

ESP-O07: ESTRATEGIA ANALÍTICA BASADA EN TÉCNICAS DE SEPARACIÓN ACOPLADAS A ICP-MS COMO UNA CONTRIBUCIÓN VALIOSA PARA EL ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO EN ENSAYOS TOXICOLÓGICOS *IN VITRO*

S. López-Sanz¹, N. Rodríguez Fariñas¹, R. Serrano Vargas², R. Calero Oliver², A. Ríos Castro³, R.C. Rodríguez Martín-Doimeadios¹

¹Departamento de Química Analítica y Tecnología de los Alimentos, Instituto de Ciencias Ambientales (ICAM). Universidad de Castilla-La Mancha, Avda. Carlos III s/n, 45071 Toledo, España.

²Departamento de Química Inorgánica, Orgánica y Bioquímica. Facultad de Ciencias Ambientales y Bioquímica. Universidad de Castilla-La Mancha, Avda. Carlos III s/n, 45071 Toledo, España.

³Departamento Química Analítica y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias y Tecnologías Químicas, Universidad de Castilla-La Mancha, Avda. Camilo José Cela s/n, 13071 Ciudad Real, España.

Premio Royal Society of Chemistry (RSC), a la mejor comunicación en el ámbito de especiación química presentada en la JORNADA DE ESPECIACIÓN, Retos de la especiación química en el siglo XXI: "Especiación química y ómicas". XXII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica. Valladolid 2019.

1. Introducción

En los últimos años, la nanotecnología ha experimentado un rápido crecimiento desarrollando una gran diversidad de nanomateriales con aplicaciones en diversos campos, tales como medicina, agricultura, alimentación, medio ambiente e industria, entre otros [1,2]. Entre estos nanomateriales, las nanopartículas metálicas (NPs) exhiben excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas que las hacen particularmente interesantes [3] destacando las nanopartículas de oro (AuNPs) por presentar una gran superficie reactiva y propiedades ópticas únicas [4]. Las AuNPs tienen un alto potencial en diversas aplicaciones relacionadas con la biología y medicina, que incluye la administración de fármacos, el diagnóstico por técnicas de imagen, la terapia génica y fototérmica o terapias de tratamiento oncológico [5,6]. Debido a estas numerosas aplicaciones, la exposición a AuNPs probablemente aumentará de manera sustancial en los próximos años. Sin embargo, existe una creciente preocupación tanto por los efectos que puedan producir como por la necesidad de realizar controles reglamentarios.

Diferentes estudios han abordado la toxicidad de AuNPs en ensayos *in vivo* e *in vitro*, siendo este último el más utilizado [8,9]. En estos estudios, las NPs no se comportan como objetos inertes, sino que pueden experimentar diferentes transformaciones físicas y químicas e interactuar con macromoléculas biológicas [7]. Entre las transformaciones de las NPs metálicas se encuentra la posibilidad de sufrir procesos de disolución que generen la liberación de la forma iónica. Para obtener una interpretación correcta de los resultados de los ensayos de toxicidad, es importante tener información sobre estos cambios, con particular interés en diferenciar la forma particulada de la disuelta en lo que podríamos considerar un nuevo reto para el análisis de especiación [10,11].

Sin embargo, el estudio de las NPs tradicionalmente se ha centrado en una caracterización relacionada con parámetros físicos como son tamaño, forma y estructura [12,13]. Entre las técnicas más comunes se encuentran las de microscopía electrónica, tales como microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía

de sonda donde destaca la de fuerza atómica (AFM). Con estas técnicas no solo somos capaces de visualizar las NPs, sino que, además, podemos observar otras propiedades como son su estado de agregación, dispersión, adsorción, tamaño, estructura y forma [14]. También se emplean técnicas basadas en la dispersión y difracción de la luz, siendo las más comunes las de dispersión de luz dinámica (DLS), dispersión multiángulo de luz (MALS), Raman o difracción de Rayos X [15,16]. Estas técnicas proporcionan la medida de parámetros de especial relevancia como son potencial zeta, diámetro hidrodinámico o la identificación de la fase cristalina, entre otros. Sin embargo, el análisis de NPs en muestras complejas tiene un sentido más amplio en términos de composición química y cuantificación. Además, estas técnicas no permiten realizar estudios de especiación donde se puede llevar a cabo la determinación simultánea de las NPs y sus iones correspondientes en muestras complejas.

La alternativa más prometedora para realizar este tipo de análisis es el acoplamiento *on-line* de técnicas de separación hidrodinámicas con detectores suficientemente sensibles y selectivos [12,13]. Las técnicas de separación, como la cromatografía exclusión por tamaño (SEC), cromatografía líquida de fase inversa (RP-LC) o fraccionamiento en campo de flujo (FFF), son cada vez más utilizadas, especialmente para amplios rangos de tamaño (polidispersión) y para la medición del tamaño hidrodinámico [11,17,18]. En cuanto a los sistemas de detección pueden emplearse DLS, MALS, UV-vis o espectroscopía atómica. Pero en el caso concreto de las NPs metálicas el uso de un detector de espectrometría de masas de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) es una de las alternativas más ventajosas debido a que ofrece alta sensibilidad y la posibilidad de una detección multielemental y multisotópica [19]. Estas técnicas híbridas están empezando a jugar un papel decisivo, pero se encuentran en un estado incipiente de desarrollo.

Por tanto, el objetivo de este estudio ha sido la optimización de sistemas híbridos basados en técnicas de separación (RP-LC y FFF con flujo asimétrico, AF4) acoplados a ICP-MS para el análisis de especiación de AuNPs y especies de oro disueltas

(Au³⁺) y su aplicación en células y medio de cultivo celular utilizados en ensayos toxicológicos *in vitro*.

2. Resultados y discusión

Optimización de las condiciones de separación

En primer lugar, se optimizaron los métodos analíticos utilizando para ello disoluciones comerciales de Au³⁺ y AuNPs (10 y 30 nm) (Sigma-Aldrich) estabilizadas en tampón fosfato (PBS). En el caso de la cromatografía líquida RP-LC se seleccionó una columna de fase inversa (columna C18 con un tamaño de poro de 1.000 Å). Las AuNPs se separan de acuerdo con su volumen hidrodinámico siguiendo un mecanismo de separación similar al de exclusión por tamaños y, por lo tanto, cuanto mayor es el tamaño de la NP, menor es el tiempo de retención. Fue necesario optimizar las condiciones de separación, tales como la composición y pH de la fase móvil, el volumen de inyección y caudal. Las condiciones finales de separación para RP-LC fueron: tampón fosfato (1 mM, pH 7,3) con la adición de SDS (10 mM) como fase móvil y 0,5 mL min⁻¹ de caudal (Tabla 1). En la Figura 1A se muestra el cromatograma correspondiente a la separación de AuNPs de 10 y 30 nm (51,9 ng mL⁻¹ y 5,2 ng mL⁻¹, respectivamente) y el ion Au³⁺ (49 ng mL⁻¹). Los tiempos de elución correspondientes fueron 4,1; 4,7 y 6,0 min para AuNP de 30 nm, 10 nm y Au³⁺, respectivamente [11].

Por otro lado, también se llevó a cabo la separación de las AuNPs mediante AF4. En este caso la separación tiene lugar en un canal abierto por la acción de un campo externo aplicado, que consiste en un flujo hidrodinámico perpendicular al canal de fraccionamiento. Debido al equilibrio entre los coeficientes de difusión de las NPs y el flujo perpendicular aplicado, las de menor tamaño eluirán primero. Los principales parámetros que hay que optimizar para lograr una adecuada separación por tamaños son el tipo de la membrana, composición de la fase móvil y programa de fraccionamiento (flujo focalización, flujo inyección y flujo cruzado). Las condiciones óptimas de separación se muestran en la Tabla 1. En la Figura 1B se muestra el fractograma correspondiente a la separación de 10 nm (42 ng mL⁻¹) y 30 nm (108 ng mL⁻¹) de AuNPs donde los tiempos de fraccionamiento fueron 12 y 18 minutos, respectivamente, pero en este caso no se puede observar la presencia del ion Au³⁺ [20].

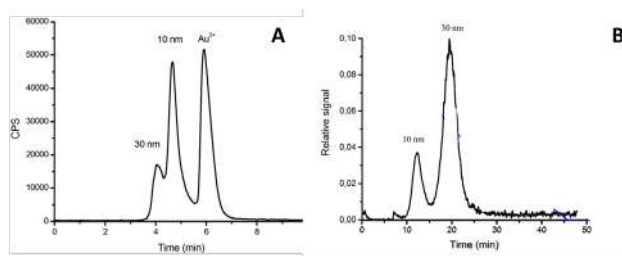


Figura 1. A) Cromatograma de una mezcla de 10 nm (51,9 ng mL⁻¹), 30 nm (5,2 ng mL⁻¹) AuNPs-PBS y Au³⁺ (49 ng mL⁻¹) en fase móvil (10 mM SDS, 1 mM tampón fosfato pH 7,3). B) Fractograma de una mezcla de 10 nm (42 ng mL⁻¹) y 30 nm (108 ng mL⁻¹) de AuNPs-PBS en fase móvil (0,01% SDS, pH 6).

Estudio de las transformaciones de AuNPs en presencia de medio de cultivo celular

Una vez que se habían optimizado las condiciones de separación y detección de los sistemas híbridos, el objetivo es su aplicación en estudios toxicológicos *in vitro*. En este tipo de estudios, las células crecen en un medio de cultivo celular. El propio medio de cultivo es un medio biológico de gran complejidad que puede provocar cambios por sí mismo. Por tanto, en primer lugar, se evaluó cuál es su efecto.

En este trabajo, el medio utilizado ha sido DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). Este medio está compuesto por una gran variedad de sales inorgánicas, aminoácidos, vitaminas, etc. Además, para que las condiciones del crecimiento celular fueran adecuadas, se suplementa con suero fetal bovino (FBS) y antibióticos (penicilina y estreptomina). Para estudiar su efecto, las AuNPs fueron incubadas en DMEM (0 y 24 horas) y analizadas por los dos métodos optimizados previamente.

En la Figura 2A se representa la comparación de los fractogramas de las AuNPs de 10 y 30 nm, sin y en presencia de DMEM, donde se pueden observar importantes cambios. En primer lugar, aparece un pico adicional a 8 minutos que podría ser ion Au³⁺ pero era necesario conocer cuál es su tiempo de fraccionamiento en este medio. Para ello se registró el fractograma de una disolución de patrón de Au³⁺ en presencia de DMEM (Figura 2B). En él se observa que este ion aparece a un tiempo de fraccionamiento que coincide con el pico desconocido (8 min). De la misma manera las muestras fueron analizadas mediante RP-LC-ICP-MS donde se observó la aparición de un pico en los cromatogramas que coincidía con el tiempo de retención del Au³⁺ (cromatogramas no mostrados).

Tabla 1. Condiciones óptimas

RP-LC		AF4		ICP-MS	
Fase móvil	10 mM SDS, 1 mM NaH ₂ PO ₄ , 1 mM Na ₂ HPO ₄ , pH = 7,3	0,01% SDS, pH 6 en agua ultrapura		Potencia (kW)	1,4
Columna	Nucleosil 7 µm tamaño partícula, C18, 1000 Å tamaño de poro, 250x4,6 mm			Flujo de gas de plasma (L min ⁻¹)	15
Volumen de inyección (µL)	200			Flujo de gas auxiliar (L min ⁻¹)	1
Caudal (mL min ⁻¹)	0,5			Nebulizador (L min ⁻¹)	0,9
Membrana	Celulosa regenerada, tamaño de corte 10 kDa			Cámara de nebulización	Scott
Grosor del canal (µm)	350			Isótopos monitorizados	197Au, 133Ba
Volumen de inyección (µL)	50			Tiempo de adquisición (ms)	130
Programa flujo cruzado					
Inyección/focalización	5	Flujo de inyección 0,2 mL min ⁻¹	1		
Separación	15	Decadencia lineal	1 a 0,5		
	25	Decadencia lineal	0,5 a 0		
	2	Constante			

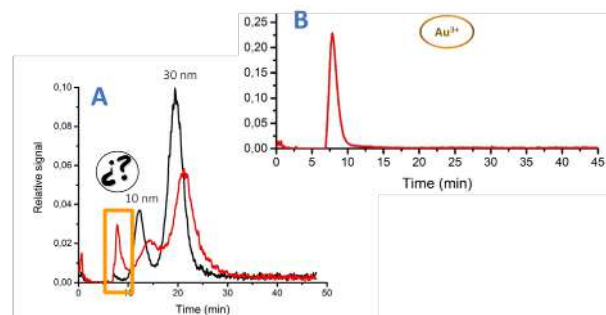


Figura 2. A) Fractogramas de 10 nm (42 ng mL⁻¹) y 30 nm (108 ng mL⁻¹) de AuNPs-PBS en fase móvil (línea negra) y en presencia de DMEM (línea roja). B) Fractograma de una disolución de Au³⁺ (50 ng mL⁻¹) en DMEM.

Sin embargo, la coincidencia del tiempo de retención no es evidencia suficiente para establecer su origen, es decir, si el ion se encontraba en la solución comercial de las NPs o si se

produce a partir de éstas en el medio. Mediante la técnica de ultrafiltración centrífuga se pudo confirmar que el ion Au^{3+} no estaba presente en las soluciones comerciales y, por lo tanto, debería estar produciéndose mediante un proceso de oxidación de AuNPs inducido por el medio de cultivo celular. Además, en presencia de DMEM se observó un desplazamiento a tiempos de fraccionamiento mayores (Figura 2A) que puede ser debido al aumento del tamaño hidrodinámico de las AuNPs. En cromatografía líquida también se observó un desplazamiento en los tiempos de retención, pero en este caso a tiempos de retención menores (cromatogramas no mostrados). En esta técnica este desplazamiento también se relaciona con un aumento de tamaño. Las causas principales para este proceso pueden ser la formación de proteínas corona y/o aglomerados / agregados.

Estas transformaciones fueron estudiadas mediante espectrofotometría UV-vis y TEM como técnicas complementarias. Las AuNPs esféricas tienen una resonancia de plasmón superficial (SPR) única en el espectro UV-visible con un máximo de absorción entre 520 y 580 nm para diámetros de partículas comprendidas entre 2,5 y 100 nm [21]. Se registraron los espectros de absorción UV-vis de DMEM; 10 nm de AuNPs-citrato (solución comercial) y 10 nm AuNPs-citrato ($103,8 \text{ ng mL}^{-1}$) en presencia de DMEM (utilizando agua ultrapura como referencia) (Figura 3). La solución comercial mostró una banda con un máximo de absorción a 520 nm y para DMEM el máximo estaba a 560 nm. El espectro de AuNPs en presencia de DMEM fue similar al del medio de cultivo, pero con un valor de absorbancia mayor lo cual podría indicar la formación de corona proteica [22]. Por otro lado, el uso de la técnica de microscopía electrónica TEM es clave para estudiar el tamaño o la agregación/aglomeración. En la Figura 3 se presenta la comparación de las micrografías TEM típicas de AuNPs de 10 nm sin y con medio de cultivo celular (incubado 24 h a 37°C), donde se puede observar tanto un aumento de tamaño como una alta dispersión en el tamaño lo que podría confirmar la formación de agregados/aglomerados.

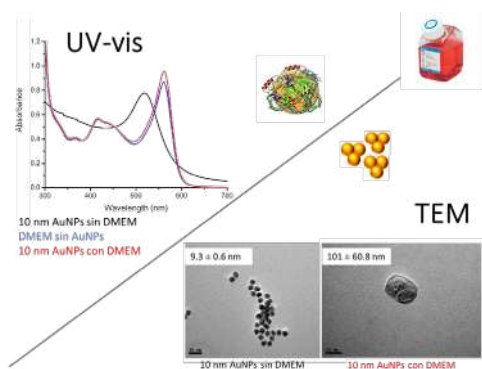


Figura 3. Análisis de muestras de AuNPs con y sin DMEM mediante espectrofotometría UV-vis y TEM.

Estudio de AuNPs en ensayos toxicológicos *in vitro*

Los métodos desarrollados se han aplicado en ensayos toxicológicos *in vitro* reales utilizando células HeLa (células de cáncer cérvico-uterino) incubadas en medio DMEM. Esos ensayos tienen un alto grado de complejidad puesto que deben tenerse en cuenta un gran número de variables diferentes relacionadas tanto con las condiciones experimentales como con el propio nanomaterial.

En este trabajo se ha diseñado un estudio toxicológico completo con diferentes AuNPs, en términos de tamaño (10, 30 y 40 nm), medio estabilizador (PBS y citrato) y concentración (250 y 500 ng mL^{-1}), y diferentes condiciones de cultivo celular (tiempo de incubación, 24 y 72 horas, y porcentaje de FBS, 10 % y 0,1 %). Se han estudiado los efectos toxicológicos, las transformaciones y la captación celular de las AuNPs mediante diferentes herramientas analíticas complementarias (ICP-MS, RP-LC-ICP-MS, AF4-ICP-MS, TEM, microscopía confocal).

La toxicidad fue evaluada mediante un ensayo de viabilidad celular (ensayo colorimétrico MTT), donde las AuNPs mostraron un ligero efecto toxicológico. Además, no se encontraron diferencias asociadas al tamaño o medio estabilizador de las AuNPs, o al porcentaje de FBS. También se pudo observar que las AuNPs no causaron estrés oxidativo en las células a los niveles de concentración estudiados. Sin embargo, sí mostraron estrés oxidativo cuando el medio DMEM presentaba un 0,1 % en lugar de 10 % de FBS.

Para llevar a cabo el estudio de captación celular y de las transformaciones de las NPs, las células fueron separadas del medio con el que habían estado en contacto (sobrenadante). Una vez separadas, las células se disolvieron en tampón fosfato, se rotaron y centrifugaron, mientras que los sobrenadantes no requerían ningún tratamiento adicional.

Los análisis de las muestras de las células y los sobrenadantes mediante RP-LC-ICP-MS y AF4-ICP-MS mostraron que las AuNPs sufren las mismas transformaciones que se habían observado en presencia del medio de cultivo DMEM, es decir, un proceso de oxidación y un aumento de tamaño. A modo de ejemplo, en la Figura 4 se muestran los fractogramas de los sobrenadantes de 10 y 30 nm AuNPs-PBS donde se puede observar que sus tiempos de fraccionamiento aumentaron con respecto a las NPs comerciales y que el proceso de oxidación fue mayor para la NP de menor tamaño. También se pudo comprobar mediante RP-LC-ICP-MS que el proceso de oxidación de las AuNPs incrementaba con el tiempo de incubación (72 horas) y, además, podría estar favorecido por la presencia de las células en el medio.

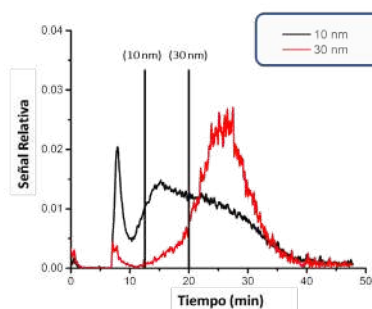


Figura 4. Fractogramas de sobrenadantes obtenidos del estudio toxicológico con AuNPs-PBS de 10 (250 ng mL^{-1}) y 30 nm (500 ng mL^{-1}), tiempo de incubación 24 horas y DMEM suplementado con 10% FBS. Las líneas verticales indican los tiempos de fraccionamiento de las AuNPs-PBS en fase móvil.

Además, se observó mediante RP-LC-ICP-MS y AF4-ICP-MS una baja captación celular de las AuNPs siendo mayor cuando aumenta el tiempo de incubación. Todo ello pudo ser confirmado por experimentos independientes mediante microscopía confocal y digestión por microondas y cuantificación total de oro por ICP-MS (Figura 5). La captación celular en todos los casos fue inferior al 15%.

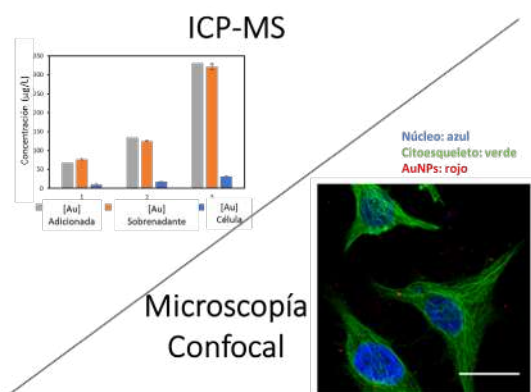


Figura 5. Análisis mediante ICP-MS y Microscopía Confocal de células y sobrenadantes obtenidos bajo diferentes condiciones experimentales en ensayo toxicológico *in vitro*.

3. Conclusiones

En este trabajo se han desarrollado métodos analíticos basados en técnicas acopladas (RP-LC-ICP-MS y AF4-ICP-MS) para llevar a cabo estudios de especiación de AuNPs y se ha demostrado su aplicabilidad en ensayos toxicológicos *in vitro*. Estas metodologías analíticas han permitido detectar transformaciones inducidas tanto por el medio de cultivo celular como por las células, tales como un aumento de tamaño en el volumen hidrodinámico y procesos de oxidación. Esta información es muy relevante y debe ser tenida en cuenta para realizar una correcta interpretación de los resultados toxicológicos obtenidos y de sus implicaciones para la salud humana.

Los estudios toxicológicos, tanto *in vitro* como *in vivo*, de NPs deben continuar y sería recomendable que incluyeran entre sus herramientas de seguimiento los nuevos desarrollos analíticos que se están produciendo en este ámbito donde, por otro lado, es necesario seguir investigando.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) de España por el apoyo financiero a través del proyecto CTQ2016-78793-P, así como a la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha a través de la Subvención SBPLY/17/180501/000262. Sara López-Sanz también agradece a MINECO por su contrato predoctoral BES-2014-069095.



<http://saman.uclm.es/>

4. Referencias

- [1] Dhar Dwivedi, A., Prabha Dubey, S., Sillanpää, M., Kwon, Y.N., Lee, C., Varma, R.S. (2015) *Coordination Chemistry Reviews*, 287, 15, 64-78.
- [2] Peralta-Video, J.R., Zhao, L., Lopez-Moreno, M.L.; de la Rosa, G., Hong, J., Gardea-Torresdey, J. L. (2011) *Journal of Hazardous Materials*, 186(1), 1-15.
- [3] Schrand, A.M., Rahman, M.F., Hussain, S.M., Schlager, J.J., Smith, D.A., Syed, A.F. (2010) *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology*, 2, 544-568.
- [4] Valcárcel, M., & López-Lorente, Á. I. (2014) *Gold nanoparticles in analytical chemistry* (Vol. 66). Elsevier.
- [5] Nazir, S., Hussain, T., Ayub, A., Rashid, U., MacRobert, A.J. (2014) *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 10, 19-34.
- [6] Her, S., Jaffray, D.A. (2017) *Advanced Drug Delivery*, 109, 84-101.
- [7] Lowry, G.V., Gregory, K.B., Apte S. C., Lead, J. R. (2012) *Environmental Science Technology*, 46, 6893-6899.
- [8] Jones, C.F., Grainger, D.w. (2009) *Advanced Drug Delivery*, 61, 438-456.
- [9] Love, S.A., Maurer-Jones, M.A., Thompson, J.W., Lin, Y.-S., Haynes, C.L. (2012) *Annual Review of Analytical Chemistry*, 5, 181-205.
- [10] Bolea, E., Jimenez-Lamana, J., Laborda, F., Abad-Alvaro, I., Blade, C., Arola, L., Castillo, J.R. (2014) *Analyst*, 139, 914-922.
- [11] Lopez-Sanz, S., Rodríguez Fariñas, N., Serrano Vargas, R., Rodríguez Martín-Doimeadios R.C, Ríos, A. (2017) *Talanta*, 164, 451-457.
- [12] Laborda, F., Bolea, E., Cepriá, G., Gómez, M.T., Jiménez, M.S., Pérez-Arantegui, J., Castillo J.R. (2016) *Analytica Chimica Acta*, 904, 10-32.
- [13] López-Sanz, S., Guzmán Bernardo, F.J., Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C., Ríos, A. (2019) *Analytica Chimica Acta*, 1059, 1-15.
- [14] Sadik, O.A., Du, N., Kariuki, V., Okello, V., Bushlyar, V. (2014) *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 2, 1707-1716.
- [15] Brar, S.K., Verma, M. (2011) *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 30, 4-17.
- [16] Polte, J., Erler, R., Thünemann, A.F., Sokolov, S., Ahner, T.T., Rademann, K., Emmerling, F., Kraehnert, R. (2010) *ACS Nano* 4, 1076-1082.
- [17] Zhou, X.-X., Liu, J.-F., Geng, F.-L. (2016) *Nano Impact*, 1, 13-20.
- [18] Contado, C. (2017) *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409, 2501-2518,
- [19] Schmidt, B., Loeschner, K., Hadrup, N., Mortensen, A., Sloth, J. J., Bender Koch, C., Larsen E. H. (2011) *Analytical Chemistry*, 83, 2461-2468.
- [20] Lopez-Sanz, S., Rodríguez Fariñas, N., R., Rodríguez Martín-Doimeadios R.C, Ríos, A. (2019) *Analytica Chimica Acta* 1053, 178-185.
- [21] Hais, W., Thanh, N.T.K., Aveyard, J., Fernig, D.G. (2007) *Analytical Chemistry*, 79, 4215-4221.
- [22] Huang, X., El-Sayed, M.A. (2010) *Journal of Advanced Research*, 1, 13-28.