.6 Medición de titanio total por ICP-MS	38
5.6.7 Análisis estadístico	38
6. RESULTADOS	41
6.1 Optimización de los parámetros de extracción de las NPs de TiO2	41
6.1.1 Concentración de TMAH	41
6.1.2 Volumen de la disolución de TMAH	41

6.1.3 Tiempo de ultrasonido	42
6.2 Evaluación de la estabilidad de las NPs de TiO2 a las condiciones de extracción seleccionadas	46
6.3 Rendimiento analítico	48
6.3.1 Evaluación del efecto matriz en la curva de calibración	48
6.3.2 Límite de detección y límite de cuantificación de la concentración de NPs de T	iO <sub>2</sub> 48
6.3.3 Límite de detección del tamaño de las NPs de TiO2	48
6.3.4 Repetibilidad	49
6.3.5 Recuperación analítica	49
6.3.6 Eficiencia de la extracción de NPs de TiO <sub>2</sub>	50
6.4 Aplicación	50
7. DISCUSIÓN	53
8. CONCLUSIÓN	55
9. REFERENCIAS	56

## 1. INTRODUCCIÓN

Este trabajo es el resultado de una estancia de investigación en el departamento de Química analítica de la Universidad de Santiago de Compostela, España donde se desarrolló un método para la extracción, determinación y caracterización de nanopartículas (NPs) de TiO<sub>2</sub> procedentes de algas con ayuda de Espectrometría de Masas de Plasma Acoplado Inductivamente con Detección de Partículas Individuales (SP-ICP-MS).

La SP-ICP-MS es un modo especifico de operación de ICP-MS que se utiliza para determinar el diámetro y la concentración del número de NPs metálicas. Uno de los principales inconvenientes en el uso de esta técnica es la dificultad de caracterizar NPs procedentes de matrices complejas, por lo que el desarrollo de métodos que permiten la extracción de estos nanomateriales es de principal importancia. Para el desarrollo del método se propuso el uso de Hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) asistido por baño ultrasonido para extraer las NPs de TiO<sub>2</sub> de muestras de algas. El TMAH es un compuesto que ha demostrado tener buenos resultados en la extracción de distintas NPs metálicas, como el Au y la Ag, en muestras de diversos tejidos biológicos y de plantas.

Se llevo a cabo la optimización de las condiciones de extracción (concentración del reactivo, volumen y tiempo de sonicación de las muestras) y posteriormente se realizó la evaluación de la metodología analítica (límite de detección y cuantificación, límite de detección del tamaño, recuperación analítica, repetibilidad y eficiencia del método). Finalmente, se aplicó la metodología propuesta a 5 muestras de algas frescas procedentes de las costas de Galicia, España.

## 2. MARCO TEÓRICO

## **2.1 Nanomateriales**

De acuerdo a la Iniciativa Nacional en Nanotecnología de los Estados Unidos (NNI por sus siglas en inglés) la nanotecnología es "la comprensión y el control de la materia a nanoescala, en dimensiones entre aproximadamente 1 y 100 nanómetros (nm)" (1). La Comisión Europea, por su parte, define el concepto de nanomaterial como un "material natural, incidental o fabricado que contiene partículas, en un estado no unido o como agregado o aglomerado y donde, para el 50% o más de las partículas en la distribución de tamaños numéricos, una o más dimensiones externas está en el intervalo de tamaños 1-100 nm" (2, 3). En este texto se hablará únicamente de las nanopartículas (NPs) fabricadas intencionalmente para su uso.

Es importante mencionar que las propiedades de los nanomateriales, como las NPs, difieren de las de su contraparte a granel. Las NPs muestran una gran área superficial y una alta relación superficie/volumen que aumenta a medida que disminuye el tamaño de las partículas. Otra característica importante es la cuantificación del tamaño: el tamaño de las NPs se sitúan en la región de transición entre átomos individuales y el estado en masa (4). Por lo tanto, las propiedades electrónicas, ópticas y químicas, así como las características mecánicas pueden diferir mucho. Tienen un alto contenido de electrones lo que provoca un aumento en el *bandgap* de los semiconductores, absorción óptica y fotoluminiscencia. Además, propiedades como la elasticidad, dureza y ductilidad también cambian (5).

La clasificación de las NPs es variada. Se pueden clasificar de acuerdo a su origen, tamaño, forma, composición, recubrimientos específicos o método de síntesis, entre otras (Tabla 1). Los métodos para la síntesis se suelen agrupar en dos categorías: "top-down" y "bottom-up". El primero implica la división de un material sólido macroscópico en porciones más pequeñas, de tamaño nano. El segundo, las estructuras a nanoescala se construyen a partir de componentes atómicos y moleculares mediante auto-ensamblaje. Este último es mucho más popular en la síntesis de NPs (4).

Actualmente el uso de las NPs es un campo muy prometedor en la ciencia y tecnología. Debido a sus características particulares se han explotado en una multitud de industrias y modalidades de tratamiento (6). Las NPs tienen aplicaciones en medicina (7),

productos electrónicos como celdas solares (8), la industria textil (9), química (10, 11), cosmética, farmacéutica y tratamiento de aguas residuales (12, 13), entre otras. Se han utilizado NPs para inducir apoptosis en células cancerígenas de pulmón (14), así como en bioensayos para la detección de biomoléculas, identificación de dianas farmacéuticas, codificación de sustratos, separación, purificación y concentración de muestras biológicas (15, 16). En agricultura, se ha reportado el uso de NPs en germinación, crecimiento, protección y producción de plantas, así como para la detección de residuos de pesticidas y patógenos vegetales (17).

En 2005 el *Woodrow Wilson International Center for Scholars and the Project on Emerging Nanotechnology* creó el Inventario de productos de consumo de nanotecnología (CPI por sus siglas en inglés) donde listaba un total de 54 artículos en el mercado que contenían NPs. Para el 2014 ya se reportaban más de 1800 productos (18); esto nos habla del rápido crecimiento en su uso que ha tenido en los últimos años. En la Tabla 1 se muestran las principales aplicaciones de las NPs.

## 2.2 Nanopartículas de dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>)

Las NPs de TiO<sub>2</sub> son importantes nano-objetos industriales con amplias aplicaciones. Actualmente se encuentran entre los nanomateriales más fabricados en la industria (19, 20). De las características más importantes de estas NPs es su capacidad foto-catalítica y de absorción de la luz ultravioleta lo que las hace idóneas para su uso en protectores solares y cosméticos (21). También son ampliamente usadas como pigmento blanco en la fabricación de pinturas, alimentos, papel y pasta de dientes, al igual que en la fabricación de plásticos, como adyuvante en la composición de píldoras farmacéuticas, aplicaciones antimicrobianas, catalizadores para purificación de aire y agua, aplicaciones médicas y almacenamiento de energía (22). De acuerdo a Jovanović, 2015 aproximadamente 36% del TiO<sub>2</sub> en la comida constituye NPs (23).

Dentro de su uso en la industria alimentaria los productos con el mayor contenido de  $TiO_2$  incluyen dulces, caramelos, chicles, chocolates, productos a base de leche en polvo y productos con glaseado blanco o coberturas de azúcar en polvo; lo que nos alerta de la exposición a estas NPs desde edades muy tempranas (22). Por citar algunos ejemplos de dulces comerciales con mayor cantidad de NPs de TiO<sub>2</sub> en el mercado tenemos: Dickinson's®

*Coconut Curd*, Mentos® *freshmint gum*, *M*&*Ms*® de chocolate, Betty Crocker<sup>™</sup> Whipped *Cream Frosting* y Nestle® *Original Coffee Creamer*.

Tabla	1.	Clasificación	у	principales	aplicaciones	de	las	nanopartículas.	Modificada	de
López-	Sei	rrano, 2014.								

Nanonartícula	Composición	Anlicación	Descrinción	
Tranoparticula	química	Apricación	Descripcion	
		Medio ambiente	Adsorción de contaminantes en sitios	
Nanotubos de	Carbón puro		contaminados	
carbono			Aumento de la tasa de crecimiento de	
			las plantas	
		Energética	Medios alternativos de almacenamiento	
			de energía	
		Construcción	Aumentar la resistencia de los	
			materiales para construir naves	
			espaciales, elevadores espaciales,	
			músculos artificiales y vehículos	
			terrestres y marítimos	
		Medica	Reactividad selectiva con ciertas	
			biomoléculas	
Fullerenos	Carbón puro	Médica	Reactividad selectiva para actividad	
			antiviral	
Poliuretano	Poliuretano	Medio ambiente	Remediación de suelos contaminados	
anfifílico			con hidrocarburos aromáticos	
			policíclicos	
	TiO <sub>2</sub> y ZnO	Cosméticos	Filtro de radiación UV	
Óxidos de metal	TiO <sub>2</sub>	Construcción de	Capacidad foto-catalítica de materiales	
		edificios	semiconductores	
	Sílice	Construcción de	Aumentar la resistencia de los	
		edificios	compuestos cementosos	
	TiO <sub>2</sub>	Industria de la	Pigmentos blanqueadores	
		pintura		
	TiO <sub>2</sub>	Medio ambiente	Aumenta el crecimiento y la fuerza de	
			las plantas	
	CeO	Energética	Catalizadores que aumentan la	
			eficiencia del combustible	

	CuO y Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Energética	Mejora de la conductividad térmica
	CuO	Energética	Catálisis
			Propiedades super paramagnéticas
	Óxidos de fierro	Biomédica	Sensores para detección microbiana
Quantum dots	CdSe	Diagnóstico	Propiedades luminiscentes para
(QDs)		médico	etiquetado de bacterias
	CdS	Imagen biomédica	Biomarcadores
	CdSe/ZnS		Fluorescencia bioactiva: aplicaciones en
			inmunoensayos
Nanopartículas	Ag	Productos de	Propiedades antimicrobianas
metálicas		consumo	
		Sensores	Resonancia del plasmón de superficie
			localizada
		Biomédica	Actividad antibacteriana
	Au	Sensores	Resonancia del plasmón de superficie
		Estudios	Conjugación con biomoléculas
		proteómicos	
	Fe	Ambiental	Detoxificación de contaminantes
			orgánicos
Polímeros	Alginato/chitosán	Biomédica	Liberación controlada de fármacos
		Agroindustrial	Compuestos bioactivos encapsulados,
			adsorbidos o dispersos que mantienen
			su estructura, actividad y liberación
			durante más tiempo

## 2.3 Efectos adversos del uso de Nanopartículas en la salud y en el medio ambiente

La gran cantidad de aplicaciones de las NPs, su producción en masa y su inclusión a muchos productos comerciales de uso común, aumenta la probabilidad de exposición crónica a causa de su ingesta y de su liberación al medio ambiente. Se ha reportado que las características que le dan a las NPs sus propiedades que las hacen tan útiles también son responsables de los efectos nocivos en la salud humana y en el medio ambiente (24). Las NPs son liberadas como resultado de su producción, derrames, uso del producto que las contiene o degradación del material después del consumo, lo que incrementa el riesgo del desarrollo de efectos adversos. Sin embargo, la comprensión de la toxicidad potencial de estas NPs sigue siendo escasa debido a la inexistencia de métodos específicos para su caracterización y cuantificación en

distintas muestras (25). Por otro lado, las NPs una vez liberadas al medio ambiente pueden aglomerarse, asociarse con otras partículas tóxicas, acumularse dentro de otros organismos, entrar en la cadena alimenticia o en fuentes de agua potable, lo que dificulta aún más evaluar el riesgo en su utilización (26).

#### 2.3.1 Efectos adversos de las Nanopartículas de TiO<sub>2</sub>

Szymanska et al., 2016 estimaron que la producción mundial por año de NPs de TiO<sub>2</sub> era de 10 000 toneladas métricas (27). La liberación de estas NPs al ambiente puede variar dependiendo de los siguientes factores: el stock de NPs en el artículo, su vida útil, la forma en que las NPs se incorporan al material y el uso del producto (28). En la Tabla 2 se hace un análisis del flujo de sustancias de distintos productos para la liberación de NPs de TiO<sub>2</sub>.

La toxicidad y efectos adversos causados por la exposición a NPs es heterogénea dependiendo de la fuente y vía de exposición. Hay dos tipos principales de exposición: exposición externa, biodisponibilidad de NPs en el entorno circundante de un organismo; y exposición interna, NPs que han sido tomadas por el organismo y pueden ser metabolizadas y transferidas a diferentes órganos y tejidos (5).

El cuerpo humano está expuesto a estas NPs a través de distintos mecanismos como son: exposición dérmica, cutánea, intradérmica, nasal, oral; inhalación; inyección intraperitoneal, subcutánea, intramuscular e intravenosa; exposición pre-natal; y administración intragástrica y abdominal, solo por nombrar algunas (29). Ya sea a través de aplicaciones medicinales, la contaminación del aire ambiental, exposición ocupacional, o cualquier otra fuente desencadenada por la gran diversidad de usos de las NPs de TiO<sub>2</sub> que se mencionaron anteriormente. Tan solo en Reino Unido se tiene estimado que la ingesta de NPs de TiO<sub>2</sub> en un adulto de 75 kg puede alcanzar 0.36 mg/Kg de peso corporal por día (30).

**Tabla 2.** Análisis del flujo de sustancias de distintos productos para la liberación de NPs de TiO2. Plantas de tratamiento de aguas residuales (PTR), Plantas de incineración de residuos (PIR). Modificada de Muller & Nowack, 2008.

Categoría del producto	% de la cantidad total	Forma de liberación	%	Liberación
Plásticos	2	Abrasión	5	Aire (50%), PIR
				(50%)
		Desecho	95	PTR
Cosméticos	60	Aplicación	95	PIR
		Desecho	5	PTR
Recubrimientos	2	Aplicación	95	PIR
		Desecho	5	PTR
Metales	1	Abrasión	5	PIR
		Reciclaje	90	PIR
		Desecho	5	PTR
Almacenamiento/ producción	10	Desecho	25	PTR
de energía		Reciclaje	75	PIR
Pintura	25	Desgaste	50	PIR (50%),
				suelo (50%)
		Desecho	50	Sitio de
				deposito

Las NPs de TiO<sub>2</sub> tienen el potencial de ser toxicas en células y tejidos (31). Hou et al., 2019 reportaron que los mecanismos de toxicidad de las NPs de TiO<sub>2</sub> en múltiples taxones de microorganismos, algas, plantas, invertebrados y vertebrados se pueden delimitar en tres aspectos: las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) producidas por las NPs de TiO<sub>2</sub> después de la inducción de pares de agujeros de electrones (EHP, por sus siglas en inglés); daño de la pared celular y peroxidación lipídica de la membrana celular causada por la unión de las NPs a la célula por la fuerza electrostática debido a la gran área superficial de las NPs de TiO<sub>2</sub>; y unión de las NPs de TiO<sub>2</sub> a organelos intracelulares y macromoléculas biológicas después del daño a las membranas celulares (32).

En grandes rasgos la toxicidad de estas NPs en algas y plantas son concentracióntiempo dependientes. Afecta en el crecimiento de plantas y captación de nutrientes del suelo. En algas disminuye la concentración de clorofila, lo cual afecta su capacidad fotosintética (33). Ahora se reconoce que algunas NP modificadas afectan el desarrollo y el rendimiento de los cultivos, y muchos de ellos se acumulan en los tejidos de las plantas, incluidos los tejidos comestibles. La absorción y acumulación de NPs son de gran preocupación porque proporcionan una vía potencial para la exposición humana (34).

Debido a su uso *in vivo* la interacción con las células del sistema inmune es inherente. Se ha demostrado que distintas características de las NPs, entre los que se encuentran el tamaño, la carga, concentración, composición del núcleo, la estructura molecular del agente de protección y el tiempo de exposición, tienen el potencial de inducir efectos inmunomoduladores e inmuno-tóxicos (35). En la Tabla 3 se muestran algunas de las interacciones de las NPs de TiO<sub>2</sub> con el sistema inmune y sus consecuencias.

Oberdörster et al. 1994, observaron que la exposición a partículas ultra finas (20 nm) de TiO<sub>2</sub> en ratas y ratones provocaba una reacción inflamatoria persistentemente alta en los pulmones en comparación con la exposición a partículas de mayor tamaño (250 nm) en el período posterior a la exposición (36). Las propiedades dependientes del tamaño de las NPs aumentan la superficie de contacto lo que aumenta la posibilidad de interacciones inadecuadas con componentes intracelulares que genera citotoxicidad y genotoxicidad (37).

Se han reportado distintos trabajos respecto a los efectos adversos causadas por la exposición de distintas NPs en el sistema cardiovascular, sistema respiratorio y otros órganos periféricos (6). Estudios recientes han revelado que el riesgo a la salud debido a la exposición oral de NPs de TiO<sub>2</sub> provenientes de la comida, pasta dientes o productos farmacéuticos es posible, teniendo efectos directos en hígado, órganos reproductores (30), así como en el incremento de glucosa en plasma (38). En un experimento con ratas en gestación se reportó que la exposición a dosis altas de TiO<sub>2</sub> incrementó las concentraciones de titanio en hígado materno, cerebro materno y placenta (39).

Estos datos, tomados en conjunto, indican que la exposición a NPs de TiO<sub>2</sub> posee el potencial de causar un daño tanto a la salud humana como al medio ambiente. Al mismo tiempo, estas NPs pueden llegar al mar y/o ser ingeridas o internalizadas por distintas especies. Es necesario más investigación al respecto para conocer el impacto en condiciones reales del uso de estas NPs, al igual que desarrollar más y mejores métodos de extracción y cuantificación, para de esta manera poder tener una mejor regulación en su utilización.

Animal de	nimal de		Deferencia
estudio	estudio		Kelerencia
Ratas Sprague-	0.5-32 mg/Kg intra-	Cambios patológicos en bazo y nodos	(40)
Dawley	traqueal	linfáticos	
		Congestión y acumulación de partículas	
		marrones en bazo y nodos linfáticos	
		↑ Células T y B en bazo y en circulación	
		↑ Actividad de células NK	
	0, 10, 50 y 200 mg/Kg	Ruptura de la doble cadena de ADN en	(41)
	intragástrica	células de médula ósea	
Ratones hembra	5, 50 y 150 mg/Kg	Proliferación y congestión de nódulos	(42)
	intragástrica	linfáticos en el bazo	
		↑ ROS en bazo	
		↑ Peroxidación lipídica	
		↑ Expresión de Hemo oxigenasa 1	
	2.5-10 mg/Kg	Infiltración de macrófagos y apoptosis en	(43)
	Gástrica	bazo	
		↓ CD3+, CD4+, CD8+ y células B	
		↑ Expresión de genes que regulan la	
		respuesta inflamatoria, apoptosis,	
		proliferación celular, el citoesqueleto,	
		diferenciación celular y transporte de	
		iones	
	10 mg/Kg intragástrica	Acumulación de NPs en tejido hepático y	(44)
		en núcleos de hepatocitos	
		Severa respuesta inflamatoria del hígado	
		y apoptosis de los hepatocitos	
	5, 10 y 50 mg/Kg	↑ ARNm y expresión de proteínas	(45)
	intragástrica	proinflamatorias (TLR2, TLR4, NF-κB y	
		TNF-α)	
		↓ ARNm y expresión de la proteína IL-2	
		Apoptosis de hepatocitos	
		Daño en función hepática	
Ratones ICR	0.5-50 mg/Kg	↑ de IL-1, TNF-α, IL-6, IL12, IL-4, IL-5,	(46)
		IL-10 en tejido pulmonar	

	Instilación intra-	Proliferación de células B		
	traqueal	↑ IgE en BALF* y en sangre		
		Formación de granuloma en tejido		
		pulmonar		
		↑ expresión de proteínas pro-		
		inflamatorias (MIP y MCP) en tejido		
		pulmonar		
Ratones machos	2.5, 5 y 10 mg/Kg	Acumulación de titanio en hígado	(47)	
	instilación forzada	↓ Peso del animal		
	(gavage)	↑ Disfunción hepática		
		Infiltración de células inflamatorias en		
		hígado		
		Necrosis y apoptosis de hepatocitos		
Fibroblastos de	0, 5, 10, 20, 50 y 100	↓ Viabilidad celular	(41)	
pulmón (hámster	μg/mL	Daño en el ADN		
chino)		Mutación genética		
Modelo in vitro	0.05-100 mM	↓ Viabilidad celular	(48)	
de sistema		↑ Citoquinas proinflamatorias		
Inmune humano		↑ Expresión y maduración de moléculas		
		coestimuladoras de células dendríticas		
		↑ Proliferación de células T CD4+		

## 2.4 Técnicas de análisis de NPs

Ya se ha comentado que las características únicas de las NPs son las que las hacen tan atractiva para su utilización, pero al mismo tiempo son las responsables de los efectos adversos provocados en humanos y medio ambiente. Por esta razón es importante su cuantificación y caracterización.

Para realizar el análisis de una especie que no sea una NP, la información solicitada puede ser cuantitativa y/o cualitativa, también se incluye la caracterización de las especies químicas. Sin embargo, cuando se trata del análisis de una NP individual se requiere un enfoque diferente que en la medición de elementos disueltos. La información cuantitativa puede expresarse como concentración molar, pero también como concentración del número de NPs, y en la información cualitativa se debe reportar tanto la caracterización química, del núcleo y del recubrimiento, como la caracterización física, que incluye tamaño, distribución

del tamaño, forma, carga de la superficie y estado de agregación/aglomeración (49). En la Tabla 4 se muestran las técnicas analíticas y métodos más actuales que se utilizan en la cuantificación y caracterización de las NPs.

Para el análisis de NPs inorgánicas, la técnica más adecuada que proporciona la información de las características mencionadas anteriormente es la espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente operado en modo de detección de partículas individuales (SP-ICP-MS) (50). La ICP-MS tradicional es una técnica analítica que proporciona un análisis elemental rápido a concentraciones ultra traza (ng/L). Esta técnica detecta los iones metálicos en función de su relación de masa/carga y asigna una lectura de intensidad que se correlaciona con la cantidad de metal que se detectó durante un intervalo de tiempo específico. La concentraciones de metal conocidas (51).

**Tabla 4.** Técnicas analíticas para el análisis de nanopartículas. (Modificada de Laborda et al., 2016).

Técnico	LOD del	LOD de	Información analítica	
Tecnica	tamaño	concentración	Información analítica	
Microscopia electrónica				
Microscopia electrónica de			Tamaño (promedio y distribución)	
transmisión (TEM)			Forma	
	<1 nm	-	Composición elemental	
			Estructura química	
			Estructura cristalina	
Microscopia electrónica de			Tamaño (promedio y distribución)	
barrido de emisión de	1 nm	-	Forma	
campo (FESEM)			Composición elemental	
Microscopía electrónica de	30 nm	10 <sup>12</sup> I -1	Tamaño (promedio y distribución)	
barrido ambiental (ESEM)	50 mm	IU L	Forma	
Dispersión de la luz				
Análisis de seguimiento de	20 nm	10 <sup>9</sup> I <sup>-1</sup>	Tamaño (promedio y distribución)	
nanopartículas (NTA)	20 1111		Concentración del número de NPs	
Espectrometría atómica				

Espectrometría de masas de			Composición del elemento (producto
plasma acoplado	-	ng L <sup>-1</sup>	a granel)
inductivamente (ICP-MS)			Concentración total de la masa
Single particle ICP-MS			Detección del elemento disuelto/NP
(SP-ICP-MS)			Masa del elemento por NP (promedio
	10.20 nm	$10^{6} L^{-1}$	y distribución)
	10-20 IIII	ng L <sup>-1</sup>	Tamaño (promedio y distribución)
			Concentración del número de NPs
			Concentración de masa
Espectroscopia de absorción			Composición química
de rayos X (XAS)	-	mg Kg <sup>-1</sup>	Identificación/distribución
			cuantitativa de las especies químicas
Técnicas de separación	1		
Fraccionamiento de flujo de		1-10 µg L <sup>-1</sup> AF4-	Detección de elementos complejos y
campo asimétrico (AF4)		ICP-MS	de NPs
	1-5 nm	0.1 mg L <sup>-1</sup> AF4-	Tamaño (promedio y distribución)
	1.5 mm	UV-Vis	Concentración de masa
		1 mg L <sup>-1</sup> AF4-	Detección del elemento disuelto/NP
		DLS	
Electroforesis capilar (CE)		0.2 µg L <sup>-1</sup> CE-	Detección de elementos complejos y
	5 nm	ICP-MS	de NPs
			Tamaño (promedio y distribución)
			Concentración de masa
Cromatografía			Detección de elementos complejos y
hidrodinámica (HDC)	5 nm	1 μg L <sup>-1</sup> HDC-	de NPs
		ICP-MS	Tamaño (promedio y distribución)
			Concentración de masa
Técnicas electro-analíticas			
Voltamperometría de			Composición del elemento
partículas inmovilizadas	10 nm	ия I -1	Estado de oxidación
(VIP)	10 1111	μ5 Ε	Tamaño (promedio)
			Concentración de masa
Coulometría de colisión de			Detección de las NPs
partículas (PCC)	5 nm	$10^{10} L^{-1}$	Tamaño (promedio y distribución)
			Concentración de la masa

#### 2.4.1 Espectrometría de masas

#### 2.4.1.1 Fundamentos de la espectrometría de masas (52)

La espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) es una técnica muy utilizada para la determinación simultanea de más de 70 elementos. En la Figura 1 se muestra un diagrama de bloques de un instrumento de ICP-MS típico. Los iones formados en el plasma se introducen en el analizador de masas, donde se clasifican según su relación masa/carga y se detectan.



**Figura 1.** Diagrama de bloques de un espectrómetro de masas con ICP. (Extraído de Skoog et all., 2008).

La determinación espectroscópica de especies atómica sólo puede efectuarse en un medio gaseoso, donde están muy separadas entre sí los átomos o iones elementales. Por consiguiente, el primer paso en todo procedimiento de espectroscopia atómica es la atomización, proceso en el que una muestra se volatiliza y descompone de manera que se produzcan átomos e iones en fase gaseosa. El plasma acoplado inductivamente es el que se utiliza en este caso.

## 2.4.1.2 Sistemas de introducción de muestras

Los dispositivos de atomización son de dos clases, atomizadores continuos y atomizadores discretos. Para la introducción de la muestra la nebulización directa es la más empleada. En ella, el nebulizador introduce constantemente la muestra, en la forma de un fino rocío de microgotas, llamado aerosol. Los procesos que deben ocurrir para que se produzcan átomos libres o iones elementales se detallen en la Figura 2.



**Figura 2.** Procesos que conducen a átomos, moléculas e iones con la introducción de muestras continuas en un plasma o llama. La muestra en disolución se convierte en spray mediante el nebulizador. La temperatura alta de la llama o plasma hace que se evapore el disolvente, con lo que quedan partículas en aerosol seco. El calor adicional volatiliza esas partículas y produce especies atómicas, moleculares e iónicas. Es frecuente que las especies se encuentren en equilibrio, al menos en regiones localizadas. (Extraído de Skoog et all., 2008).

## 2.4.1.3 Nebulizador

Las muestras pueden introducirse en el ICP mediante un flujo de argón con un caudal cercano a 1 L/min a través del tubo de cuarzo central. Es posible que se trate de un aerosol, un vapor generado térmicamente o un polvo fino. El medio más común de introducción de muestras es el nebulizador de vidrio concéntrico (Figura 3). La muestra se transporta a la punta gracias al efecto de Bernoulli. Este proceso se denomina aspiración. El gas a alta velocidad disgrega el líquido en finas gotas de diversos tamaños que se condice al plasma.

Otro tipo de nebulizador muy utilizado es el que posee un diseño de flujo cruzado. En este caso, un gas fluye a alta velocidad a través de la punta de un capilar en ángulo recto, lo que produce el mismo efecto Bernoulli. En este tipo de nebulizador, es frecuente que el líquido se bombee por el capilar con una bomba peristáltica. Existen otros muchos otros tipos de nebulizadores que consiguen una alta eficiencia de nebulización, para nebulizaciones de muestras con alto contenido de sólidos y para producción de nieblas ultrafinas.



**Figura 3.** Nebulizador de Meinhard. El gas nebulizador fluye por un orificio que rodea de manera concéntrica al capilar. Esto origina una menor presión en la punta y la aspiración de la muestra. En la punta, el gas a alta velocidad disgrega la solución en una niebla o spray de gotitas de distintos tamaños. (Extraído de Skoog et all., 2008).

## 2.4.1.4 Fuentes de plasma

Por definición, un plasma es una mezcla gaseosa conductora que posee una concentración significativa de cationes y electrones. En el plasma de argón, empleado comúnmente, los iones y electrones de argón son la principal especie conductora, si bien contribuyen también los cationes de la muestra. Los iones de argón formados en el plasma pueden absorber suficiente energía de la fuente externa como para mantener la temperatura en un nivel tal que la ionización adicional mantiene indefinidamente al plasma, con temperaturas hasta de 10 000 K.

Son tres las fuentes de potencia utilizadas en la espectroscopia de plasma de argón. Una es la fuente de corriente continua que sostiene una corriente de varios amperios entre electrodo sumergidos en el plasma de argón. Las otras dos son potentes generadores de radiofrecuencia y microondas, por las que fluyen el argón. De estas tres fuentes, la de radiofrecuencia, o plasma acoplado inductivamente (ICP), ofrece mayores ventajas en cuanto a sensibilidad y ausencia de interferencias.

## 2.4.1.5 Plasma acoplado inductivamente

El plasma acoplado inductivamente (Figura 4) consta de tres tubos concéntricos de cuarzo, a través de los cuales las corrientes de argón fluyen a un caudal total de 11-17 L/min. El diámetro del tubo más grande es de unos 2.5 cm. Alrededor de su extremo superior, se encuentra un serpentín de inducción enfriado por agua, alimentado con un generador de radiofrecuencia que puede producir alrededor de 2 kW de energía a 27 0 40 MHz. La ionización del argón en flujo se inicia con una chispa de una bobina Tesla. Los iones resultantes y los electrones acompañantes interactúan con el campo magnético fluctuante (H en la Figura 4) producido por la bobina de inducción I. Esta interacción hace que los iones y electrones de la bobina fluyan en los trayectos anulares marcados en la Figura 4. El calentamiento óhmico es la consecuencia de su resistencia a dicho movimiento.

La temperatura del ICP es lo suficientemente alta para que se deba aislar térmicamente del cilindro de cuarzo. El aislamiento se logra al hacer que una corriente de argón fluya de manera tangencial por las paredes del tubo. El flujo tangencial enfría el interior de la pared del tubo central y hace que el plasma se centre radialmente.

Si se observa el plasma en ángulo recto, se habla de geometría de observación radial. En instrumentos de ICP recientes, se incluye una geometría de observación axial en la que se gira 90° la antorcha. Esta segunda geometría se utilizó mucho originalmente en antorchas empleadas como fuentes de ionización en espectrometría de masas, ya que era fácil extraer los iones del extremo superior de la antorcha hacia la región del alto vacío del espectrómetro de masas. La geometría radial proporciona mayor estabilidad y precisión, mientras que la axial se utiliza para lograr límites de detección más bajos.

21





## 2.4.1.6 Aspecto y espectro de un plasma

El plasma tiene una base central opaca blanca brillante y muy intensa, coronada por una cola en forma de llama. La base central, que se extiende unos cuantos milímetros por encima del tubo, produce una serie continua espectral con el espectro atómico del argón sobrepuesto. Esta serie continua es característica de las reacciones de recombinación de iones-electrones y del *bremsstrahlung*, que es la radiación continúa producida cuando se desaceleran o detienen partículas con cargas.

En la región situada a 10-30 mm por encima de la base central, el continuo se desvanece y el plasma se vuelve ligeramente transparente. Las observaciones espectrales se realizan por lo general a 15-20 mm por encima de la bobina de inducción, donde la temperatura puede ser tan alta como 5000-6000 K. Aquí, la radiación de fondo consta principalmente de líneas de Ar, emisión de bandas de OH y algunas otras bandas moleculares. Muchas de las líneas de analitos más sensibles en esta región del plasma corresponden a iones como Ca<sup>+</sup>, Cd<sup>+</sup>, Cr<sup>+</sup> y Mn<sup>+</sup>. Por encima de esta segunda región, la "llama de cola" puede

observarse cuando se introducen elementos fáciles de excitar, como el sodio o el cesio. Las temperaturas en esta región son similares a las de una llama común ( $\approx$ 3000 K). Esta región de temperatura más abaja puede emplearse para determinar elementos de fácil excitación, como los metales alcalinos.

#### 2.4.1.7 Atomización e ionización del analito

Para cuando los átomos e iones del analito alcanzan el punto de observación en el plasma, han estado en él unos 2 ms, a temperatura de 6000-8000 K. Estos tiempos y temperaturas son dos o tres veces mayores que los alcanzables en las llamas de combustión más calientes (acetileno/óxido nitroso). Como consecuencia, la desolvatación y vaporización son completas y la eficiencia de atomización es muy alta. Los efectos de interferencias por ionización son pequeñas o inexistentes, ya que la concentración alta de electrones de la ionización del argón mantiene una concentración de los mismos más o menos constantes en el plasma.

Dentro de las ventajas asociadas al ICP en comparación con las llamas y otras fuentes de plasma se encuentran que la atomización ocurre en un ambiente químicamente inerte, en contraste con las llamas, donde el ambiente es violento y muy reactivo. Además, la sección transversal de temperatura del plasma es relativamente uniforme. El plasma tiene también la longitud de trayecto óptico más bien fina, lo que minimiza la autoabsorción y, en consecuencia, las curvas de calibración suelen ser lineales para varios órdenes de magnitud en concentración. Una desventaja significativa del ICP es su limitada tolerancia a los disolventes orgánicos. Los depósitos de carbono tienden a acumularse en el tubo de cuarzo, con lo que pueden originar contaminación cruzada y taponamiento.

#### 2.4.1.8 Interfase del espectrómetro de masas

Existe un problema importante en la extracción de iones del plasma. Si bien el ICP funciona a presión atmosférica, el espectrómetro de masas lo hace a alto vacío, normalmente a menos de  $10^{-6}$  torr. La región de interfase entre el ICP y el espectrómetro es una zona crítica pues se necesita asegurar que una fracción sustancial de los iones producidos se transporte al analizador de masas. Por lo general, la interfase consta de dos conos metálicos, llamados muestreador y skimmer. Cada uno de estos conos tiene un pequeño orificio ( $\approx 1$  mm) que

permite el paso de los iones por los elementos ópticos iónicos, que los llevan hacia el analizador de masas.

#### 2.4.1.9 Analizador de masas

Los analizadores de masas más utilizados en ICP-MS son los cuadrupolos, los de sector magnético y los analizadores de doble enfoque; pero también se emplean los de tiempo de vuelo. El analizador de masas cuadrupolo consta de cuatro rodillos (Figura 5). Estos analizadores son básicamente filtros de masas que permiten sólo el paso de iones con cierta relación de masa/carga (m/z). El movimiento del ion en el campo eléctrico es la base de la separación. Los rodillos opuestos se conectan con voltajes de corriente continua y radiofrecuencia (rf). El ajuste correcto de los voltajes crea un trayecto estable para los iones con cierta proporción de masa/carga, en si paso por el analizador hacia el detector. El espectro de masas se obtiene al barrer los voltajes aplicados a los rodillos.



Figura 5. Analizador de masas de cuadrupolos. (Extraído de Skoog et all., 2008).

## 2.4.1.10 Transductores

Los transductores más empleados en ICP-MS son los multiplicadores de electrones. En el multiplicador discreto de electrones de dínodo los electrones llegan a un cátodo, donde se emiten electrones secundarios. Estos son atraídos a dínodos, donde cada uno tiene un voltaje positivo cada vez más alto. Existen multiplicadores de electrones de hasta 20 dínodos. Estos dispositivos permiten multiplicar la intensidad de la señal por un factor de hasta 10<sup>7</sup>.

# **2.4.1.11 Interferencias en la espectrometría de masa de plasma acoplado inductivamente**

Las interferencias en ICP-MS son de dos tipos: interferencias espectroscópicas y efecto de matriz. Las primeras ocurren cuando una especie iónica del plasma tiene el mismo valor m/z que el ion del analito. Muchas de estas interferencias provienen de iones poliatómicos, elementos que tienen radioisótopos cuya masa es esencialmente la misma, iones de carga doble e iones de óxidos refractarios. En su mayor parte, se pueden eliminar o reducir con espectrómetros de alta resolución.

Los efectos de matriz se vuelven más notables a concentraciones mayores de 500-1000  $\mu$ g/mL. Es habitual que estos efectos reduzcan la señal del analito, si bien en ocasiones se observa su intensificación. Por lo general, se trata de efectos que pueden minimizarse con la dilución de la muestra, alteración del procedimiento de introducción o separación de la especie interferente.

## 2.4.2 Detección de nanopartículas por SP-ICP-MS

En SP-ICP-MS se trabaja comúnmente con muestras en estado líquido o en disolución. Las muestras son introducidas al equipo de la misma manera que en un ICP-MS convencional usando un sistema de nebulización. Las NPs presentes en la muestra se atomizan y ionizan igualmente y los iones generados pasan a través de la interfaz del ICP-MS donde son separados de acuerdo con su relación masa/carga (m/z) con ayuda del cuadrupolo. Posteriormente, son detectados.

Para comprender el análisis de partículas individuales con SP-ICP-MS la clave está en entender la forma en que se obtienen los datos en comparación con muestras de elementos disueltos. Stephan et al., 2014 explican que cuando un analito contiene elementos en disolución, al ser medido en el ICP-MS, los iones generados en el plasma producen un flujo continuo de electrones que entran al cuadrupolo. La señal resultante es constante y en estado estable (*steady-state signal*). Por otro lado, cuando se analizan NPs, los iones que se generan forman una corriente que no está distribuida homogéneamente (grupos de átomos discretos). La señal resultante es una serie de picos, cada uno originado por una NP (50). La Figura 6 muestra un dibujo esquemático de este principio.



**Figura 6.** Comparación entre el análisis de (A) elementos disueltos y (B) nanopartículas con ICP-MS. En la primera, la lectura es continua. En la segunda, cada nanopartícula es detectada individualmente (cada pico es una NP). (Modificada de Stephan et all., 2014 y Witzler et all., 2016).

La cantidad de tiempo que gasta el cuadrupolo analizando cada m/z antes de pasar a la siguiente m/z se define como "dwell time" (DT). La cantidad de tiempo que requiere el equipo para estabilizarse antes de realizar la siguiente medición se conoce como "settling time" (ST). El factor más importante cuando se miden partículas individuales (NP) es la velocidad en la que los datos son adquiridos. El DT y el ST juntos definen la velocidad de adquisición de datos transitorios (VADT). Cuanto más rápida sea la VADT, más adecuado será el sistema para el análisis de partículas individuales. Es importante tomar en cuenta que una cantidad significativa de la señal se pierde debido al ST si este no se ajusta adecuadamente. Por ejemplo, si la nube de iones llega al detector durante este periodo no podrá ser detectada. Por el contrario, si cae dentro del DT, será medida correctamente (Figura 7). Es muy importante que el ICP-MS pueda adquirir señales en un DT que sea más corto que el ST, evitando así las señales falsas generadas por la integración parcial de partículas, la coincidencia de partículas y los aglomerados/agregados. La situación ideal cuando se trabaja con SP-ICP-MS es aquella en la que todo el tiempo se esté buscando NPs, es decir, en la que no exista el ST y cada partícula que entre al plasma sea cuantificada.



**Figura 7.** Velocidad de adquisición de los datos transitorios. (A) Señal de una NP fuera del Dwell time, por lo tanto, no detectada. (B) Pulso de una NP dentro del Dwell time, por lo tanto, detectada.

En la Figura 8 se muestra la respuesta de los distintos efectos que pueden provocar el ST y el DT en la medición de NPs. La parte de arriba de la Figura representa las NPs y como se relacionan con el VADT, mientras que la parte inferior representa la respuesta del espectrómetro de masas. En la Figura 8a, dos NPs son detectadas al mismo tiempo provocando una respuesta tal como si una partícula de mayor tamaño hubiera sido detectada. Esta es una situación no deseable y ocurre cuando el DT dura más tiempo que el flujo de las NP. La Figura 8b ilustra la situación deseada cuando solo una NP es detectada por vez, la intensidad de la señal es la mitad que la observada en la Figura 8a. La Figura 8c muestra otra situación no deseada cuando la NP es detectada parcialmente, provocando una intensidad de la señal es la situación menos deseable de todas en la que la NP no es detectada.

Para evitar estos errores en la medición de NPs Stephan et al., 2014 y Abad-Alvaro et all., 2016 también nos habla de la importancia de tener una capacidad rápida y continua de adquisición de datos (aprox. un DT de 100 μs), donde los datos se recopilan continuamente sin ningún ST (50, 53). Cuando se tiene una adquisición de datos continua, múltiples puntos pueden ser medidos en cada partícula, así eliminas la posibilidad de perderlas o que solo una porción de estas sea detectada, lo que da como resultado determinaciones de tamaño más precisas (Figura 9). En la Figura 9c, la señal de una partícula es medida varias veces, por lo tanto, es definida por varios puntos. Cuando se detectan varias NPs, la señal resultante son

una serie de segmentos que definen a la partícula (Figura 9b). Después, estas respuestas típicas de partículas individuales pueden convertirse en picos (pulsos) que definen una sola partícula (Figura 9a). Es importante tomar en cuenta que cuando se trabaja en SP-ICP-MS se tiene que hacer con muestras lo suficientemente diluidas para asegurar aún más que solo sea detectada una NP por lectura.



**Figura 8.** Efecto de la velocidad de adquisición de datos transitorios en la medición de NPs. A) Dos partículas son detectadas. B) Una partícula es detectada. C) Solo una porción de la partícula es detectada. D) La partícula no es detectada.



**Figura 9.** Capacidad de adquisición rápida y continua de datos por partícula. A) Picos que representan una sola partícula. B) Múltiples partículas detectadas en serie. C) Partícula definida por varios puntos (múltiples mediciones).

#### 2.4.2.1 Principios básicos

Para poder determinar la concentración del número de NPs, el tamaño y la masa del analito por NP con ayuda de SP-ICP-MS Laborda et al., 2014 explica que teniendo en cuenta que cada pulso representa sola una NP, entonces la frecuencia de los pulsos es directamente proporcional a la concentración del número de NPs y la intensidad de cada pulso es proporcional a la masa del elemento (54). La ecuación 1 relaciona la señal R (iones contados por unidad de tiempo) con la concentración de la masa de un elemento M en disolución (C<sup>M</sup>) que es nebulizado dentro del ICP-MS.

$$R = K_{intro} \bullet K_{ICP-MS} \bullet K_M \bullet C^M \quad (1)$$

Donde  $K_{intro}$  (= $\bigcap_{neb} \cdot Q_{sam}$ ) representa la contribución del sistema de introducción de la muestra, a través de la eficiencia de nebulización ( $\bigcap_{neb}$ ) y el caudal de aspiración de la muestra ( $Q_{sam}$ ).  $K_{ICP-MS}$  es la eficiencia de la detección, que representa la relación entre el número de iones detectados contra el número de átomos introducidos al ICP y envuelve el proceso de ionización, el paso de la muestra a través de la interface del ICP-MS, así como la transmisión a través del espectrómetro de masas.  $K_M$  (= $A \cdot N_{AV}/M_M$ ) incluye la contribución de la medida del elemento, donde A es la abundancia del isotopo considerado,  $N_{AV}$  el número de Avogadro y  $M_M$  la masa atómica de M.

Para diluciones de NPs esféricas, sólidas y puras, la concentración de la masa del elemento  $C^{M}_{NP}$  es expresada como:

$$C^{M}_{NP} = \frac{4}{3} \bullet \pi \bullet p \bullet (\frac{d}{2})^{3} \bullet X_{NP} \bullet N_{NP} \quad (2)$$

Donde *d* es el diámetro de la NP, *p* es la densidad de las NPs,  $X_{NP}$  la fracción de la masa del elemento en la NP (59.9 para NPs de TiO<sub>2</sub>) y  $N_{NP}$  la concentración del número de NPs. Adaptando la ecuación 1 a la nebulización de la suspensión de NPs quedaría como:

$$R = K_{intro} \bullet K_{ICP-MS} \bullet K_M \bullet K_{NP} \bullet N_{NP} \quad (3)$$

Donde  $K_{NP}$  (= 4/3 •  $\pi p$  •  $(d/2)^3$  •  $X_{NP}$ ) incluye las propiedades de las NPs. El flujo de NPs que llegan al plasma ( $Q_{NP}$ ) y, por lo tanto, la frecuencia de las NPs detectada ( $f_{NP}$ ) es dado por la primera contribución de la ecuación 3, donde:

$$f_{NP} = Q_{NP} = \prod_{neb} \bullet Q_{sam} \bullet N_{NP} \quad (4)$$

Si solo una NP es detectada durante cada lectura, entonces  $r_{NP}$  (= $K_{ICP-MS} \bullet K_M \bullet K_{NP}$ ) representa las cuentas totales por lectura y NPs, que se pueden expresar con respecto al diámetro de la NP como:

$$r_{NP} = \frac{1}{6} \bullet \pi \bullet p \bullet X_{NP} \bullet K_{ICP-MS} \bullet K_M \bullet d^3 \quad (5)$$

O con respecto a la masa de M por NP ( $m_{NP}$ ) como:

$$r_{NP} = K_{ICP-MS} \bullet K_M \bullet m_{NP} \quad (6)$$

Las ecuaciones 4-6 resumen los fundamentos detrás de SP-ICP-MS. La determinación de la concentración del número de NPs se basa en la relación linear entre la frecuencia de eventos detectados y la concentración del número de NPs (ecuación 4); mientras que la intensidad de la señal de cada evento es proporcional a la masa del analito por NP (ecuación 6) o a la tercera potencia del diámetro para NPs sólidas, esféricas y puras, permitiendo la determinación de la masa del analito por NP y la distribución del tamaño, respectivamente (54).

Utilizando la ecuación 5 y 6 y una disolución estándar de partículas de tamaño y masa conocido se puede construir una curva de calibración para conocer el tamaño y la masa de NPs sólidas, esféricas y puras. En el caso que no se cuente con estándares certificados de la NP a medir, Pace et al., 2011 desarrollaron un método en el que usa disoluciones de patrones disueltos del elemento a medir para determinar la masa del analito y el diámetro de la NP. Este método asume que una vez en el plasma los iones provenientes de la disolución estándar de elementos disueltos y los iones de una NP se comportan de la misma manera (51). Las bases del método se resumen a continuación y se ilustran en el esquema de la Figura 10.

Una vez que se crea la curva de calibración que relaciona la intensidad de la señal del instrumento con la concentración del analito que entra al plasma, el segundo paso es relacionar la concentración del analito disuelto con la masa total de analito que ingresa al plasma durante cada lectura. La relación entre la concentración del analito, C (µg/mL), y W, la masa observada por evento, (µg/evento), es dada por la ecuación 7:

$$W = [\Pi_n \bullet q_{liq} \bullet t_{dt} \bullet C] \quad (7)$$

Donde  $q_{liq}$  (mL/ms) es el caudal de aspiración de la muestra,  $t_{dt}$  (ms/evento) es el DT, y  $\prod_n$  es la eficiencia de transporte. La curva de calibración resultante relaciona la intensidad de la señal con la masa total transportada dentro del plasma por evento. La intensidad de cada pulso individual,  $I_P$  (cuentas/evento), puede insertarse después dentro de una nueva curva de calibración para determinar la masa correspondiente a cada partícula,  $m_P$  (ecuación 8).

$$m_{\rm P} = f_{\rm a}^{-1} \left[ \left( (I_P - I_{Bgd}) \left[ \mathcal{N}_i \right) \right) - b \right) / m \right] \quad (8)$$

Donde  $f_a$  es la fracción de la masa del elemento analizado en la NP,  $n_i$  es la eficiencia de ionización,  $I_{Bgd}$  es la intensidad del ruido de fondo promedio, y *m* y *b* son la pendiente y la ordenada al origen de la curva de calibración respectivamente.

Asumiendo que la NP es esférica, la ecuación 9 relaciona la masa de la NP con el diámetro, d, donde p es la densidad de la NP.

$$d = \sqrt[3]{\frac{6 \cdot mp}{\pi \cdot p}} \quad (9)$$

En este método utilizan la ecuación 10 para relacionar la frecuencia de los pulsos,  $f(I_P)$  (no. de pulsos/ms), a la concentración del número de NPs, N<sub>P</sub> (partículas/mL).

$$N_{\rm P} = f(I_P)/(q_{liq} \bullet n) \quad (10)$$

Para poder utilizar este método es necesario conocer la eficiencia de transporte. En el mismo artículo se proponen 3 distintos métodos para determinar la eficiencia de transporte, el método de recolección de residuos, el método de tamaño de partícula y el método de la frecuencia de partículas. En este trabajo se utilizó el método de frecuencia de nanopartículas, en el que se usa una suspensión de NPs de Au 60 nm de referencia (NIST, RM 8013) del que se conoce la concentración del número de partículas (518 ng/L). Despejando la eficiencia del transporte de la ecuación 10 podemos conocer la eficiencia de transporte (ecuación 11).

$$\int l_n = f(I_P) / (q_{liq} \bullet N_P) \quad (11)$$



**Figura 10.** Esquema del procesamiento de datos para la cuantificación (parte A) y dimensionamiento (parte A y B) de nanoparticulas utilizando SP-ICP-MS (Extraido de Pace et al., 2011).

## 2.5 Determinación y caracterización de nanopartículas en matrices complejas

Con el fin de aplicar esta técnica sobre matrices más complejas, como muestras biológicas, es necesario el desarrollo de metodologías que permitan la extracción de las NPs de la matriz que las contiene, sin afectar sus características. Para la extracción de las NPs de TiO<sub>2</sub> en algas no se ha reportado ningún método en la literatura. Para otras muestras complejas como surimi, moluscos o peces se ha utilizado la hidrólisis enzimática asistida por ultrasonido para la determinación de NPs de TiO<sub>2</sub> y Ag (55-57). También hay métodos propuestos para el aislamiento de NPs de Au en raíces de plantas de tómate (34). Se ha reportado el uso de TMAH para la extracción de distintas NPs metálicas, incluyendo Au y Ag, procedentes de diversos tejidos animales y vegetales obteniendo resultados satisfactorios (58-61).

## **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las NPs de TiO<sub>2</sub> actualmente se encuentran entre los nanomateriales más fabricados debido a su uso en distintas industrias, como la farmacéutica, la alimentaria, cosmética, pintura, construcción, agricultura y energía. Sus propiedades únicas las hacen atractivas para su uso en muchos productos comerciales. Esto puede conducir a su liberación al medio ambiente, durante la elaboración del producto que las contiene, durante su utilización o después de su desecho, y ser asimiladas por distintos organismos e incorporados a la cadena alimenticia, como es el caso de las algas, lo que representa una ruta de exposición directa para el humano. A pesar de los muchos beneficios que ha presentado su uso, distintos estudios han demostrado los efectos tóxicos que estas producen, tanto al medio ambiente como al ser humano y otros mamíferos, principalmente a consecuencia de la exposición crónica. Debido a esto es importante el desarrollo de métodos de análisis confiables para su determinación. Sin embargo, a consecuencia del pequeño tamaño de las NPs y de la composición compleja de los componentes de las muestras que las contienen, su identificación y cuantificación precisa es un desafío. El presente trabajo pretende desarrollar un método de extracción para la determinación y caracterización de NPs de TiO<sub>2</sub> presentes en muestras de algas frescas mediante SP-ICP-MS.

## 4. OBJETIVOS

## 4.1 Objetivo general

Desarrollar un método de extracción de NPs de  $TiO_2$  en algas utilizando Hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) y baño ultrasonido para su posterior determinación y cuantificación mediante SP-ICP-MS.

## **4.2 Objetivos particulares**

- Optimizar las condiciones de extracción de NPs como son: concentración de TMAH, volumen de TMAH y tiempo de sonicación.
- Cuantificar la concentración de titanio total, en las muestras de algas previamente digeridas en ácido asistido por microondas, mediante ICP-MS para conocer el porcentaje de NPs de TiO<sub>2</sub> respecto al contenido de titanio total presente en la muestra.
- Evaluar la metodología analítica desarrollada a través de los siguientes parámetros:
  - Límite de detección y cuantificación, respecto a la concentración de NPs de TiO<sub>2</sub>.
  - $\circ$  Límite de detección del tamaño de las NPs de TiO<sub>2</sub>.
  - Recuperación analítica.
  - Repetibilidad.
  - Eficiencia del método.

## 5. PARTE EXPERIMENTAL

## 5.1 Muestras de algas

Todas las muestras son procedentes de las costas de Galicia, al Norte de España. Las muestras incluyen 2 muestras de algas verdes (*Ulva rigida*), 2 muestras de sargazo (*Sargassum bacciferum*) y 1 muestra de alga desconocida.

## 5.2 Reactivos

- Agua ultrapura obtenida de un dispositivo de purificación Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, USA)
- Hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) 2.5% preparada a partir de Hidróxido de tetrametilamonio 25% solución en agua (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Glicerol para análisis (Merck)
- NexION Setup solution, 10 µg/L (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)
- Titanio iónico [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>TiF<sub>6</sub> 1000 mg/L] (Merck) usado para la curva de calibración en el ICP-MS
- Peróxido de hidrógeno 33% (m/v) (Panreac, Barcelona, España)
- Ácido Nítrico hiperpuro 69% (m/v) (Panreac)
- Ácido Nítrico 65% (Fisher scientific, Madrid, España)
- Disolución de NPs de oro, material de referencia certificado NIST RM8013 (60nm) (NIST, Gaithersburg, MD, USA)
- Nanopartículas de TiO<sub>2</sub> (rutilo, 99.9%) de 50 nm y 100 nm (tamaño APS, aerodynamic particle size) de US Research Nanomaterials (Houston, TX, USA)

## 5.3 Equipo

- ICP-MS NexION 300x (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)
- Centrifuga refrigerada 2K15 (Sigma, Osterode am Harz, Alemania)
- Horno de microondas ETHOS PLUS (Milestone, Sorisole, Italia) con reactores de teflón de 100 mL con cubiertas de teflón
- Balanza analítica ML204 (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA)
- Baño ultrasónico USC 300 TH (VWR, Radnor, Pennsylvania)
- Agitador para tubos de ensayo Reax Top (Heidolph, Schwabach, Alemania)

- Triturador manual con cuchillas rotativas (Taurus, Barcelona, España)
- Estufa de secado y esterilización Conterm (J.P. Selecta, Barcelona, España)

## 5.4 Software

- Syngistix<sup>TM</sup> Nano Application Module Software (Perkin Elmer)
- Statgraphics Centurion XVI v16.1.15 (Manugistics Inc., Rockville, MD, USA)

## 5.5 Material

- Micropipetas de distintos volúmenes (10-100 μL, 100-1000 μL, 0.2-2 mL, 1-10 mL) con puntas desechables (Socorex, Ecublens, Suiza)
- Material de vidrio Pyrex<sup>™</sup> (matraces volumétricos, vasos de precipitado, pipetas volumétricas y pipetas graduadas de diferentes volúmenes; vidrios de reloj, agitadores)
- Espátulas
- Tubos Falcon<sup>TM</sup> de 10 mL y 50 mL

## 5.6 Metodología

## 5.6.1 Limpieza de material

Todo el material utilizado para la preparación de las muestras y la lectura en el ICP-MS fue lavado siguiendo el siguiente protocolo: primero se eliminaron las etiquetas y rótulos que pudieran contener con ayuda de acetona. Se lavaron con agua y jabón y se enjuagaron con abundante agua de grifo. Posteriormente se enjuagaron dos veces con agua Milli-RO. Se sumergieron en ácido nítrico 10 % (HNO<sub>3</sub> 10% m/v) durante 48h. Pasado este tiempo, se enjuagaron 3 veces con agua ultrapura y se dejaron secar en una estufa a 50 °C.

## 5.6.2 Preparación de las muestras

Las algas se lavaron con agua corriente y posteriormente con abundante agua ultrapura para eliminar restos de agua salada y contaminantes que pudieran interferir con la lectura o alterar los resultados. Posteriormente se trituraron con ayuda de un triturador manual (Taurus). El triturado se guardó en tubos de plástico de 50 mL y se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

#### 5.6.3 Extracción de NPs de TiO<sub>2</sub> con TMAH asistido por ultrasonido

Aproximadamente 1.0 g de cada muestra de alga se pesó dentro de tubos de plástico de 10 mL y se añadieron 7.5 mL de una disolución 2.5 % de TMAH y se agitaron durante 30 s con ayuda del vortex. Los tubos fueron colocados dentro de un baño ultrasonido durante 2 h. Transcurrido ese tiempo, el extracto fue separado del residuo sólido por centrifugación (8 °C, 3900 rpm, 15 min). El resto sólido fue sometido nuevamente al procedimiento de extracción bajo las mismas condiciones. El extracto se llevó a 10 mL con TMAH 2.5 % y mantenido en tubos de plástico a -20 °C hasta su lectura en SP-ICP-MS. Tres réplicas y dos blancos de reacción se realizaron por cada muestra distinta.

#### 5.6.4 Digestión ácida asistida por microondas para cuantificación de titanio total

Se pesó 1.0 g de cada muestra de alga dentro de reactores de teflón, y se añadieron 2 mL de agua ultrapura, 4 mL de HNO<sub>3</sub> 69% (m/v) y 2 mL de  $H_2O_2$  33% (m/v). Posteriormente los reactores se cerraron y fueron sometidos a un programa de microondas que constó de 5 etapas a 800 W (Tabla 5). Antes de retirar los reactores del microondas se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente por aproximadamente 2h. Las muestras digeridas se llevaron a 25 mL con agua ultrapura y se almacenaron en tubos de plástico a temperatura ambiente. Cada muestra sometida al procedimiento de digestión ácida asistida por microondas se realizó por triplicado con 2 blancos de reacción por cada set.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	25	2
2	90	2
3	140	5
4	200	5
5	200	9

Tabla 5. Programa de microondas para digestión ácida.

#### 5.6.5 Medición de NPs de TiO<sub>2</sub> por SP-ICP-MS

Para el cálculo de la ET% del SP-ICP-MS se utilizó una dilución NIST de NPs de Au 518 ng/L. Valores entre 1-5% fueron tomados como válidos. Se realizó una curva de calibración con titanio iónico  $[(NH_4)_2TiF_6 1000 \text{ mg/L}]$  usando disoluciones estándar de 0, 1, 2.5, 5 y 10

µg/L utilizando como disolvente una dilución TMAH (2.5%) glicerol (1%) 2:10. Las digestiones alcalinas de algas se diluyeron 2:10 con glicerol 1% (v/v). Cada tubo se colocó en baño ultrasonido (45kHz) durante cinco minutos previos a su medición en SP-ICP-MS. Al comienzo del experimento, el equipo fue calibrado utilizando una solución multielemental "tune" para una sensibilidad óptima y ajustar los niveles de óxidos y especies con doble carga al mínimo. El cálculo de la ET %, la curva de calibración con titanio iónico, la concentración de NPs, la distribución del tamaño de las NPs y la concentración de titanio iónico se realizó a través de Syngistix<sup>™</sup> Nano Application Module Software. Las condiciones de operación del SP-ICP-MS se muestran en la Tabla **6**. Los datos fueron exportados a una hoja cálculo para un mejor procesamiento.

## 5.6.6 Medición de titanio total por ICP-MS

La determinación de titanio total de las muestras digeridas con ácido se realizó por ICP-MS convencional. Las condiciones de operación utilizadas se enlistan en la Tabla 7. Para la medición, los digeridos se diluyeron 1:10 con agua ultrapura. La curva de calibración se realizó siguiendo el método de adición estándar con concentraciones de titanio de 0, 2.5, 5, 10, 15 y 20  $\mu$ g L<sup>-1</sup>. Se utilizó al Germanio (Ge<sup>74</sup>) como estándar interno. El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) calculado con base en el criterio de 3 SD/10 SD fue 31.7 y 105.6 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente.

#### 5.6.7 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa "Statgraphic Centurion" v16.1.15. Se utilizó la prueba C de Cochran para la comparación de las desviaciones estándar con un rango de confianza del 95.0 %. Cuando no se observó diferencia significativa en las desviaciones estándar, se usó el análisis de varianza (ANOVA) para la comparación de las medias junto con la prueba de comparación múltiple como prueba post hoc; en el caso contrario, cuando se observaban diferencias significativas en las desviaciones estándar, se utilizó la prueba de rangos múltiples utilizando la diferencia mínima significativa de Fisher (LSD). También se utilizó la prueba t-Student cuando este fue necesario.

Condiciones de operación de SP-ICP-MS					
Potencia de radiofrecuencia	1600 W				
Flujo de gas de nebulización	0.95 mL min <sup>-1</sup>				
Flujo de gas auxiliar	1.2 mL min <sup>-1</sup>				
Flujo de gas del plasma	16 mL min <sup>-1</sup>				
Parámetros de operación para las mediciones en SP-ICP-MS					
Analito	Ti				
Masa	48.9				
Densidad	4.23 g cm <sup>-3</sup>				
Fracción de masa	59.9 %				
Eficiencia de ionización	100 %				
Caudal de aspiración de la muestra	0.435 mL min <sup>-1</sup>				
Dwell time	100 µs				
Tiempo de muestreo	100 s				
Modo	Estándar				
Numero de escaneos	1				
Numero de lecturas	25000				
Replicas	3				

Tabla 6. Condiciones de operación de SP-ICP-MS

Condiciones de operación para ICP-MS					
Potencia de radiofrecuencia		1600 W			
Flujo del gas	Nebulización	0.87 mL min <sup>-1</sup>			
	Auxiliar	1.2 mL min <sup>-1</sup>			
	Plasma	16 mL min <sup>-1</sup>			
KED	Voltaje de la celda de entrada	-5 V			
	Voltaje de la celda de salida	-5 V			
	Compensador de la celda de colisión	-16			
	Gas de celda A (He)	1.00 V			
	Voltaje de campo axial	475.00 V			
Analito/Masa	Ti	48.9 uma			
	Ge (Estándar interno)	73.9 uma			

Tabla 7. Condiciones de operación de ICP-MS

## 6. RESULTADOS

## 6.1 Optimización de los parámetros de extracción de las NPs de TiO2

Se optimizaron distintos parámetros que pueden afectar la eficiencia de la extracción con TMAH asistida por ultrasonido de algas, entre las que se encuentran los relacionados a la solución alcalina, como son la concentración del TMAH y el volumen de TMAH añadido; y el que respecta al baño ultrasonido, como es el tiempo de sonicación de la muestra. Todos los experimentos fueron realizados con submuestras de 1.0 g de alga verde (*U. rigida*) previamente triturada y homogenizada (la misma muestra de alga se utilizó durante todo el proceso de optimización). Cada condición de optimización diferente fue evaluada por triplicado con mínimo dos blancos de reacción cada uno.

#### 6.1.1 Concentración de TMAH

Se evaluó la concentración de TMAH en un rango de 2.5-15 % utilizando un volumen de 5 mL de disolución en cada uno. El mayor número de NPs de TiO<sub>2</sub> extraídas (4.60 x  $10^6 \pm 9.57$  x  $10^5$  NPs TiO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup>) se obtuvo al usar la concentración de TMAH más baja (2.5%), como se muestra en la Figura 11A. Cuando se utilizaron concentraciones más altas (5% y 10%) la eficiencia de la extracción disminuyó significativamente obteniéndose menor concentración de NPs (4.82 x  $10^5 \pm 1.26$  x  $10^5$  NPs TiO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> y 2.00 x  $10^5 \pm 4.80$  x  $10^4$  NPs TiO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup>, respectivamente). Cuando se utilizó la concentración de 15% de TMAH no se reportó ninguna cantidad de NPs extraídas, probablemente debido a que la concentración del reactivo tan alta utilizada las degrado. En la Figura 11B se muestra el tamaño medio de las NPs extraídas (74.1 ± 10.1 nm, 73.5 ± 4.2 nm y 73.3 ± 3.4 nm para concentraciones de TMAH de 2.5, 5 y 10 %, respectivamente).

## 6.1.2 Volumen de la disolución de TMAH

Se evaluó el efecto del volumen de disolución de TMAH en la extracción de las NPs de TiO<sub>2</sub> en algas. Se utilizaron 3 distintos volúmenes de una disolución de TMAH 2.5 % (5 mL, 7.5 mL y 10 mL). Como se muestra en la Figura 12A, la mayor cantidad de NPs extraída se obtuvo cuando se usaron volúmenes de 7.5 mL y 10 mL ( $6.32 \times 10^5 \pm 8.73 \times 10^4$  NPs TiO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> y 6.38 x 10<sup>5</sup> ± 6.32 x 10<sup>4</sup> NPs TiO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup>, respectivamente). El análisis de varianza (ANOVA) muestra que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de las dos variables con un nivel del 95.0% de confianza. Finalmente, se optó por elegir un volumen de 7.5 mL para realizar las extracciones debido a que las condiciones de operación son mejores cuando se usa este volumen. Por otro lado, como se puede observar en la Figura 12B, se obtuvieron tamaños de NPs de 76.8  $\pm$  0.8 nm, 76.9  $\pm$  1.5 nm y 77.0  $\pm$  1.3 nm para volúmenes de 5, 7.5 y 10 mL, respectivamente.

#### 6.1.3 Tiempo de ultrasonido

El último parámetro que se evaluó fue el tiempo de ultrasonido de las submuestras de alga, fijando el volumen de la disolución de TMAH 2.5 % a 7.5 mL, utilizando 5 tiempos distintos (0.3 h, 1 h, 1,30 h, 2 h y 3h). La mayor cantidad de NPs de TiO<sub>2</sub> se obtuvo cuando se sonicaron las muestras durante 2h (8.31 x  $10^5 \pm 8.35 \times 10^4$  NPs TiO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup>), como se observa en la Figura 13A. Se obtuvieron menores eficiencias de extracción durante los tres primeros tiempos evaluados (5.41 x  $10^5 \pm 8.67 \times 10^4$  NPs TiO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup>, 5.12 x  $10^5 \pm 8.13 \times 10^4$  NPs TiO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> y 5.28 x  $10^5 \pm 8.96 \times 10^4$  NPs TiO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup>, respectivamente). Por otro lado, a las 3 h la eficiencia de la extracción (7.42 x  $10^5 \pm 5.28 \times 10^4$  NPs TiO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup>) disminuyó ligeramente en comparación con 2 h de sonicación, probablemente debido al sobrecalentamiento del baño al usar tiempos de sonicación largos. Sin embargo, el análisis de varianza (ANOVA) muestra que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre estos dos últimos tiempos (95.0% de confianza). Se optó por elegir un tiempo de sonicación de 2 h para la extracción. Respecto a la media del tamaño de las NPs se obtuvieron tamaños de 85.9 ± 1.2 nm, 84.9 ± 3.0 nm, 85.7 ± 0.8 nm, 87.2 ± 1.0 nm y 85.7 ± 0.5 nm para tiempos de sonicación de 0.30, 1, 1.30, 2 y 3 h, respectivamente (Figura 13B).



**Figura 11.** Efecto de la concentración de TMAH en la concentración de la extracción (A) y el tamaño (B) de las NPs de TiO<sub>2</sub> en muestras de alga fresca. Masa de las muestras de alga, 1.0 g con n=3 (la desviación estándar de las mediciones está representada por las barras de error). \*\*p < 0.01 comparado con el grupo de 2.5% TMAH (ANOVA de un factor con prueba de comparación múltiple de Tukey).



**Figura 12.** Efecto del volumen de TMAH 2.5% en la concentración de la extracción (A) y el tamaño (B) de las NPs de TiO<sub>2</sub> en muestras de alga fresca. Masa de las muestras de alga, 1.0 g con n=3 (la desviación estándar de las mediciones está representada por las barras de error). \*\*p < 0.01 comparado con el grupo de 7.5 mL de TMAH (ANOVA de un factor con prueba de comparación múltiple de Tukey).



**Figura 13.** Efecto del tiempo de sonicación en la concentración de la extracción (A) y el tamaño (B) de las NPs de TiO<sub>2</sub> en muestras de alga fresca. Masa de las muestras de alga, 1.0 g con n=3 (la desviación estándar de las mediciones está representada por las barras de error). \*\*p < 0.01 comparado con el grupo de 2h de tiempo de sonicación (ANOVA de un factor con prueba de comparación múltiple de Tukey).

# 6.2 Evaluación de la estabilidad de las NPs de TiO<sub>2</sub> a las condiciones de extracción seleccionadas

Se evaluó la estabilidad de las NPs de TiO<sub>2</sub> al procedimiento de extracción con TMAH, estandarizado y descrito previamente, utilizando dos estándares, uno de 50 nm y otro de 100 nm, que fueron preparados con agua ultrapura a una concentración de 10  $\mu$ g L<sup>-1</sup>. Se utilizaron las mismas condiciones de extracción estandarizadas (TMAH 2.5 % 7.5 mL, 2 h de baño ultrasonido). Tres réplicas de cada estándar se sometieron al procedimiento de extracción con TMAH y otras tres réplicas de cada estándar se diluyeron únicamente con glicerol 1% (v/v).

La Figura 14 muestra la concentración de las NPs medidas en SP-ICP-MS (A) y el tamaño promedio (B) obtenido de los estándares de NPs de 50 y 100 nm, que fueron y que no fueron sometidos al procedimiento de extracción. La concentración media de las NPs de TiO<sub>2</sub> de 50 nm con TMAH y con glicerol fueron  $6.64 \times 10^7 \pm 1.74 \times 10^7$  NPs de TiO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> y  $1.38 \times 10^8 \pm 5.37 \times 10^6$  NPs de TiO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup>, respectivamente. Para el estándar de 100 nm en glicerol y con TMAH fueron  $2.60 \times 10^7 \pm 2.15 \times 10^6$  NPs de TiO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> y  $8.91 \times 10^7 \pm 3.27 \times 10^6$  NPs de TiO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup>, respectivamente. Los tamaños promedio obtenidos para las NPs de TiO<sub>2</sub> de 50 nm, que fueron y que no fueron sometidos al procedimiento de extracción, fueron 73.9  $\pm 4.8$  nm y 76.7  $\pm 0.4$  nm, respectivamente; los valores para las NPs de TiO<sub>2</sub> de 100 nm fueron 75.8  $\pm 5.0$  nm y 79.5  $\pm 1.5$  nm, respectivamente.

El análisis estadístico (t-Student para muestras independientes) para la media de las concentraciones medidas en SP-ICP-MS muestra que hay diferencia significativa (p<0.05) entre las NPs que fueron sometidas al procedimiento de extracción y las que fueron únicamente diluidas en glicerol tanto para las NPs de 50 nm como paras las de 100 nm. Por otro lado, el análisis reporta que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias del tamaño de los estándares que fueron sometidos al procedimiento de extracción y las estándares de 50 nm como para los estándares de 100 nm, con un nivel del 95.0% de confianza.



**Figura 14.** Efecto de las condiciones de extracción seleccionadas en la media de la concentración (A) y en la media del tamaño (B) de las NPs TiO<sub>2</sub> medidas en SP-ICP-MS: disoluciones estándar acuosas de NPs de TiO<sub>2</sub> de 50 y 100 nm a una concentración de 10 µg L<sup>-1</sup>, n=3, la desviación estándar de las mediciones está representada por las barras de error, el tamaño más frecuente está representado por el punto negro (•). \*\*p < 0.01 (Prueba t-Student para muestras independientes).

#### 6.3 Rendimiento analítico

## 6.3.1 Evaluación del efecto matriz en la curva de calibración

Se evaluó el efecto matriz preparando dos curvas de calibración de titanio iónico, una con agua ultrapura y otra utilizando una disolución 2:10 de TMAH 2.5 %-Glicerol 1 %. Las concentraciones utilizadas en ambas curvas fueron 0, 1, 2.5, 5 y 10  $\mu$ g L<sup>-1</sup>. Las pendientes en ambas curvas de calibración (m=0.1813 para calibración acuosa, y m= 0.1724 para calibración con TMAH) fueron similares, obteniéndose una buena linealidad en ambos casos (R<sup>2</sup>= 0.9984 y R<sup>2</sup>= 0.9980 para curva en acuoso y con TMAH-Glicerol, respectivamente), por lo que puede asumirse que el efecto matriz es insignificante. Finalmente, se decidió usar la curva de calibrado de titanio iónico con TMAH-glicerol al realizar las mediciones de los extractos de algas para mantener la misma composición que en las muestras.

# 6.3.2 Límite de detección y límite de cuantificación de la concentración de NPs de TiO<sub>2</sub>

Se calculó el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) siguiendo el criterio 3 $\sigma$  y 10  $\sigma$ , respectivamente, siendo " $\sigma$ " la desviación estándar de once mediciones en SP-ICP-MS de blancos de reacción (TMAH 2.5 % diluido 2:10 con glicerol 1 %). Tres veces (LOD) o diez veces (LOQ) la desviación estándar de estas mediciones se dividió por la pendiente de la curva de calibración. Los resultados de LOD y LOQ obtenidos fueron 4.82 x 10<sup>4</sup> NPs mL<sup>-1</sup> y 1.61 x 10<sup>5</sup> NPs mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Estos valores pueden expresarse también referidos a un gramo de muestra como 4.82 x 10<sup>5</sup> NPs g<sup>-1</sup> y 1.61 x 10<sup>6</sup> NPs g<sup>-1</sup>, respectivamente.

#### 6.3.3 Límite de detección del tamaño de las NPs de TiO<sub>2</sub>

La determinación del LOD del tamaño de las NPs de  $TiO_2$  se calculó con la siguiente ecuación utilizada por Lee et al., 2014 y Donovan et al., 2016:

$$D_{\min} = \sqrt[3]{\frac{6 x 3 \sigma DI}{R x fa x p x \pi}}$$

Donde  $3\sigma_{DI}$  o  $5\sigma_{DI}$  son tres veces y cinco veces la desviación estándar de once mediciones de blancos de reacción en SP-ICP-MS, R es la sensibilidad del detector (pendiente de la curva de calibración de un estándar de titanio iónico) al elemento que se está midiendo (Ti),  $f_a$  es la fracción de la masa del elemento metálico analizado en la NP (59.9 para Ti), y *p* es la densidad de las NPs de TiO<sub>2</sub> (4.23 g cm<sup>-3</sup>). Adicionalmente, el LOD del tamaño se calculó también utilizando la siguiente ecuación propuesta por Witzler et al., 2016 (62):

$$d = \sqrt[3]{\frac{6 x m}{\pi x p}}$$

Donde p es la densidad de las NPs de TiO<sub>2</sub>, y "m" es la masa de la partícula o la masa por dwell time. Este método tiene dos variantes, una en la que se usan diez mediciones de blancos de reacción (método del blanco) para calcular la masa de la NP y otra donde se utiliza una curva de calibración de titanio iónico (método del disuelto) para calcular la masa de la NP.

Los valores para el límite de detección del tamaño obtenidos siguiendo el criterio de  $3\sigma_{DI}$  y  $5\sigma_{DI}$  fueron 7.13 nm y 8.4 nm, respectivamente. Los valores obtenidos por el método del blanco y el método del disuelto fueron 24.62 nm y 3,15 nm, respectivamente.

## 6.3.4 Repetibilidad

La precisión del método se evaluó a través de la repetibilidad del procedimiento general. Para ello, 11 submuestras de alga verde, previamente lavada y triturada, se sometieron al procedimiento de extracción con TMAH. Cada extracto de TMAH fue analizado por SP-ICP-MS por triplicado. Respecto a la concentración de NPs de TiO<sub>2</sub> se obtuvo un coeficiente de variación del 16 % (el promedio de la concentración fue de 6.76 x  $10^6 \pm 1.10 \times 10^5$  NPs de TiO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup>). Por otro lado, el coeficiente de variación obtenido para la distribución del tamaño fue del 2% (con un tamaño promedio de 83.9 ± 1.7 nm).

#### 6.3.5 Recuperación analítica

La exactitud del método de extracción se evaluó a través de la recuperación analítica. Se realizó un análisis por SP-ICP-MS de un extracto de TMAH de una muestra de alga verde al que se le añadieron NPs de TiO<sub>2</sub> de 50 nm y 100 nm a una concentración de 10  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Las soluciones que se utilizaron para añadir las NPs también fueron analizadas por SP-ICP-MS al igual que una muestra de extracto de TMAH de alga verde a la que no se le añadió NPs. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

La concentración de NPs de TiO<sub>2</sub> encontrada en los extractos a los que no se les añadió NPs se restó de la concentración de NPs de TiO<sub>2</sub> encontrada en los extractos a los que

se les añadió NPs, esto nos da la "concentración de NPs de TiO<sub>2</sub> medida". La concentración de NPs de TiO<sub>2</sub> medidas se dividió entre la media de la concentración de NPs TiO<sub>2</sub> encontrada en las soluciones acuosas utilizadas para añadir las NPs (concentración de NPs de TiO<sub>2</sub> añadida). Este cociente se multiplicó por 100 para obtener la recuperación analítica. Se obtuvo un valor medio de 119  $\pm$  0.36 % y 120  $\pm$  0.75 % para los experimentos con NPs de 50 nm y 100 nm, respectivamente.

## 6.3.6 Eficiencia de la extracción de NPs de TiO<sub>2</sub>

La eficiencia de la extracción se evaluó determinando la concentración de NPs de TiO<sub>2</sub> en los residuos obtenidos de la extracción de las NPs. En otras palabras, 3 submuestras de alga verde y dos blancos se sometieron al método de extracción propuesto, los residuos obtenidos fueron sometidos nuevamente al método de extracción. Se midió la concentración de NPs extraídas tanto en la primera extracción como en los residuos, por SP-ICP-MS. Los resultados obtenidos para la extracción en las muestras y para la extracción en los residuos fueron 6.18 x  $10^6 \pm 9.41 \times 10^5$  NPs de TiO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> y  $1.67 \times 10^6 \pm 7.45 \times 10^5$  NPs de TiO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup>, respectivamente. La concentración de NPs de TiO<sub>2</sub> en los residuos fue mayor que la encontrada en los blancos de reacción (aún está dentro del LOD y LOQ del método), por lo que una parte de las NPs de TiO<sub>2</sub> extraídas son retenidas en el residuo (aproximadamente un 21 % de las NPs extraídas) y es necesario realizar una doble extracción para realizar la cuantificación adecuadamente.

### 6.4 Aplicación

Cinco muestras de algas frescas fueron analizadas para determinar la concentración de Ti total por digestión ácida asistida por microondas y medición en ICP-MS; y para determinar la concentración (al igual que su caracterización) de NPs de TiO<sub>2</sub> utilizando la metodología desarrollada anteriormente (extracción con TMAH asistido por ultrasonido) y medición en SP-ICP-MS. En ambas mediciones se realizaron tres réplicas independientes de cada muestra. Los resultados (Tabla 8 y Figura 15) muestran que la concentración de Ti total está dentro del rango de 212.56-892.79  $\mu$ g g<sup>-1</sup>. La muestra de alga con menor concentración de NPs de TiO<sub>2</sub> fue el Alga desconocida. Por otro lado, las 2 muestras de Alga verde (*U. rigida*) son las que obtuvieron mayor concentración de NPs seguidas por las 2 muestras de Sargazo (*S. bacciferum*).



**Figura 15.** Concentración de NPs de  $TiO_2$  extraídas de 5 muestras de algas utilizando la metodología desarrollada. Masa de las muestras de alga, 1.0 g con n=3 (la desviación estándar de las mediciones está representada por las barras de error).

Para conocer la concentración de titanio procedente de las NPs de TiO<sub>2</sub> extraídas de cada muestra se calculó la masa en gramos de titanio de las NPs multiplicando su volumen, previamente calculado asumiendo que todas las NPs son esféricas, por su densidad (4.23 g/cm<sup>3</sup>) y esta se representó en porcentaje respecto al total de titanio calculado (Tabla 8). El porcentaje de titanio procedente de las NPs extraídas oscila entre 0.0001 % a 0.0032 % por gramo de muestra.

Muestra	Ti total (µg g-1)	[NPs TiO <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> ]	[Ti en NPs] (µg g <sup>-1</sup> )	Porcentaje de Ti en NPs TiO <sub>2</sub> (%)
Alga verde	$233.73 \pm 61.19$	$7.86 \ge 10^6 \pm 1.69 \ge 10^6$	0.0076	0.0032
Sargazo	$519.63 \pm 74.36$	$6.11 \ge 10^6 \pm 7.21 \ge 10^5$	0.0045	0.0009
Alga verde 2	892.79 ± 183.41	$1.17 \ge 10^7 \pm 1.35 \ge 10^6$	0.0136	0.0015
Sargazo 2	$212.56 \pm 78.66$	$6.43 \ge 10^6 \pm 7.99 \ge 10^5$	0.0051	0.0024
Desconocida	$417.99 \pm 77.60$	$6.56 \ge 10^5 \pm 1.97 \ge 10^5$	0.0005	0.0001

Tabla 8. Contenido de Ti total y concentración de NPs de TiO<sub>2</sub> en muestras de alga frescas

Respecto a la distribución del tamaño medio de las NPs de  $TiO_2$  (Figura 16) oscila entre 69 nm a 80 nm. Las dos muestras de Sargazo y la muestra de Alga desconocida muestran un tamaño de NP similar, con un tamaño medio de 69-70 nm y un tamaño más frecuente de 59-61 nm, mientras que las muestras de alga verde y alga verde 2 muestran un tamaño medio (75.75  $\pm$  4.81 nm y 80.68  $\pm$  1.15 nm, respectivamente) y un tamaño más frecuente (67.98  $\pm$  8.11 nm y 74.56  $\pm$  1.77 nm, respectivamente) un poco mayor.



**Figura 16.** Tamaño de las NPs de TiO<sub>2</sub> extraídas de 5 muestras de algas. Masa de las muestras de alga, 1.0 g con n=3 (la desviación estándar de las mediciones está representada por las barras de error).

## 7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se desarrolló un método para la extracción de NPs de  $TiO_2$  en algas frescas, empleando TMAH asistido por ultrasonido, para su posterior cuantificación y caracterización por SP-ICP-MS.

Los resultados de la optimización del método de extracción utilizando TMAH tuvo buenos resultados obteniéndose una extracción satisfactoria de las NPs de TiO<sub>2</sub> en algas a la concentración y volumen seleccionados. El uso de ultrasonido disminuye considerablemente el tiempo de extracción, en comparación con otras metodologías utilizadas para NPs metálicas en distintas muestras biológicas. Schmidt, B. et al., 2011 reportan tiempos de extracción de hasta 12 h (63), mientras que Gray, E. P. et al., 2013 reportan tiempos de digestión de la muestra de 12 a 24 h (60), en hígado de rata y en carne molida de res, respectivamente, en comparación con las 2 h de extracción optimizadas en esta metodología.

Se observó una buena estabilidad de las NPs durante el procedimiento de extracción, la metodología desarrollada demostró no afectar la distribución del tamaño medio de las NPs de TiO<sub>2</sub> extraídas (Figuras 11B, 12B y 13B, para la concentración de TMAH, el volumen y el tiempo de sonicación, respectivamente) ni degradarlas una vez estando en suspensión (Figura 14B). Sin embargo, se pudo observar una diferencia estadísticamente significativa (p<0.01) en la concentración de NPs cuantificadas, entre las que fueron sometidas al procedimiento de extracción y las que fueron diluidas únicamente con glicerol (Figura 14A), a la hora de realizar los experimentos para evaluar la estabilidad de las NPs. Esto pudo deberse a un error en la metodología a la hora de realizar la cuantificación, ya que no se observó diferencia significativa en el tamaño medio de dichas NPs, por lo que no hay evidencia de que hayan sufrido degradación por el TMAH. Posiblemente las NPs degradadas se encuentren a un tamaño que está por debajo del LOD del equipo, por lo que no pudieron ser detectadas y cuantificadas. Es recomendable repetir el experimento y realizar nuevamente la medición de la concentración de las NPs para comprobar este resultado y, si es necesario, modificar la metodología. El uso de TMAH ha demostrado tener buena capacidad para extraer NPs metálicas presentes en tejidos y separarlas de los elementos disueltos sin degradaras ni afectar en su distribución (60), por lo que demuestra tener un gran potencial para su uso en matrices complejas, como lo son las algas.

SP-ICP-MS es un modo especifico de operación de ICP-MS que se utiliza para determinar el diámetro y la concentración del número de NPs metálicas. Los resultados obtenidos, referentes al LOD y LOQ de la concentración de NPs, demuestran que la técnica tiene la capacidad para cuantificar concentraciones bajas de NPs, extraídas de matrices complejas, con buena certidumbre, ya que se obtuvo buena linealidad en el rango de trabajo utilizado. En trabajos previos realizados en orina se encontraron LOD y LOQ parecidos para NPs de TiO<sub>2</sub> (4.31 x 10<sup>3</sup> y 1.44 x 10<sup>4</sup> NPs mL<sup>-1</sup>, respectivamente) (64). En relación al LOD del tamaño de las NPs, los resultados teóricos suponen un límite de detección muy pequeño. Sin embargo, el resultado más acertado fue el calculado con el método del blanco (24.62 nm), ya que durante el trabajo experimental las NPs por debajo de 20 nm de diámetro no eran detectadas por el equipo. Aun así, se obtuvo un LOD de tamaño muy bajo, posiblemente debido al uso de un DT en el rango de microsegundos (100  $\mu$ M) para SP-ICP-MS, lo que lo hace un método muy sensible para la correcta cuantificación y caracterización de estos nanomateriales. Al mismo tiempo este LOD concuerda con otros ya reportados en la literatura, Bocca, B. et al., 2018 reportan valores de LOD de 25 nm para NPs de  $TiO_2$ , en protectores solares en crema y en spray, utilizando SP-ICP-MS (65).

Debido a la ausencia de un material de referencia adecuado se utilizó un estudio de recuperación para medir la exactitud del método siguiendo las recomendaciones de la Eurachem (66). El resultado obtenido por encima del 100 % se encuentra dentro de los límites permitidos para cuando se trabaja con concentraciones tan pequeñas en el orden de magnitud de 1-10 ppb, como es en este caso, siguiendo el criterio de aceptabilidad para métodos cuantitativos de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) (67). Respecto a los resultados de repetibilidad, siguiendo el mismo criterio dado por la FDA y la Eurachem, donde se acepta una RSD de hasta el 22%, estos fueron satisfactorios, teniéndose una buena precisión en las mediciones.

Finalmente, la aplicación de la metodología propuesta evidencia la presencia de NPs de TiO<sub>2</sub> dentro del rango de tamaño considerado por la Comisión Europea (3, 68) en las 5 muestras de algas procesadas, lo que implica la presencia de nanomateriales metálicos en el ambiente marino y las hace susceptibles a la ingesta por parte del ser humano. Aunque hace falta más investigación al respecto para poder determinar el impacto del consumo de este contaminante emergente.

## 8. CONCLUSIÓN

En este trabajo se desarrolló experimentalmente un método de extracción de NPs de  $TiO_2$  en muestras de alga fresca para su posterior determinación y caracterización con ayuda de SP-ICP-MS.

- La extracción con TMAH asistido por ultrasonido ha demostrado ser un procedimiento atractivo como pretratamiento para el aislamiento de NPs de TiO<sub>2</sub> de muestras complejas como las algas frescas, al igual que rápido y seguro con respecto a la integridad y estabilidad de las NPs (distribución del tamaño).
- Los resultados encontrados respecto a la determinación de la concentración del número de NPs de TiO<sub>2</sub> por gramo de muestra y la distribución del tamaño evaluado por SP-ICP-MS han demostrado ser confiables debido a la buena recuperación analítica, precisión y repetibilidad de las mediciones (una desviación estándar del 16% y una recuperación de 120%).
- Se ha obtenido un LOD del tamaño de la NPs pequeño (24.6 nm) lo que lo hace un método muy atractivo debido a su alta sensibilidad.
- La aplicación de la metodología desarrollada muestra la presencia de NPs de TiO<sub>2</sub> en las 5 muestras de algas evaluadas, lo que demuestra la presencia de este nanomaterial en el ambiente marino e implica un posible factor de exposición al humano debido al consumo de este producto, aunque hacen falta más investigación al respecto.

## 9. REFERENCIAS

1. National Nanotechnology Initiative Estados Unidos2019 [Available from <u>https://www.nano.gov/nanotech-101/what</u>]. Consultado 20 Enero 2020.

2. Ministerio de Ciencia IyU, Tecnología FEplCyl, I+D+I OED. Documento de trabajo ICONO: Evolución de la nanotecnología en España. 2018. p. 1-40.

3. Europea C. COMUNICACIÓN DE LA COMISIÓN AL PARLAMENTO EUROPEO, AL CONSEJO Y AL COMITÉ ECONÓMICO Y SOCIAL EUROPEO. Brucelas2012.

4. Krystek P, Ulrich A, Garcia C, Manohar S, Ritsema R. Application of Plasma Spectrometry for the Analysis of Engineered Nanoparticles in Suspensions and Products. Journal of Analytical Atomic Spectrometry. 2011;26:1701.

5. Ana L-S, Muñoz Olivas R, Landaluze JS, Cámara C. Nanoparticles: a global vision. Characterization, separation, and quantification methods. Potential environmental and health impact. Anal Methods. 2014;6(38):38–56.

6. Gwinn MR, Vallyathan V. Nanoparticles: health effects--pros and cons. Environmental health perspectives. 2006;114(12):1818-25.

7. Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM. Nanosilver as a new generation of nanoproduct in biomedical applications. Trends in Biotechnology. 2010;28(11):580-8.

8. Corma A, Atienzar P, García H, Chane-Ching J-Y. Hierarchically mesostructured doped CeO2 with potential for solar-cell use. Nature Materials. 2004;3(6):394-7.

9. Masciangioli T, Zhang W-X. Peer Reviewed: Environmental Technologies at the Nanoscale. Environmental Science & Technology. 2003;37(5):102A-8A.

10. Khan A, Wang J, Li J, Wang X, Chen Z, Alsaedi A, et al. The role of graphene oxide and graphene oxide-based nanomaterials in the removal of pharmaceuticals from aqueous media: a review. Environmental Science and Pollution Research. 2017;24(9):7938-58.

11. Wang X, Yu S, Jin J, Wang H, Alharbi NS, Alsaedi A, et al. Application of graphene oxides and graphene oxide-based nanomaterials in radionuclide removal from aqueous solutions. Science Bulletin. 2016;61(20):1583-93.

12. Li J, Wang X, Zhao G, Chen C, Chai Z, Alsaedi A, et al. Metal-organic frameworkbased materials: Superior adsorbents for the capture of toxic and radioactive metal ions. Chemical Society Reviews. 2018;47(7):2322-56.

13. Wang P, Wang X, Yu S, Zou Y, Wang J, Chen Z, et al. Silica coated Fe3O4 magnetic nanospheres for high removal of organic pollutants from wastewater. Chemical Engineering Journal. 2016;306:280-8.

14. Gopalan B, Ito I, Branch CD, Stephens C, Roth JA, Ramesh R. Nanoparticle Based Systemic Gene Therapy for Lung Cancer: Molecular Mechanisms and Strategies to Suppress Nanoparticle-Mediated Inflammatory Response. Technology in Cancer Research & Treatment. 2004;3(6):647-57.

15. Liu W-T. Nanoparticles and their biological and environmental applications. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2006;102(1):1-7.

16. Penn SG, He L, Natan MJ. Nanoparticles for bioanalysis. Current Opinion in Chemical Biology. 2003;7(5):609-15.

17. Khot LR, Sankaran S, Maja JM, Ehsani R, Schuster EW. Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A review. Crop Protection. 2012;35:64-70.

18. Vance ME, Kuiken T, Vejerano EP, McGinnis SP, Hochella MFJ, Rejeski D, et al. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory Beilstein J Nanotechnol. 2015;6:1769–80.

19. Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Cogliano V. Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc. The Lancet Oncology. 2006;7(4):295-6.

20. Shukla RK, Sharma V, Pandey AK, Singh S, Sultana S, Dhawan A. ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. Toxicology in Vitro. 2011;25(1):231-41.

21. Horie M, Sugino S, Kato H, Tabei Y, Nakamura A, Yoshida Y. Does photocatalytic activity of TiO2 nanoparticles correspond to photo-cytotoxicity? Cellular uptake of TiO2 nanoparticles is important in their photo-cytotoxicity. Toxicology Mechanisms and Methods. 2016;26(4):284-94.

22. Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, Hristovski K, von Goetz N. Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products. Environmental Science & Technology. 2012;46(4):2242-50.

23. Jovanović B. Critical review of public health regulations of titanium dioxide, a human food additive. Integr Environ Assess Manag. 2015;11(1):10-20.

24. Donaldson K, Stone V, Tran CL, Kreyling W, Borm PJA. Nanotoxicology. Occup Environ Med. 2004;61(9):727-8.

25. Boxall A, Chaudhry Q, Sinclair C, Jones A, Aitken R, Jefferson B, et al. Current and future predicted environmental exposure to engineered nanoparticles. York, UK: Central Science Laboratory; 2007.

26. Tiede K, Boxall ABA, Tear SP, Lewis J, David H, Hassellöv M. Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. Food Additives & Contaminants: Part A. 2008;25(7):795-821.

27. Szymańska R, Kołodziej K, Ślesak I, Zimak-Piekarczyk P, Orzechowska A, Gabruk M, et al. Titanium dioxide nanoparticles (100–1000 mg/l) can affect vitamin E response in Arabidopsis thaliana. Environmental Pollution. 2016;213:957-65.

28. Mueller NC, Nowack B. Exposure Modeling of Engineered Nanoparticles in the Environment. Environmental Science & Technology. 2008;42(12):4447-53.

29. Shakeel M, Jabeen F, Shabbir S, Asghar MS, Khan MS, Chaudhry AS. Toxicity of Nano-Titanium Dioxide (TiO2-NP) Through Various Routes of Exposure: a Review. Biological Trace Element Research. 2016;172(1):1-36.

30. Heringa MB, Geraets L, van Eijkeren JCH, Vandebriel RJ, de Jong WH, Oomen AG. Risk assessment of titanium dioxide nanoparticles via oral exposure, including toxicokinetic considerations. Nanotoxicology. 2016;10(10):1515-25.

31. Haynes VN, Ward JE, Russell BJ, Agrios AG. Photocatalytic effects of titanium dioxide nanoparticles on aquatic organisms—Current knowledge and suggestions for future research. Aquatic Toxicology. 2017;185:138-48.

32. Hou J, Wang L, Wang C, Zhang S, Liu H, Li S, et al. Toxicity and mechanisms of action of titanium dioxide nanoparticles in living organisms. Journal of Environmental Sciences. 2019;75:40-53.

33. Sadiq IM, Dalai S, Chandrasekaran N, Mukherjee A. Ecotoxicity study of titania (TiO2) NPs on two microalgae species: Scenedesmus sp. and Chlorella sp. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2011;74(5):1180-7.

34. Dan Y, Zhang W, Xue R, Ma X, Stephan C, Shi H. Characterization of Gold Nanoparticle Uptake by Tomato Plants Using Enzymatic Extraction Followed by Single-

Particle Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry Analysis. Environmental Science & Technology. 2015;49(5):3007-14.

35. Lappas CM. The immunomodulatory effects of titanium dioxide and silver nanoparticles. Food and Chemical Toxicology. 2015;85:78-83.

36. Oberdörster G, Ferin J, Lehnert BE. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. Environmental health perspectives. 1994;102 Suppl 5(Suppl 5):173-9.

37. Wang J, Wang J, Liu Y, Nie Y, Si B, Wang T, et al. Aging-independent and sizedependent genotoxic response induced by titanium dioxide nanoparticles in mammalian cells. Journal of Environmental Sciences. 2019;85:94-106.

38. Hu H, Fan X, Yin Y, Guo Q, Yang D, Wei X, et al. Mechanisms of titanium dioxide nanoparticle-induced oxidative stress and modulation of plasma glucose in mice. Environmental Toxicology. 2019;0(0):1-15.

39. Lee J, Jeong J-S, Kim SY, Park M-K, Choi S-D, Kim U-J, et al. Titanium dioxide nanoparticles oral exposure to pregnant rats and its distribution. Particle and Fibre Toxicology. 2019;16(1):31.

40. Fu Y, Zhang Y, Chang X, Zhang Y, Ma S, Sui J, et al. Systemic Immune Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles after Repeated Intratracheal Instillation in Rat. International Journal of Molecular Sciences. 2014;15(4):6961-73.

41. Chen Z, Wang Y, Ba T, Li Y, Pu J, Chen T, et al. Genotoxic evaluation of titanium dioxide nanoparticles in vivo and in vitro. Toxicology Letters. 2014;226(3):314-9.

42. Wang J, Li N, Zheng L, Wang S, Wang Y, Zhao X, et al. P38-Nrf-2 Signaling Pathway of Oxidative Stress in Mice Caused by Nanoparticulate TiO2 Biological Trace Element Research. 2011;140(2):186–97.

43. Sheng L, Wang L, Sang X, Zhao X, Hong J, Cheng S, et al. Nano-sized titanium dioxide-induced splenic toxicity: A biological pathway explored using microarray technology. Journal of Hazardous Materials. 2014;278:180-8.

44. Cui Y, Liu H, Ze Y, Zengli Z, Hu Y, Cheng Z, et al. Gene Expression in Liver Injury Caused by Long-term Exposure to Titanium Dioxide Nanoparticles in Mice. Toxicological Sciences. 2012;128(1):171-85.

45. Cui Y, Liu H, Zhou M, Duan Y, Li N, Gong X, et al. Signaling pathway of inflammatory responses in the mouse liver caused by TiO2 nanoparticles. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2011;96A(1):221-9.

46. Park E-J, Yoon J, Choi K, Yi J, Park K. Induction of chronic inflammation in mice treated with titanium dioxide nanoparticles by intratracheal instillation. Toxicology. 2009;260(1):37-46.

47. Hong J, Wang L, Zhao X, Yu X, Sheng L, Xu B, et al. Th2 Factors May Be Involved in TiO2 NP-Induced Hepatic Inflammation. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2014;62(28):6871-8.

48. Schanen BC, Karakoti AS, Seal S, Drake Iii DR, Warren WL, Self WT. Exposure to Titanium Dioxide Nanomaterials Provokes Inflammation of an in Vitro Human Immune Construct. ACS Nano. 2009;3(9):2523-32.

49. Laborda F, Bolea, E., Cepri, Gemma., Gómez, María. T., Jiménez, María. S., Pérez-Arantegui, Josefina., Castillo, Juan R. Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples. Analytica Chimica Acta. 2016;904:10-32. 50. Stephan C, Neubauer K. Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Understanding How and Why. PerkinElmer White Paper. 2014.

51. Pace HE, Rogers, Nicola. J., Jarolimek, Chad., Coleman, Victoria. A., Higgins, Christopher P., Ranville, James. F. Determining Transport Efficiency for the Purpose of Counting and Sizing Nanoparticles via Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Anal Chem. 2011;24(83):9361–9.

52. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. Fundamentos de Química Analítica. 8th ed. Madrid, Spain: Paraninfo; 2008. 1065 p.

53. Abad-Álvaro I, Peña-Vázquez E, Bolea E, Bermejo-Barrera P, Castillo JR, Laborda F. Evaluation of number concentration quantification by single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry: microsecond vs. millisecond dwell times. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2016;408(19):5089-97.

54. Laborda F, Bolea E, Jiménez-Lamana J. Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Nanoanalysis. Anal Chem. 2014;86(5):2270–8.

55. Taboada-López MV, Iglesias-López, Sara., Herbello-Hermelo, Paloma., Bermejo-Barrera, Pilar., Moreda-Piñeiro, Antonio. Ultrasound assisted enzymatic hydrolysis for isolating titanium dioxide nanoparticles from bivalve mollusk before sp-ICP-MS. Analytica Chimica Acta. 2018;1018:16-25.

56. Taboada-López MV, Herbello-Hermelo, Paloma., Bermejo-Barrera, Pilar., Moreda-Piñeiro, Antonio. Determination and characterization of silver nanoparticles in bivalve molluscs by ultrasound assisted enzymatic hydrolysis and sp-ICP-MS. Microchemical Journal. 2019;148:652–60.

57. Taboada-López MV, Herbello-Hermelo, Paloma., Domínguez-González, Raquel., Bermejo-Barrera, Pilar., Moreda-Piñeiro, Antonio. Enzymatic hydrolysis as a sample pretreatment for titanium dioxide nanoparticles assessment in surimi (crab sticks) by single particle ICP-MS Talanta. 2019;195:23–32.

58. Jiménez-Lamana J, Laborda F, Bolea E, Abad-Álvaro I, Castillo JR, Bianga J, et al. An insight into silver nanoparticles bioavailability in rats. Metallomics. 2014;6(12):2242-9.

59. Loeschner K, Brabrand MSJ, Sloth JJ, Larsen EH. Use of alkaline or enzymatic sample pretreatment prior to characterization of gold nanoparticles in animal tissue by single-particle ICPMS. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2014;406(16):3845-51.

60. Gray EP, Coleman JG, Bednar AJ, Kennedy AJ, Ranville JF, Higgins CP. Extraction and Analysis of Silver and Gold Nanoparticles from Biological Tissues Using Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Environmental Science & Technology. 2013;47(24):14315-23.

61. Su C-K, Liu H-T, Hsia S-C, Sun Y-C. Quantitatively Profiling the Dissolution and Redistribution of Silver Nanoparticles in Living Rats Using a Knotted Reactor-Based Differentiation Scheme. Analytical Chemistry. 2014;86(16):8267-74.

62. Witzler M, Küllmer F, Hirtz A, Günther K. Validation of Gold and Silver Nanoparticle Analysis in Fruit Juices by Single-Particle ICP-MS without Sample Pretreatment. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2016;64(20):4165-70.

63. Schmidt B, Loeschner K, Hadrup N, Mortensen A, Sloth JJ, Bender Koch C, et al. Quantitative Characterization of Gold Nanoparticles by Field-Flow Fractionation Coupled Online with Light Scattering Detection and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Analytical Chemistry. 2011;83(7):2461-8.

64. Badalova K, Herbello-Hermelo P, Bermejo-Barrera P, Moreda-Piñeiro A. Possibilities of single particle—ICP-MS for determining/characterizing titanium dioxide and

silver nanoparticles in human urine. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 2019;54:55-61.

65. Bocca B, Caimi S, Senofonte O, Alimonti A, Petrucci F. ICP-MS based methods to characterize nanoparticles of TiO2 and ZnO in sunscreens with focus on regulatory and safety issues. Science of The Total Environment. 2018;630:922-30.

66. Barwick V, Bravo PPM, Ellison SLR, Engman J, Gjengedal ELF, Lund UO, et al. The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics 2ed: Eurachem; 2014. 62 p.

67. Administration FaD. Guidelines for the Validation of Chemical Methods in Food, Feed, Cosmetics, and Veterinary Products. 3rd ed. (RSCC) FFPRSSC, editor2019.

68. Europea C. RECOMENDACIÓN DE LA COMISIÓN de 18 de octubre de 2011 relativa a la definición de nanomaterial 2011.