

## CONTRIBUCIÓN A LA NANOMETROLOGÍA ANALÍTICA

Ángel Ríos, Rosa M. Rodríguez, Ana Contento y Mohammed Zougagh

Instituto de Investigación Científica Aplicada (IRICA). Ciudad Real – UCLM. Instituto de Ciencias Ambientales (ICAM). Toledo – UCLM.

La Nanociencia y la Nanotecnología han emergido en los últimos años como una realidad y una tendencia en casi todos los campos de actividad. Su impacto también ha tenido lugar en la ciencia analítica. En primer lugar porque los nanomateriales son utilizados como herramientas analíticas cada vez más (tratamiento de muestra, detección y separaciones, etc.), pero además, como reto importante hoy en día porque es necesario el control analítico de nanomateriales en una gran variedad de muestras. Especialmente en este último caso, la nanometrología analítica está implicada como disciplina científica orientada para producir información fiable para los usuarios finales.

Nuestro grupo de investigación lleva años trabajando en la línea de la utilización de nanomateriales como herramientas analíticas, y más recientemente en el objetivo de determinar nanomateriales en diferentes tipos de muestras. Esta línea importante de trabajo, y también mayoritaria en estos momentos, la hemos organizado dentro del “Analytical-nano-Group”.



La nanometrología analítica (NMA) se refiere a las medidas que tienen por objeto el “nano-mundo” con fines analíticos. El nano-mundo se refiere a entidades en las que, al menos una de las dimensiones es inferior a 100 nm.



La aplicación de la nanometrología analítica implica disponer de las herramientas analíticas apropiadas para hacer medidas sobre los nanomateriales (NMs) a través de métodos analíticos que deben validarse para asegurar su fiabilidad. La gran justificación actual de la NMA es que los nanomateriales son utilizados cada vez más en los más

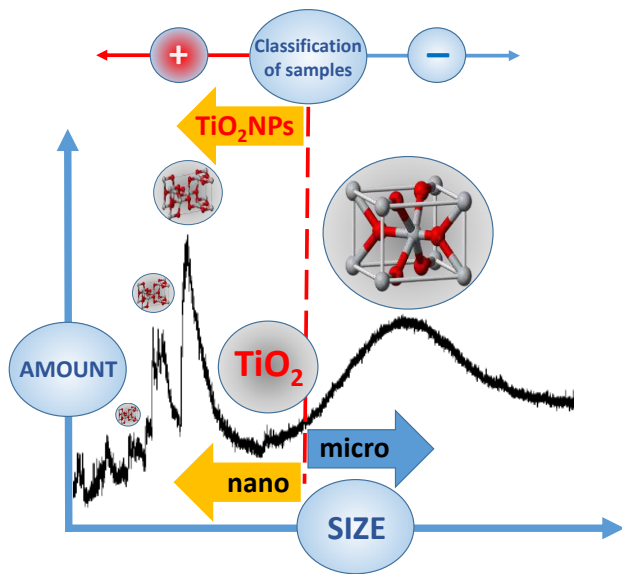
variados campos de la actividad profesional y productiva. Por otro lado, la síntesis y producción de NMs debe someterse a estrictos programas de control de calidad a fin de asegurar la reproducibilidad dentro y entre diferentes partidas. Para ello es necesario disponer de técnicas y métodos de caracterización y determinación seguros. En este sentido, existen numerosas técnicas para ofrecer información sobre tamaño, distribución de tamaños, nivel de aglomeración, forma, estructura composición, superficie y concentración, pero que hay que ordenar y seleccionar adecuadamente con el objetivo de ser utilizadas con los fines analíticos convencionales de esta disciplina.

En esta dirección, nuestro grupo ha realizado contribuciones, con diversos objetivos analíticos, que se resumen a continuación.

En primer lugar, la caracterización de NMs, considerándose en este caso como muestras, pero llevado a cabo en medio acuoso y no en estado sólido como hacen las técnicas microscópicas y algunas técnicas espectroscópicas. Por ejemplo, caracterización por tamaño empleando un acoplamiento entre electroforesis capilar (CE) y un detector de dispersión de luz estático (ELSD), a través de una interfase diseñada por nuestro grupo [1]. Se han separado nanopartículas de oro (AuNPs) de 3.5, 6.5 y 10.5 nm [2]. Así mismo, la separación de AuNPs de diferentes formas (prismas y octaedros) mediante CE-DAD utilizando micelas de dodecil sulfato que interaccionan de forma diferente con AuNPs-prismas y AuNPs-octaedros, que presentan diferente movilidad electroforética [3].

La detección/screening de nanomateriales en muestras específicas ha sido otro objetivo, habiendo obtenido resultados importantes. Estas aplicaciones se han llevado a cabo en el campo del control analítico de nanopartículas (NPs) en alimentos. En la actualidad es un problema desde el punto de vista de la seguridad alimentaria. Está reconocido que los ingredientes de los alimentos que generalmente se consideran como seguros a nivel micro y macro, pueden no serlo a nivel de la nanoescala. Esto es debido a que las NPs son capaces de penetrar la membrana celular e interferir con los mecanismos del metabolismo celular, e incluso pueden penetrar dentro del núcleo celular y afectar al ADN, con los correspondientes efectos indeseables. Por ejemplo, el TiO<sub>2</sub> es utilizado como aditivo en alimentos azucarados de repostería. En Europa es un aditivo autorizado (E171) hasta ciertos niveles, pero sin considerar su presencia en forma de nanopartículas. Sin

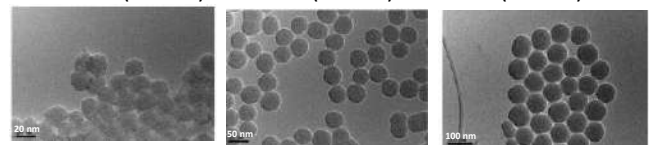
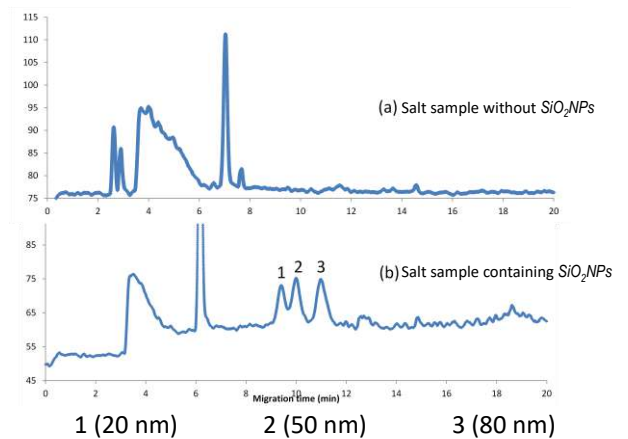
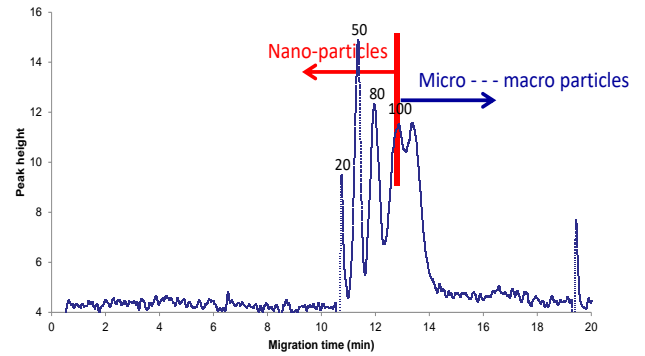
embargo, su capacidad como  $\text{TiO}_2$ -NPs de penetrar en las células y el núcleo ha llevado a considerarlo como un agente citotóxico, genotóxico y carcinogénico. La distinción entre  $\text{TiO}_2$ -micropartículas y  $\text{TiO}_2$ -nanopartículas es, por tanto, fundamental desde el punto de vista de la seguridad alimentaria. Para esta finalidad se ha desarrollado una metodología que combina el screening de  $\text{TiO}_2$  mediante espectroscopía Raman, y confirmación de  $\text{TiO}_2$ -NPs mediante CE [4].



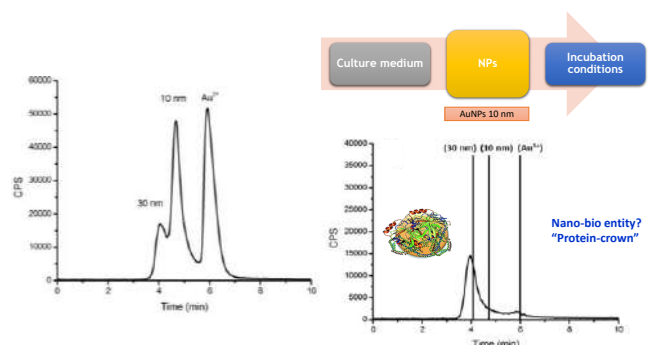
El screening de  $\text{TiO}_2$ -NPs en cosméticos es otra aplicación recientemente desarrollada mediante CE-DAD y confirmación mediante dispersión de luz dinámica (DLS) e plasma de acoplamiento inductivo – espectrometría de masas en la modalidad de partícula simple (sp-ICP-MS) [5].

La cuantificación de nanomateriales en muestras específicas es un verdadero reto analítico en la actualidad. La sílice es también un aditivo autorizado y legislado en Europa (aditivo E551), presente en diferentes alimentos. Algunos estudios demuestran que cuando se presenta en forma de nanopartículas ( $\text{SiO}_2$ -NPs), presenta riesgos potenciales (complicaciones durante el embarazo y problemas de coagulación de la sangre). Nuevamente, la distinción entre la fracción micro y nano es, por tanto, de gran interés desde el punto de vista de la seguridad alimentaria.

Se ha desarrollado un método electroforético, basado en el acoplamiento CE-ELSD, para la separación de nanopartículas de sílice, así como la diferenciación entre nano y micro/macro nanopartículas de sílice [6]. El método se ha aplicado a muestras de sal común presente en diferentes alimentos. Las características analíticas de este método son bastante ventajosas en términos de costes, tiempo de análisis, consumo de muestra y disolvente, así como simplicidad comparado con otras alternativas como el análisis mediante AF4-MS-MS (fraccionamiento de flujo asimétrico).

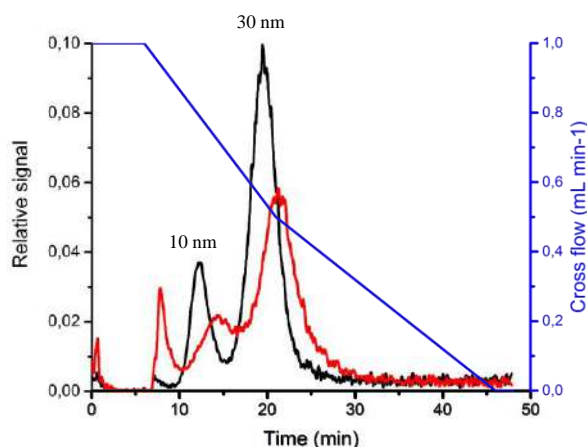


La monitorización de AuNPs en matrices biológicas ha sido otro objetivo en nuestro trabajo de investigación, distinguiendo entre las formas nanoparticuladas y disueltas en medios de cultivo, a fin de llevar a cabo estudios de toxicidad [7]. El control fue llevado a cabo mediante HPLC-ICP-MS.



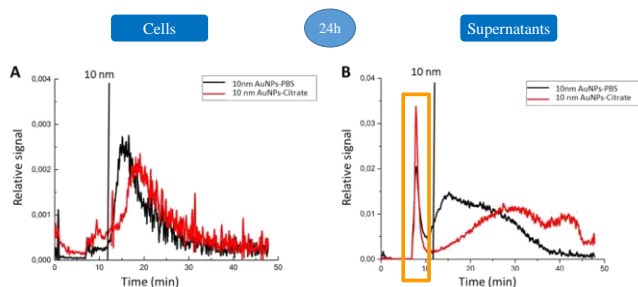
De forma más reciente la caracterización de las AuNPs y especies disueltas de oro, para llevar a cabo estudios toxicológicos *in vitro*, se ha llevado a cabo mediante AF4-ICP-MS [8]. Se consigue buena resolución en la separación

de AuNPs de diferente tamaño y muy buena sensibilidad aportada por el detector ICP-MS. En los estudios de toxicidad debe evaluarse también el efecto del medio de cultivo, a fin de interpretar correctamente los resultados.



10 nm ( $42 \text{ ng mL}^{-1}$ ) and 30 nm ( $108 \text{ ng mL}^{-1}$ ) AuNPs-PBS  
without cell culture medium  
with cell culture medium

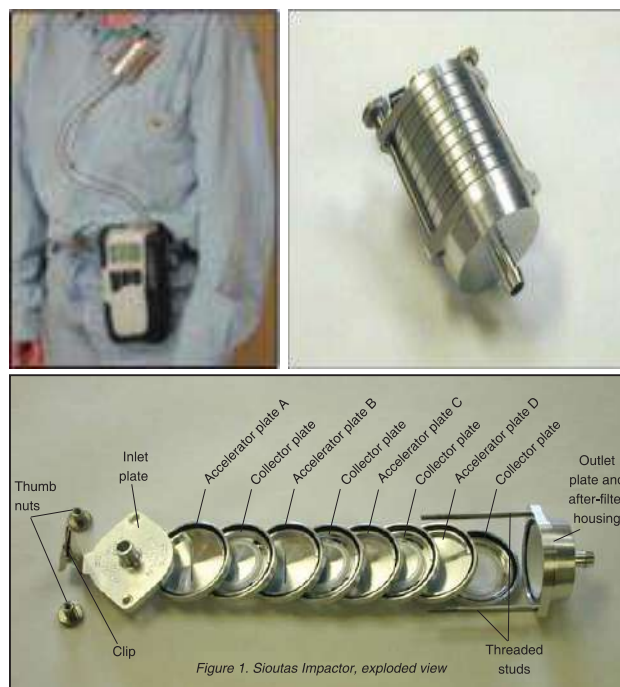
Se ha monitorizado la presencia de estas nanopartículas tanto en las células como en el sobrenadante empleado en su cultivo.



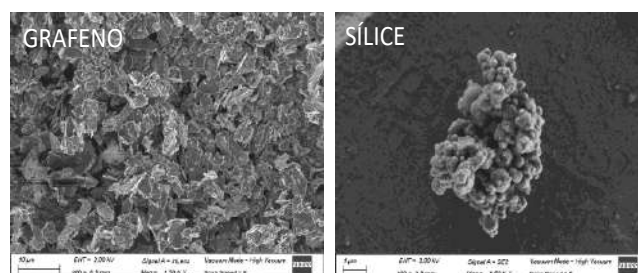
La actividad investigadora también se ha centrado en el desarrollo de técnicas híbridas basadas en el acoplamiento de técnicas de separación y detectores, tanto ópticos como de espectrometría de masas, para el estudio de especiación de metales y metaloides en muestras de interés biológico y medioambiental. Destacan las contribuciones en el uso de especies enriquecidas isotópicamente en isótopos estables como herramienta analítica (dilución isotópica) y como trazadores en el estudio de procesos medioambientales dinámicos. Gran parte de esta actividad se ha centrado en el estudio de la especiación de mercurio donde además los métodos y herramientas analíticas desarrolladas han sido utilizadas para obtener información relevante tanto en estudios medioambientales en diversos ambientes expuestos a contaminación como estudios epidemiológicos a nivel nacional e internacional. La actividad más reciente en este campo está relacionada con el estudio de biomoléculas asociadas a metales y metaloides (metalómica) para

obtener información sobre los posibles mecanismos de defensa y/o toxicidad en organismos vivos. En estas metodologías se han utilizado en ocasiones nanomateriales para extracción selectiva de especies de mercurio. Actualmente se han comenzado trabajos para detectar/determinar nanopartículas de mercurio en el medio ambiente.

Recientemente, se ha iniciado una línea de trabajo financiada por el Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo (Ministerio de Trabajo, Migraciones y Seguridad Social) para la evaluación de la exposición a nanomateriales en ambientes laborales. Se trata de un proyecto interdisciplinar para establecer procedimientos de muestreo de nanomateriales y su caracterización y determinación. Se ha trabajado en una planta piloto para simular la contaminación por nanomateriales y muestrear con filtros de diferente naturaleza (DiscMini, y Sioutas Personal Cascade Impactor Sampler, PCIS).



Los trabajos iniciales se han desarrollado con nanopartículas de carbono (grafeno) y de sílice. Los filtros se han analizado mediante microscopía de rayos X, SEM, TEM, DLS y ICP-MS.



A raíz de estos trabajos y el estado actual del tema de la NMA, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- Cada vez más son necesarios métodos analíticos para la caracterización/determinación de nanomateriales.
- El análisis de los nanomateriales debe llevarse a cabo en el mismo medio en el que existen de forma natural (no exclusivamente en estado sólido como imponen las técnicas microscópicas y algunas técnicas espectroscópicas).
- Las técnicas instrumentales de separación (cromatografía líquida, electroforesis capilar y técnicas de fraccionamiento de flujo) son candidatos muy válidos para desarrollar la NMA, especialmente acopladas a detectores como ICP-MS.
- Es urgentemente necesaria la preparación y disponibilidad de patrones (sobre todo materiales de referencia certificados) para la validación de estas metodologías.

Los retos son actualmente importantes. Realmente, el análisis de muestras que contienen nanomateriales está en un estadio inicial. La metrología clásica aplicada para la caracterización se debe extender a una concepción más amplia incluyendo la determinación de nanomateriales en tipos de muestras específicas. Indudablemente existen importantes “cuellos de botella” para la utilidad de estos métodos para usuarios finales (laboratorios analíticos de control o de rutina). Entre ellos:

- La identificación de problemas reales (nano-componentes en muestras específicas).
- El tratamiento de muestra debe asegurar la integridad de los nano-componentes.
- La hibridación instrumental es fundamental, por lo que el desarrollo de nuevas interfaces será un aspecto muy favorable.
- Se necesitan patrones de calidad para el calibrado y el control de calidad interno.
- Así mismo, y en la misma línea, se necesitan programas de aseguramiento de la calidad para la validación de las metodologías para la determinación de nanomateriales en muestras concretas.

### Agradecimientos

Queremos agradecer las contribuciones de los siguientes investigadores: Rachid Salghi, María Jesús Villaseñor, Francisco Javier Guzman, Nuria Rodríguez, María Jiménez,

Fernando de Andrés, Manuel Algarra, Virginia Moreno, Carlos Adelantado, Mohamed Bouri, Sara López-Sanz, Khaled A.Q. Mourtada, y Ana I. Corps.

### Referencias

- [1] M. Bouri, R. Salghi, M. Zougagh, A. Ríos. Anal. Chem., 85 (2013) 4858-4862.
- [2] M. Bouri, R. Salghi, M. Algarra, M. Zougagh, A. Ríos. RSC Advances, 5 (2015) 16672-16677.
- [3] C. Adelantado, M. Algarra, M. Zougagh, A. Ríos. Electrophoresis, 39 (2018) 1437-1442.
- [4] V. Moreno, M. Zougagh, A. Ríos. Anal. Chim. Acta, en prensa (2019).
- [5] C. Adelantado, M. Zougagh, A. Ríos. Enviado para publicación.
- [6] C. Adelantado, N. Rodríguez, R.C. Rodríguez, M. Zougagh, A. Ríos. Anal. Chim. Acta, 923 (2016) 82-88.
- [7] S. López-Sanz, N. Rodríguez Fariñas, R. Serrano, R.C. Rodríguez Martín-Doimeadios, A. Ríos. Talanta 164 (2017) 451-457.
- [8] S. López-Sanz, N. Rodríguez Fariñas, R. Serrano, R.C. Rodríguez Martín-Doimeadios, A. Ríos. Enviado para publicación.