

DETECCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITANIO EN MUESTRAS COMPLEJAS MEDIANTE AF4-ICPMS

D. Ojeda¹, V. Taboada², E. Bolea¹, F. Laborda¹, A. Moreda², J. Pérez-Arantegui¹, P. Bermejo², J.R. Castillo¹

¹Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores (GEAS). Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA). Universidad de Zaragoza, Pedro Cerbuna 12, 50009, Zaragoza

²Grupo de Elementos Traza, Espectroscopía y Especiación (GETEE). Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Facultad de Química, Universidad de Santiago de Compostela, Avenida das Ciencias s/n, 15782, Santiago de Compostela

Introducción

Uno de los casos más representativos del actual auge de los nanomateriales, en cuanto a su incorporación en gran diversidad de productos de consumo se refiere [1], es el dióxido de titanio (TiO₂). Sus propiedades relacionadas con la capacidad de refracción y de fotocatalisis en su forma nanoparticulada (1-100 nm), hacen que se esté utilizando en productos comerciales como cremas solares, cosméticos, envases y recubrimientos [2]. Además, el dióxido de titanio se utiliza como aditivo alimentario y pigmento blanqueador [3], y en otras áreas como la remediación medioambiental. Conscientes de su relevancia, el interés por estudiar sus posibles efectos potenciales tanto en la salud humana [4,5] como en el medio ambiente [6,7] ha aumentado en los últimos años.

Debido a la disparidad de tipos de muestras y posibles escenarios en los que se pueden encontrar presentes estos nanomateriales a lo largo del ciclo de vida de los productos que los contienen, se hace patente la necesidad del desarrollo de metodologías que puedan aportar información adicional y complementaria a las técnicas que se emplean habitualmente [8], como es el caso de las diferentes microscopías electrónicas o las técnicas basadas en la dispersión de radiación.

En este trabajo se plantea el uso de la técnica de Fraccionamiento en Flujo mediante Campos de Flujo Asimétrico (AF4) acoplado a absorción molecular ultravioleta-visible (UV-Vis) y espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) para la detección y caracterización de nanopartículas (NPs) de TiO₂ en muestras complejas.

Esta técnica permite la separación de partículas en función de su tamaño (coeficiente de difusión), a partir de la aplicación de un caudal perpendicular al flujo en el interior de un canal por el que circulan en régimen laminar. En el fondo del canal se sitúa una membrana permeable, de manera que especies de tamaño inferior al tamaño de corte de la membrana (habitualmente <10 kDa) se pierden y no son eluidas. El flujo perpendicular (crossflow) aplicado permite establecer el rango de tamaños en los que se produce la separación, teniendo en cuenta que a mayor crossflow mayor retención.

Desarrollo experimental

En primer lugar, se ha llevado a cabo el estudio de las condiciones que permiten la suspensión estable de las NPs de TiO₂, para su posterior separación y caracterización mediante AF4. Este estudio se ha realizado con NPs comercializadas en forma de polvo de diferentes tamaños (30, 50 y 100 nm), fundamentalmente a través de la composición del medio, así como de las condiciones de sonicación necesarias para evitar fenómenos de aglomeración. La utilización de disoluciones acuosas al 1% en glicerol y sonicando con sonda durante 15 min. (Tabla 1), permitieron obtener suspensiones estables durante un mes.

Variable	Condición optimizada
Membrana	Celulosa Regenerada 5 kDa
Estabilidad	Sonda 15 min (45% A. 25 V)
Portador	Tensoactivo mixto 0,05% (≈ FL-70)
Caudal detector flow	1 ml/min
Caudal cross flow	0,1 ml/min

Tabla 1. Condiciones optimizadas para la separación de TiO₂ NPs en AF4.

Posteriormente se estudiaron las condiciones que permitieran una correcta separación las NPs de TiO₂ de diferentes tamaños. Para ello, se partió de las condiciones óptimas descritas en la bibliografía para este tipo de NPs [2, 9-11]. En términos generales, la mayor parte de los autores utilizan membranas de celulosa regenerada (RC) y portadores de agua ultrapura con algún surfactante neutro (como el FL-70) o aniónico (SDS) en concentraciones del orden de 0,01-0,1% o alguna sal (pirofosfato de sodio 0,1% o hexametáfosfato de sodio 1 mM). Estas variables se optimizaron atendiendo al valor de recuperación que se obtenía para las distintas NPs estudiadas (cociente entre la señal obtenida en las condiciones de separación y la señal directa sin separación). Valores por encima del 80% suelen considerarse aceptables en AF4. En el caso de las tres suspensiones de TiO₂ utilizadas, se obtuvieron recuperaciones superiores al 90% con las condiciones descritas en la tabla 1. Tal y como se ha comentado con anterioridad, el crossflow aplicado es la variable que afecta fundamentalmente a la separación en el canal. Su optimización (tabla 1) permitió llevar a cabo la separación de los tres tamaños de NP (rango de 30 a 100 nm) en unos tiempos de elución entre los 12 y los 20 min en el máximo de pico (figura 1). En estas condiciones, e inyectando un volumen de muestra de 100 µL, se obtuvo un límite de detección de 0,9 µg L⁻¹ (para ⁴⁹Ti), acoplado el sistema a ICP-MS.

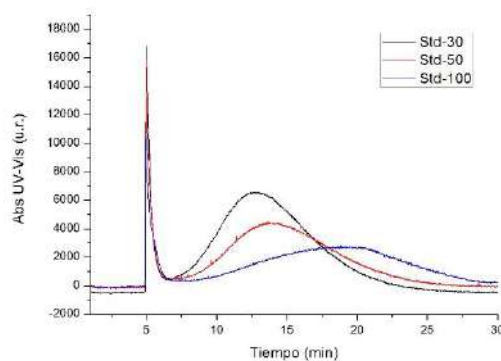


Figura 1. Fractograma con estándares de TiO₂ de diferentes tamaños separados en AF4.

Aplicación a muestras complejas

El procedimiento optimizado se aplicó a la detección y caracterización de NPs de TiO_2 presentes en dos tipos de muestras. Por un lado, una muestra sólida alimentaria (surimi), en la que el dióxido de titanio se utiliza como blanqueante (E-171), y en el que se pretende detectar la presencia de posibles nanopartículas de TiO_2 , teniendo en cuenta que el aditivo es añadido en forma de micropartículas. El otro producto es un material de construcción que se utiliza en recubrimientos con propiedades fotocatalíticas y en cuya composición aparece el dióxido de titanio en forma nanoparticulada.

En el caso del surimi, se desarrollaron dos estrategias para la extracción y puesta en suspensión de las NPs de TiO_2 : una digestión enzimática (lipasa/pancreatina), a pH 7,4, en agitación a 37°C y posterior centrifugación; y una digestión alcalina con hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) al 25% (v/v), a pH 7, sonicando en baño de ultrasonidos. Previamente al estudio del surimi mediante AF4-ICP-MS, se llevó a cabo la caracterización del digerido enzimático mediante SP-ICPMS, lo que permitió confirmar la presencia de NPs TiO_2 con tamaños inferiores a los 100 nm.

La inyección del digerido enzimático en AF4-ICPMS no produjo ninguna señal que pudiera corresponder a NPs de TiO_2 (figura 2), probablemente debido a los bajos niveles de concentración y las interferencias provocadas por el uso de enzimas durante la digestión y presentes en el medio en concentración considerable (2 g L^{-1}). Para el caso de la digestión alcalina, se obtuvo un pico a un tiempo de 8,3 minutos (figura 2), pero sin separarse completamente del pico inicial (correspondiente a especies no retenidas o no focalizadas correctamente durante la etapa de inyección/focalización, previa a la separación). La recuperación para ^{49}Ti fue del 65%, lo que implica que un porcentaje considerable del Ti en la muestra se filtra a través de la membrana (tamaño $< 5\text{ kDa}$) o es retenido de forma irreversible en su superficie. Para obtener información sobre este pico a 8,3 min, se adicionaron NPs de TiO_2 de 30 nm a la muestra de surimi en medio alcalino, observándose un aumento en la señal del pico, lo que podría indicar la presencia de NPs de TiO_2 en la propia muestra.

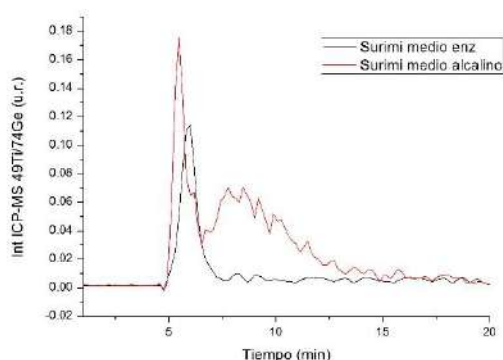


Figura 2. Fractograma de surimi. Comparativa entre los dos tipos de digestiones.

Respecto al material de construcción, no se realizó ningún tratamiento previo de la muestra al tratarse de una suspensión acuosa, que se diluyó convenientemente en el portador utilizado en AF4. Su análisis dio como resultado un fractograma con un pico bien diferenciado, correspondiente a las NPs de TiO_2 , para

un tiempo de elución de 7,1 minutos, y una recuperación para ^{49}Ti del 75% (figura 3).

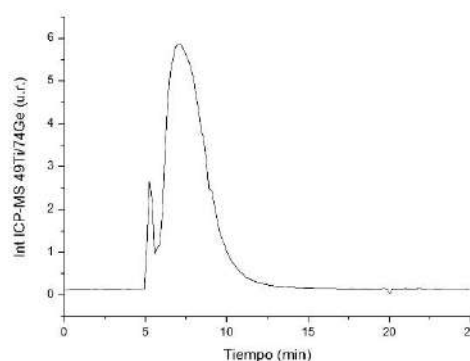


Figura 3. Fractograma del material de construcción.

Caracterización por tamaño

La técnica AF4 permite la caracterización por tamaño de las especies separadas, al ser proporcional el tiempo de elución con el diámetro hidrodinámico de las mismas. Esta relación puede establecerse bien a través de expresiones teóricas, asumiendo un comportamiento ideal de las especies durante su elución, o bien a través de una calibración externa frente a estándares de tamaño conocido, en cuyo caso es necesario asumir un comportamiento similar entre las especies que se quiere caracterizar y dichos estándares. El uso de nanomateriales de la misma naturaleza (en este caso TiO_2) puede ser una estrategia válida, siempre y cuando se disponga de los estándares adecuados, mientras que el uso de estándares de tamaño de poliestireno (PS) suele ser la práctica más habitual para caracterizar todo tipo de nanopartículas [2, 11]. En este trabajo se propone el uso de las NPs de TiO_2 disponibles comercialmente y descritas con anterioridad, NPs de óxido de silicio por tratarse también de óxidos, y NPs de poliestireno. Las tres calibraciones se presentan en la figura 4, obtenidas en las mismas condiciones que las utilizadas en la caracterización de las muestras, descritas en la tabla 1. Como puede observarse, existe una buena correlación entre los estándares de poliestireno y óxido de silicio, con pendientes muy similares, mientras que los tiempos obtenidos para las NPs de óxido de titanio corresponden a tamaños mucho mayores. Un estudio de las suspensiones inyectadas de estos estándares mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM), mostró poblaciones de NPs agregadas, con tamaños superiores a los de las NPs individuales. Es posible, por tanto, que el procedimiento utilizado no permita su desagregación completa y que no sea posible su utilización como estándares de tamaño conocido.

De acuerdo con estos resultados, se procedió a la caracterización por tamaños de los picos obtenidos en las dos muestras utilizando las calibraciones frente a NPs de óxido de silicio y de poliestireno. En el caso del surimi, se determinó que el pico a 8,3 minutos se correspondía con un tamaño de NPs de 60 nm (en el máximo) de acuerdo con la calibración de PS y 80 nm para la de SiO_2 . Estos tamaños, aunque ligeramente superiores a los estimados mediante SP-ICPMS, pueden considerarse como válidos teniendo en cuenta las diferencias en los fundamentos de ambas técnicas a la hora de estimar tamaños. En el caso del material de construcción, se determinó que el pico a 7,1 min se correspondía con tamaños de 20 y 35 nm según las calibraciones de PS y SiO_2 , respectivamente.

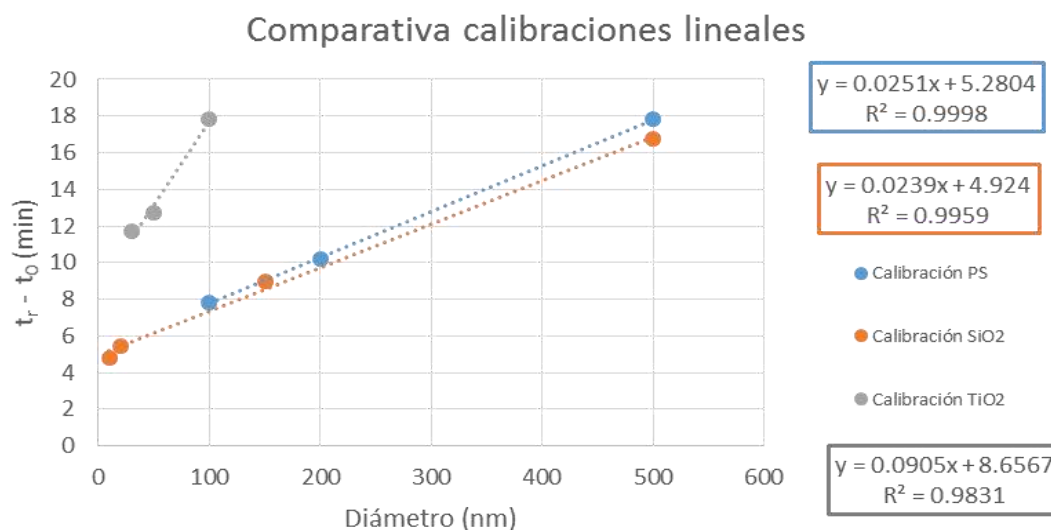


Figura 4. Comparativa calibraciones lineales según tipo de estándares empleados.

A modo de resumen, se puede concluir que se ha desarrollado un método basado en AF4-UV-Vis-ICPMS que permite la separación en función del tamaño para suspensiones de NPs de TiO₂ comerciales, con unas recuperaciones superiores al 90%. La aplicación de este método ha permitido además detectar y estimar el tamaño de NPs de TiO₂ presentes en muestras complejas, como surimis y materiales de construcción.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido subvencionado por el proyecto CTQ2015-68094 del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) de España. Agradecer también a la Sociedad Española de Química Analítica la oportunidad de presentar oralmente este estudio, así como la beca que concedió. Y a los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación, dentro de la Universidad de Zaragoza.

Referencias

- [1] Wiesner, M. R., Lowry, G. V., Alvarez, P., Dionysiou, D. & Biswas, P. Assessing the risks of manufactured nanomaterials. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 4336–4345 (2006).
- [2] Contado, C. & Pagnoni, A. TiO₂ nano- and micro-particles in commercial foundation creams: Field Flow-Fractionation techniques together with ICP-AES and SQW Voltammetry for their characterization. *Anal. Methods* **2**, 1112 (2010).
- [3] Peters, R. J. B. *et al.* Characterization of titanium dioxide nanoparticles in food products: Analytical methods to define nanoparticles. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 6285–6293 (2014).
- [4] Jones, K. *et al.* Human in vivo and in vitro studies on gastrointestinal absorption of titanium dioxide nanoparticles. *Toxicol. Lett.* **233**, 95–101 (2015).

- [5] Lankott, A. *et al.* The effect of agglomeration state of silver and titanium dioxide nanoparticles on cellular response of HepG2, A549 and THP-1 cells. *Toxicol. Lett.* **208**, 197–213 (2012).

- [6] Hazeem, L. J. *et al.* Cumulative effect of zinc oxide and titanium oxide nanoparticles on growth and chlorophyll a content of *Picochlorum* sp. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2821–2830 (2015). doi:10.1007/s11356-015-4370-5

- [7] Salieri, B., Righi, S., Pasteris, A. & Olsen, S. I. Freshwater ecotoxicity characterisation factor for metal oxide nanoparticles: A case study on titanium dioxide nanoparticle. *Sci. Total Environ.* **505**, 494–502 (2015).

- [8] Laborda, F. *et al.* Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples. *Anal. Chim. Acta* **904**, 10–32 (2016).

- [9] Nischwitz, V. & Goenaga-Infante, H. Improved sample preparation and quality control for the characterisation of titanium dioxide nanoparticles in sunscreens using flow field flow fractionation on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **27**, 1084 (2012).

- [10] Omar, J., Boix, A., Kerckhove, G. & von Holst, C. Optimisation of asymmetric flow field-flow fractionation for the characterisation of nanoparticles in coated polydisperse TiO₂ with applications in food and feed. *Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* **33**, 1775–1784 (2016).

- [11] Bendixen, N., Losert, S., Adlhart, C., Lattuada, M. & Ulrich, A. Membrane-particle interactions in an asymmetric flow field flow fractionation channel studied with titanium dioxide nanoparticles. *J. Chromatogr. A* **1334**, 92–100 (2014).