

COMBINACIÓN DE LA EXTRACCIÓN EN PUNTO DE NUBE CON TXRF Y SP-ICPMS PARA LA DETERMINACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN MUESTRAS ACUOSAS

L. Torrent<sup>(1)</sup>, F. Laborda<sup>(2)</sup>, M. Iglesias<sup>(1)</sup>, E. Marguí<sup>(1)</sup>, M. Hidalgo<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universitat de Girona, C/M<sup>a</sup> Aurèlia Capmany, 69, 17003, Girona

<sup>(2)</sup> Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores (GEAS), Instituto Univ. De Inv. en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA), Universidad de Zaragoza, Pedro Cerbuna, 12, 50009, Zaragoza

1. Introducción

En los últimos años se ha incrementado la producción de nanopartículas metálicas en la industria, siendo las nanopartículas de plata (AgNPs) ampliamente usadas por sus propiedades antibacterianas. La expansión de su fabricación provoca inevitablemente su liberación en el medio ambiente, generando una preocupación por los efectos nocivos que puedan tener sobre éste y los seres vivos. En el medio estas partículas son susceptibles de sufrir transformaciones químicas y morfológicas, como la oxidación a plata (I), que está relacionada con la toxicidad de las AgNPs [1]. Debido a la coexistencia de Ag(I) y AgNPs en el medio ambiente es necesario el desarrollo de métodos analíticos para el análisis de especiación.

En este sentido, las técnicas de fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF4) o la electroforesis capilar (CE) acopladas a la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICPMS) se han mostrado prometedoras para la separación y caracterización de los nanomateriales. Sin embargo, estas técnicas son caras y presentan algunos inconvenientes, como la adsorción de nanopartículas en la membrana de AF4 o la complicada determinación del tamaño de las partículas mediante la CE [2,3]. Adicionalmente a estas técnicas sofisticadas, se han desarrollado otras metodologías más simples y económicas para la determinación y especiación de las AgNPs. En esta categoría se encuentra la extracción en punto de nube, también conocida como "cloud-point extraction" (CPE), que permite la separación y preconcentración de las AgNPs en presencia de Ag(I) sin alterar ni la forma ni el tamaño de las partículas. Esta metodología consiste en añadir un surfactante (habitualmente (1,1,3,3-tetrametilbutil) fenil-polietilenglicol (TX-114)) a la muestra acuosa a una concentración superior a la micelar crítica (cmc) y posteriormente aplicarle una temperatura superior a la temperatura específica de punto de nube (23°C para el TX-114), donde el surfactante forma micelas encapsulando las nanopartículas. Debido a que la densidad de las micelas es superior a la del agua las nanopartículas son depositadas y concentradas en un pequeño volumen de surfactante mediante centrifugación [4,5]. La CPE se ha combinado principalmente con la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICPMS) para la determinación de nanopartículas metálicas, como las de plata, en distintos tipos de muestras acuosas. Esta combinación (CPE-ICPMS) se suele llevar a cabo mediante una digestión ácida en microondas del extracto de surfactante rico en nanopartículas previamente al análisis por ICPMS [6], lo cual hace que la metodología analítica sea más laboriosa y costosa.

El objetivo del presente trabajo consiste en usar la CPE en combinación con otras técnicas analíticas, prescindiendo de la etapa de digestión. Con este objetivo se estudiaron las ventajas e inconvenientes de la combinación de la CPE con la espectrometría de fluorescencia de rayos-X por reflexión total

(TXRF) y la detección de partículas individuales mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (SP-ICPMS) para la identificación, caracterización y cuantificación de las AgNPs en muestras acuosas.

2. Optimización de los parámetros que afectan a la CPE

En este trabajo la metodología CPE usada se basaba en la descrita por Liu et al. (ver Figura 1) [4], realizándose una serie de modificaciones para obtener una buena preconcentración, separación y detección de las nanopartículas de plata en muestras acuosas.

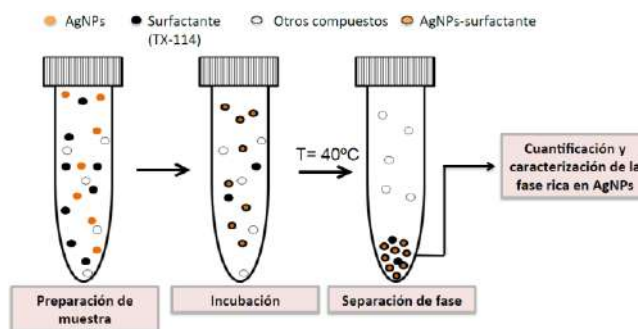


Figura 1. Esquema de la metodología CPE.

Con este fin, se evaluaron los dos factores más importantes que afectan a dicha extracción, el pH y la concentración y volumen de surfactante.

**pH.** Según la bibliografía existente, el pH es un factor crítico en la extracción de nanomateriales mediante la CPE, dado que la mayor eficiencia de extracción se obtiene en el pH en el cual la carga eléctrica es cero (punto isoeléctrico) [4]. En este trabajo, se estudió la influencia del pH en la extracción de AgNPs de 100 nm con distintos recubrimientos: citrato (AgNPs-citrato), polivinilpirrolidona (AgNPs-PVP) y polietilenglicol (AgNPs-PEG). El rango de estudio para la optimización del pH de las diferentes muestras fue de pH 3,0-10,0. Los pHs inferiores a 3,0 se descartaron debido a la posible disolución de las AgNPs y la descomposición del S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> y formación de sulfuros [4]. Los resultados mostraron que la eficiencia de extracción era mayor ajustando el pH a 3,7 para las AgNPs-citrato y AgNPs-PVP. En cambio, la mayor señal de plata para las AgNPs-PEG fue obtenida ajustando el pH a 3,0. Debido a que las muestras reales contienen distintos tipos de AgNPs, el pH seleccionado fue el de 3,7.

**Concentración y volumen de surfactante.** Como se ha comentado anteriormente, la metodología CPE permite preconcentrar las AgNPs. Con este fin, se testaron distintos volúmenes (0,1; 0,2 y 0,4 mL) y concentraciones (1,25; 2,5 y 5,0%)

del surfactante TX-114 para obtener la máxima preconcentración de AgNPs. La mayor señal de Ag se obtuvo añadiendo 0,2 mL de surfactante al 5,0%, por lo tanto se seleccionaron estas condiciones de trabajo.

Finalmente, el procedimiento seguido para llevar a cabo la CPE consistió en ajustar a pH 3,7 una solución acuosa que contenía AgNPs (9,5 mL), después añadir 0,1 mL de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  1M que acompañaba la Ag(I) presente en la muestra y 0,2 mL del surfactante TX-114 (5,0%). Seguidamente, la muestra era incubada a 40°C durante 30 min y centrifugada a 2000 rpm durante 5 min para facilitar la separación de fases. Para poder decantar el sobrenadante, la muestra se ponía en el congelador durante 10 min para la solidificación de la fase orgánica (surfactante). La fase surfactante rica en AgNPs ( $\approx 100 \mu\text{L}$ ) era caracterizada y cuantificada.

### 3. Combinación de CPE con TXRF

#### Deposición del extracto CPE en el reflector de cuarzo

En la metodología CPE descrita por Liu et al. la cuantificación de las AgNPs se realiza mediante ICPMS con una digestión previa del extracto rico en AgNPs. En este estudio, se propone por primera vez la TXRF como técnica de análisis después de la CPE con un instrumento que está equipado con un tubo de rayos-X de tungsteno que permite realizar el análisis usando la línea Ag- $K_{\alpha}$  (S2 PICOFOX, Bruker Nano GmbH). El análisis por TXRF implica que las muestras sean depositadas como una película fina sobre un soporte reflector, que en el caso de las muestras líquidas se consigue depositando 5-50  $\mu\text{L}$  de muestra y secándola posteriormente [7]. Teniendo en cuenta la deposición de la muestra, se probaron dos tratamientos alternativos a la digestión: análisis directo del extracto y evaporación y reconstitución con otro disolvente.

**Análisis directo del extracto.** En primer lugar, se estudió la posibilidad de analizar el extracto obtenido de la CPE depositándolo directamente sobre el reflector de cuarzo, debido a que los surfactantes son comúnmente utilizados para preparar suspensiones homogéneas de muestras sólidas para el análisis por TXRF [8]. Pero el análisis directo del extracto de la CPE se descartó dado que la precisión de los resultados obtenidos no era aceptable para realizar un análisis cuantitativo ( $\text{RSD} > 30\%$ ,  $n = 5$ ). Esta baja precisión en los resultados podía ser debida a la elevada viscosidad del surfactante después de la CPE que complicaba la correcta deposición y secado del extracto sobre el soporte reflector.

**Evaporación del extracto y reconstitución.** Dado que el análisis directo del extracto fue descartado, se probó a evaporarlo y reconstituirlo con un disolvente adecuado para ser depositado en el reflector de cuarzo para el análisis por TXRF. Para esto, primero se probaron distintas temperaturas para evaporar el extracto obtenido en la CPE (60°C y 100°C). Los resultados mostraron que no había diferencias significativas entre evaporar el extracto de la CPE a 60°C o 100°C. Por lo tanto, se seleccionó trabajar a 100°C, ya que el tiempo requerido para la evaporación de la fase orgánica era más corto (2,5 horas en comparación con 5 horas). Una vez seleccionada la temperatura de evaporación, se probaron distintos disolventes para reconstituir la muestra evaporada. Los disolventes organoclorados son apropiados para el análisis TXRF porque su elevada volatilidad facilita el secado de la muestra para su posterior análisis [9]. Por este motivo, los disolventes que se probaron fueron los siguientes: cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ), tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ), metanol/ácido nítrico ( $\text{CH}_4/\text{HNO}_3$ ) y

tetrahidrofurano ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ ). La disolución de la fase rica en AgNPs no fue posible utilizando  $\text{CHCl}_3$  y la mezcla  $\text{CH}_4/\text{HNO}_3$ . En cambio, sí lo fue con  $\text{CCl}_4$  y  $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ . El  $\text{CCl}_4$  fue el disolvente escogido ya que daba una mayor señal de plata. Finalmente, se determinó el mínimo volumen de  $\text{CCl}_4$  necesario para reconstituir el extracto debido a la toxicidad de este disolvente. Con este objetivo se probó a reconstituir la muestra con 20  $\mu\text{L}$  y 60  $\mu\text{L}$ , seleccionando 20  $\mu\text{L}$  como volumen adecuado para resuspender la muestra evaporada ya que se observó que el extracto se solubilizaba cuantitativamente y la señal de plata era mayor que usando cantidades de  $\text{CCl}_4$  mayores.

Usando las mejores condiciones de preparación de muestra mediante la evaporación del extracto de la CPE (temperatura evaporación 100°C) y una posterior reconstitución (disolución del extracto evaporado con 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{CCl}_4$ ), se obtuvo una buena reproducibilidad en los resultados ( $\text{RSD} \approx 12\%$ ,  $n = 3$ ) secando la gota de extracto fácilmente antes de su análisis por TXRF y obteniendo una deposición homogénea de la muestra.

#### Prestaciones del método

Una vez establecidas las condiciones de preparación de la muestra para el análisis del extracto de CPE mediante TXRF, se evaluaron las prestaciones del método CPE-TXRF donde se obtuvieron unos límites de detección (LODs) alrededor de 0,8  $\mu\text{g L}^{-1}$ , unos límites de cuantificación (LOQs) de 2,7  $\mu\text{g L}^{-1}$  y una buena linealidad en el rango de 15-1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  para todos los tipos de AgNPs estudiadas (AgNPs-citrato, AgNPs-PVP, AgNPs-PEG). En las recuperaciones de extracción se observó que la presencia de AgNPs con distintos recubrimientos y tamaños no afectaba a la extracción de las partículas mediante CPE, ya que se obtuvieron recuperaciones entre 73-106%. En cambio, la presencia de Ag(I) afectaba a la extracción de las AgNPs cuando su concentración era 3 veces mayor a la de las nanopartículas, dando rendimientos de extracción superiores al 100%.

### 4. Combinación de CPE con SP-ICPMS

La metodología descrita anteriormente (CPE-TXRF), solamente nos permite obtener información sobre la cantidad total de plata (en forma de AgNPs), presente en el extracto. Esto implica que no nos permite obtener información sobre el tamaño de las partículas ni la concentración en número de partículas de Ag. Sin embargo, actualmente se está trabajando en el desarrollo de una metodología que permita combinar CPE con SP-ICPMS. El uso de esta técnica analítica ha aumentado en los últimos años, ya que permite detectar y caracterizar nanopartículas en muestras acuosas. El análisis por SP-ICPMS requiere soluciones suficientemente diluidas y tiempos de medida cortos para asegurar que sólo se mide una partícula en cada período de lectura [10]. Teniendo en cuenta los requisitos para llevar a cabo el análisis por SP-ICPMS, se procedió al desarrollo de la metodología CPE-(SP-ICPMS):

#### Dilución del extracto de CPE

A diferencia de TXRF, el análisis por SP-ICPMS está limitado por la introducción de la muestra en el instrumento de análisis. Por este motivo es importante seleccionar un disolvente adecuado para poder introducir la muestra en el instrumento. Además, el volumen necesario para llevar a cabo el análisis es mayor (mL) en comparación con la TXRF ( $\mu\text{L}$ ). Así que en primer lugar se probaron una serie de disolventes adecuados para diluir el extracto

obtenido en la CPE. Los disolventes que se probaron son los siguientes: agua, isopropanol 1% y glicerol 1%. Diluyendo el extracto rico en AgNPs a 15 mL, se observó que en todos los casos se obtenía una suspensión homogénea, excepto en el caso del agua. Finalmente, se seleccionó el glicerol 1% dado que los rendimientos de nebulización ( $\eta_{neb}=3,5$ ) eran muy similares a los obtenidos en una solución acuosa de AgNPs ( $\eta_{neb}=3,5$ ). El análisis de las muestras en este estudio se llevó a cabo mediante ICPMS (Elan DCR-e, PerkinElmer).

### Determinación del tamaño de las AgNPs

La determinación del tamaño de las partículas se realizó a partir de la siguiente ecuación:

$$r_{NP} = K_{ICPMS} K_M \frac{1}{6} \pi \rho d^3 \quad \text{Ec. 1}$$

donde  $r_{NP}$  es la intensidad del pulso producido por una nanopartícula,  $K_{ICPMS}$  el rendimiento de detección (iones detectados por átomos introducidos en el plasma),  $K_M$  incluye una serie de parámetros del elemento ( $K_M = A_{AN} / M_M$ , abundancia, nº Avogadro, masa atómica),  $\rho$  la densidad y  $d$  el diámetro de las partículas. Mientras los parámetros relacionados con la nanopartícula y el elemento son conocidos,  $K_{ICPMS}$  se estima a partir de patrones de Ag(I). En esta estimación se asume que una vez en el plasma los átomos de una solución de Ag(I) y los de una suspensión de AgNPs se comportan igual. Así,  $K_{ICPMS}$  se determina a partir de una recta de calibrado convencional, que permite relacionar la concentración en masa ( $C^M$ ) con la señal para el analito disuelto ( $r_{dis}$ ) a través de:

$$r_{dis} = K_{intro} K_{ICPMS} K_M C^M \quad \text{Ec. 2}$$

donde  $K_{intro}$  es la contribución del sistema de introducción de muestra ( $K_{intro} = \eta_{neb} Q_{muestra}$ ) [10]. Para poder determinar el término  $K_{intro}$  es necesario conocer el caudal de muestra ( $Q_{muestra}$ ) y el rendimiento de nebulización ( $\eta_{neb}$ ).  $\eta_{neb}$  se determinó a partir del método del tamaño [11]. Los rendimientos de nebulización obtenidos para las AgNPs-citrato (100 nm), AgNPs-PVP (75 nm y 100 nm) y las AgNPs-PEG (100 nm) en medio acuoso y medio glicerol 1%, usando un tiempo de integración de 5 ms y un tiempo de lectura de 60 s se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Rendimiento de nebulización de distintos tipos de AgNPs en medio acuoso y medio glicerol 1%. La desviación estándar corresponde a análisis de triplicados.

Solución estándar	Eficiencia de nebulización	
	Agua	Glicerol 1%
AgNPs citrato 100 nm	4,51 ± 0,04	4,7 ± 0,7
AgNPs PEG 100 nm	4,98 ± 0,03	5,00 ± 0,09
AgNPs PVP 100 nm	4,72 ± 0,03	4,46 ± 0,06
AgNPs PVP 75 nm	4,3 ± 0,1	4,4 ± 0,2

Como se puede observar en la Tabla 1 no hay prácticamente diferencias entre los  $\eta_{neb}$  obtenidos en medio acuoso y en medio glicerol 1%. Sin embargo, el tamaño y el recubrimiento de la partícula afecta ligeramente en la determinación del  $\eta_{neb}$  ya que los resultados mostraron ciertas diferencias. Una vez conocido el  $\eta_{neb}$  se pudo determinar la  $K_{intr}$  y consecuentemente el término  $K_{ICPMS}$  de la Ec. 2. Con la estimación de  $K_{ICPMS}$  se determinó el tamaño de las partículas de las suspensiones de estudio mediante la Ec. 1. Los diámetros de las partículas obtenidos se muestran en la Tabla 2. Los resultados obtenidos mostraron que no habían

diferencias entre los diámetros de las partículas determinados experimentalmente con los proporcionados por el fabricante, excepto para las AgNPs-PEG donde el valor del diámetro determinado experimentalmente era un poco inferior al valor certificado del fabricante.

**Tabla 2.** Diámetros de las AgNPs en medio glicerol 1%. Desviación estándar obtenida mediante el análisis de triplicados.

Solución estándar	Tamaño determinado experimentalmente (nm)	Tamaño certificado por el fabricante (nm)
	Glicerol 1%	
AgNPs citrato 100 nm	94 ± 2	95 ± 9
AgNPs PEG 100 nm	84 ± 1	99 ± 10
AgNPs PVP 100 nm	91 ± 1	102 ± 11
AgNPs PVP 75 nm	69 ± 1	77 ± 7

### Determinación de los LODs en tamaño y masa

El límite de detección en tamaño fue de 26 nm y el límite de detección en masa de nanopartícula de 0,094 fg.

## 5. Aplicación a suelos contaminados con nanopartículas de plata

Como se ha comentado en la introducción, las AgNPs son liberadas inevitablemente en el medio, donde pueden interactuar con los componentes del suelo afectando a su movilidad, transporte y biodisponibilidad. Para entender mejor su comportamiento, en este estudio se aplicaron las metodologías desarrolladas (CPE-TXRF y CPE-(SP-ICPMS)) a un lixiviado de suelo acuoso que contenía una mezcla AgNPs y Ag(I). Para obtener este lixiviado, previamente se realizó una desorción de las AgNPs en un suelo contaminado por éstas.

### Desorción AgNPs en el suelo

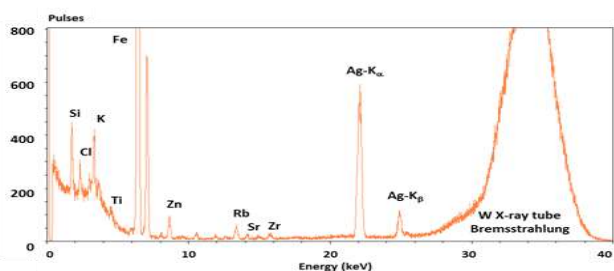
A los suelos contaminados con AgNPs de PVP 75 nm se les añadieron 15 mL de agua Milli-Q y las mezclas se sometieron a agitación rotatoria durante 24 h (35 rpm). Pasado este tiempo, las muestras fueron centrifugadas (3500 rpm, 8 min) y se pipeteó el sobrenadante que contenía partículas inferiores a 0,2  $\mu\text{m}$ .

### CPE del lixiviado acuoso del suelo

Al sobrenadante obtenido en la lixiviación del suelo contaminado con AgNPs, se le aplicó la metodología de la CPE descrita en el apartado 2.

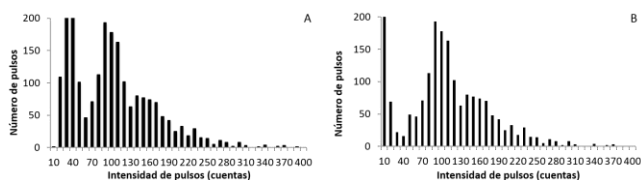
### Análisis del extracto CPE por TXRF y SP-ICPMS

Previamente al análisis por TXRF, se realizó el tratamiento del extracto obtenido en la CPE descrito anteriormente (apartado 3). A continuación, 5  $\mu\text{L}$  de la muestra resultante fueron depositados en el reflector de cuarzo y se secaron mediante una lámpara de IR. Seguidamente se realizó el análisis por TXRF con un tiempo de medida de 2000 s. En la Figura 2 se pueden apreciar los picos correspondientes a la plata después de la CPE indicando la presencia de AgNPs en los extractos acuosos del suelo, donde la concentración determinada fue de 220  $\mu\text{g L}^{-1}$  (sd=10, n=3).



**Figura 2.** Espectro obtenido del análisis mediante TXRF del extracto CPE de un lixiviado acuoso de suelo.

Adicionalmente, la presencia de AgNPs en los lixiviados acuosos del suelo fue también confirmada mediante el análisis por SP-ICPMS. En la Figura 3A, se puede observar que las distribuciones correspondientes a la Ag(I) y a las AgNPs se encuentran juntas dificultando la correcta determinación del tamaño y la concentración en número de partículas de Ag (ver Figura 3).



**Figura 3.** Representación del histograma obtenido mediante el análisis por SP-ICPMS de los lixiviados del suelo antes de la CPE (A) y después de la CPE (B) (concentración de Ag en la muestra  $\approx 1 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

Por este motivo, se aplicó la CPE en el lixiviado acuoso y el extracto resultante se sometió al tratamiento descrito en el apartado 4, para posteriormente ser analizado por SP-ICPMS. El análisis por SP-ICPMS, una vez realizada la CPE, permitió la correcta discriminación de la Ag(I) de las AgNPs, lo que nos va a permitir una mejor determinación del tamaño y la concentración de las nanopartículas. Además, podemos concluir que la mayor parte de Ag presente en los extractos acuosos del suelo se encuentra en forma de nanopartícula (97%). Esto indica que mantienen su forma durante los 21 días que están en contacto con el suelo. A pesar que es necesario la realización de experimentos adicionales para confirmar los resultados presentados, la combinación de CPE con TXRF y SP-ICPMS puede ser una metodología adecuada para obtener información de las AgNPs en muestras acuosas.

## Conclusiones

Estos resultados preliminares nos indican que la CPE es un buen método para aislar y preconcentrar las AgNPs de la matriz en muestras acuosas que también contienen Ag(I). La combinación CPE-TXRF nos permite obtener información de la cantidad total de Ag en el extracto CPE sin necesidad de grandes cantidades de muestra ni reactivos, mediante una técnica relativamente económica. En cambio, mediante la combinación de la CPE-(SP-ICPMS) se puede obtener información cualitativa y cuantitativa de las AgNPs presentes en la muestra a niveles de concentración más bajos ( $\text{ng L}^{-1}$ ) y con tiempo de análisis más cortos (60 s). A pesar de las ventajas e inconvenientes de la combinación de ambas técnicas con la CPE, el uso de las dos puede ser beneficiosa para obtener información cualitativa y cuantitativa de las AgNPs en muestras acuosas.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad Español a través de los proyectos CGL2013-48802-C3-2-R (Programa 2014) y CTQ2015-68094-C2-1-R (Programa 2015). L. Torrent disfruta de una beca FPI del Ministerio de Ciencia e Innovación Español (Ref. BES-2014-070625) y la beca de movilidad asociada a las becas FPI (Ref. EEBB-I-17-12391) para realizar la estancia en la Universidad de Zaragoza.

## Referencias

- [1] Tan, Z.-Q., Liu, J.-F., Guo, X.-R., Yin, Y.-G., Byeon, S.K., Moon, M.H., Jiang, G.-B., *Anal. Chem.*, 87(2015)8441-8447.
- [2] Mudalige, T.K., Qu, H., Linder, S.W., *Anal. Chem.*, 87(2015)7395-7401.
- [3] Qu, H., Mudalige, T.K., Linder, S.W., *J. Chromatogr. A*, 1429(2016)348-353.
- [4] Liu, J.-F., Chao, J.-B., Liu, R., Tan, Z.-Q., Yin, Y.-G., Wu, Y., Jiang, G.-B., *Anal. Chem.*, 81(2009)6496-6502.
- [5] Hartmann, G., Hutterer, C., Schuster, M., *J. Anal. At. Spectrom.*, 28(2013)567-572.
- [6] Torrent, L., Iglesias, M., Hidalgo, M., Marguí, E., *J. Anal. At. Spectrom.*, 2018, doi: 10.1039/C7JA00335H.
- [7] Klockenkämper, R., *Total-reflection X-ray fluorescence analysis*, Wiley, New York, 1<sup>st</sup> edn, 1997.
- [8] Gallardo, H., Queralt, I., Tapias, J., Candela, L., Marguí, E., *Chemosphere*, 156(2016)294-301.
- [9] Marguí, E., Zawisza, B., Sitko, R., *Trends Anal. Chem.*, 53(2014)73-83.
- [10] Laborda, F., Jiménez-Lamana, J., Bolea, E., Castillo, J.R., *J. Anal. At. Spectrom.*, 28(2013)1220-1232.
- [11] Pace, H.E., Rogers, N.J., Jarolimek, C., Coleman, V.A., Higgins, C.P., Ranville, J.F., *Anal. Chem.*, 83(2011)9361-9369.

## Agradecimientos