

### FRACCIONAMIENTO EN FLUJO MEDIANTE CAMPO DE FLUJO ASIMÉTRICO (AF4): DESDE LAS MACROMOLÉCULAS A LAS NANO Y MICROPARTÍCULAS

Eduardo Bolea, Francisco Laborda

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

El creciente interés en el desarrollo de nanomateriales sintéticos y sus aplicaciones en múltiples sectores, ha llevado asociada la necesidad de establecer nuevos métodos y la aplicación de distintas técnicas en la caracterización, detección y cuantificación de estos nanomateriales derivados de su uso.

Una de las primeras técnicas que empezaron a utilizarse en este campo fue el fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico, o más conocida por sus siglas en inglés AF4 (Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation). Aunque sus fundamentos son conocidos, conviene recordar que esta técnica de separación se basa en la utilización de un canal por el que circula un portador y en el que se produce la separación de las especies en ausencia de fase estacionaria mediante la aplicación de un caudal perpendicular (flujo cruzado o crossflow). Precisamente la ausencia de fase estacionaria se ha presentado habitualmente como una de sus ventajas frente a las técnicas cromatográficas, al desaparecer las posibles interacciones no deseadas de las especies separadas con ésta. A esto se suma la gran versatilidad de la técnica, que permite la modificación del campo aplicado durante la separación, a través de programas donde se varía el caudal del flujo cruzado a lo largo del tiempo, lo que permite modificar los rangos de tamaños que se pueden separar (desde unos pocos nm a decenas de  $\mu\text{m}$ ). Por otro lado, esta técnica de separación se puede acoplar a los detectores utilizados habitualmente en cromatografía líquida (UV-visible, fluorescencia, dispersión de radiación, ICP-MS...) ya que tanto la composición del portador (habitualmente disoluciones acuosas a pH regulado y con una ligera fuerza iónica), como los caudales de separación, son compatibles con sus condiciones habituales de trabajo.

El grupo de investigación GEAS ha venido trabajando en el desarrollo y aplicación de métodos basados en el uso de AF4 desde el año 2006 [1], no solo en el ámbito de la caracterización de nanomateriales sintéticos [2], su detección y cuantificación en muestras medioambientales [3] [4], alimentos [5], ensayos de citotoxicidad [6] o digestibilidad [7], sino también en el estudio de interacciones de metales con macromoléculas, nano y micropartículas naturales en sistemas de interés medioambiental [1,8–12].

#### La versatilidad de AF4

Esta versatilidad se ha puesto de manifiesto en múltiples situaciones, tal y como refleja la bibliografía publicada sobre el tema. A continuación, se muestran algunos casos que tratan de ejemplificar esta capacidad.

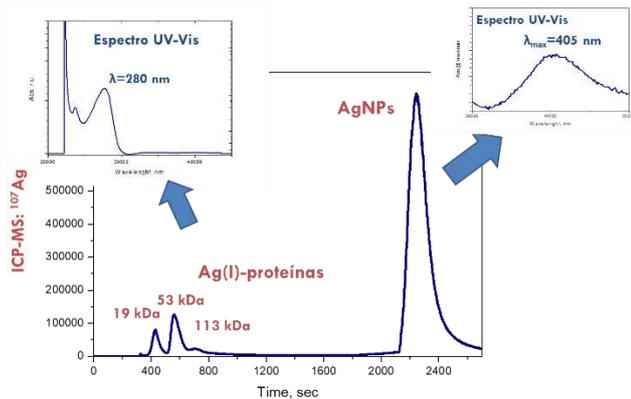
La caracterización de nanomateriales en ensayos toxicológicos *in vitro* es uno de los ámbitos en los que se

requiere información sobre las posibles transformaciones que puedan sufrir las nanopartículas en los medios de cultivo que se utilizan en estos ensayos, tanto con células como con microorganismos. En el caso de las nanopartículas de plata (AgNPs), además de procesos de agregación/aglomeración, pueden producirse procesos de disolución/oxidación, que pueden conducir a la formación de otras especies (por asociación con ligandos presentes en esos medios). Todas estas especies pueden caracterizarse mediante AF4 aplicando diferentes programas de elución, tal y como se describe en [6]. En este trabajo, donde se llevó a cabo la caracterización de AgNPs en ensayos de nanotoxicidad con células hepáticas HepG2, se detectó la formación de coronas proteicas alrededor de las AgNPs en las condiciones en las que se llevaban a cabo los ensayos de toxicidad, así como de la formación de complejos de plata con las proteínas presentes en el medio, tal y como se observa en la Figura 1. Así, aplicando un programa de flujos elevados (3 ml/min) es posible separar y caracterizar la plata asociada a diferentes proteínas de masa molecular entre 20 y 150 kDa de las AgNPs que se eluyen al final del fractograma (que presentan el espectro característico del plasmón superficial en torno a los 400 nm). La calibración del canal con proteínas o con NPs de tamaño conocido permite establecer unos rangos de tamaños en función del tiempo de elución. En este caso, cabe destacar que la información que es capaz de proporcionar AF4 en combinación con varios detectores como UV-vis e ICP-MS, permite obtener información relevante sobre los procesos que pueden sufrir las NPs en medios complejos. La versatilidad de AF4 también se ve reflejada en el amplio rango de tamaños con el que es posible trabajar, cubriendo desde las macromoléculas a las micropartículas. Así, se ha llegado a estudiar el papel fundamental que juegan los coloides naturales (partículas por debajo de 1  $\mu\text{m}$ ) en la movilización de sustancias tóxicas como el arsénico procedente de residuos de explotaciones mineras [12], estableciendo además su naturaleza con ayuda de técnicas complementarias, o en estudios de movilización de metales pesados en muestras de interés medioambiental [8].

#### Estrategias para la caracterización del tamaño

Otra de las facetas destacables de esta técnica es su capacidad para obtener información del tamaño de las especies separadas. En condiciones de separación controladas, es posible establecer una relación entre los tiempos de elución y el tamaño de las nanopartículas (expresado como diámetro hidrodinámico) a partir de

una serie de expresiones teóricas que pueden encontrarse en la bibliografía [13]. Estas expresiones exigen conocer algunos parámetros experimentales como la anchura del canal, la viscosidad o la densidad del medio a la temperatura de trabajo.



**Figura 1.** (a) Fractograma de  $^{107}\text{Ag}$  de AgNPs en un medio de cultivo (24 h). En la figura se recogen los espectros de absorción UV-vis a los máximos de los picos obtenidos. Rango de tamaños expresados en función de la calibración frente a proteínas.

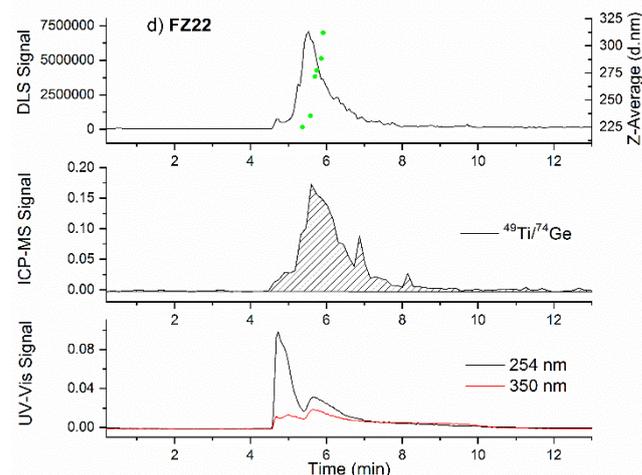
En general, en la caracterización de nanomateriales mediante AF4 se suele hacer uso de otras alternativas como la mencionada en el apartado anterior, que consiste en la calibración del canal con nanopartículas de tamaños conocidos (y trazables cuando sea posible). Estos estándares de tamaño se separan bajo las mismas condiciones que las nanopartículas objeto de estudio, de forma que se pueda establecer una relación lineal entre el tiempo de elución (corregido con el tiempo muerto) y el tamaño nominal del estándar. Habitualmente se utilizan nanopartículas estándares de la misma naturaleza, con el fin de minimizar las diferencias, o bien el uso de patrones de tamaño trazables, como los disponibles de poliestireno (PS). Esta estrategia ha sido utilizada en la estimación del tamaño de nanopartículas de plata [2], nanopartículas de óxido de cerio [3] y con nano y micropartículas de óxido de titanio presentes en productos fotocatalíticos [5]. En este último trabajo, ante la ausencia de nanopartículas de óxido de titanio disponibles comercialmente en el rango de trabajo esperado, se optó por utilizar nanopartículas de óxido de silicio como estándares, así como los patrones de PS. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 1.

En cambio, esta estrategia de calibración frente a estándares falló a la hora de predecir los tamaños de las micropartículas de  $\text{TiO}_2$  presentes como aditivo alimentario E-171 en surimis [5]. Su caracterización requirió de la extracción y posterior puesta en suspensión de las micropartículas presentes en el surimi mediante un tratamiento con hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) y ultrasonidos. Se comprobó que la presencia de la matriz modificaba los tiempos de elución de las micropartículas de  $\text{TiO}_2$  en los extractos, de forma que los tamaños predichos por las calibraciones conducían a tamaños mucho menores a los esperados. En este caso la única alternativa viable consistió en el uso de un detector de dispersión de radiación (DLS). En la figura

2 se muestran los fractogramas utilizando DLS, UV-vis e ICP-MS para uno de los productos analizados.

**Tabla 1.** Determinación del tamaño de tres productos fotocatalíticos que contienen nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ . Comparación entre diversas estrategias de calibración (entre paréntesis rango de tamaños a la anchura del pico a mitad de altura). Resultados expresados como media  $\pm s$  ( $n=3$ ).

Producto	AF4-DLS	AF4 vs. $\text{SiO}_2$	AF4 vs. PS
P25	$162 \pm 2$ (130 - 230)	$172 \pm 1$ (60 - 280)	$150 \pm 1$ (40 - 260)
FN2	$167 \pm 3$ (150 - 260)	$159 \pm 13$ (100 - 290)	$140 \pm 12$ (85 - 265)
Pintura	$64 \pm 1$ (50 - 90)	$56 \pm 4$ (<10 - 95)	$40 \pm 4$ *



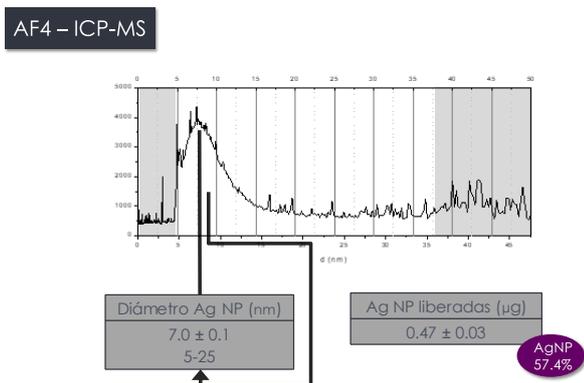
**Figura 2.** Fractogramas de surimi con distintos detectores. Los círculos corresponden a la Z-average (diámetro hidrodinámico) obtenido mediante DLS. (Ref. [5] con permiso de Elsevier)

### Cuantificación mediante AF4 acoplado a ICP-MS

Aunque es posible llevar a cabo determinaciones cuantitativas mediante otros detectores, en este apartado nos centraremos en la cuantificación de nanomateriales metálicos o de óxidos metálicos mediante acoplamiento con ICP-MS, debido a sus buenas prestaciones en cuanto a límites de detección, fundamentalmente. Uno de los principales hándicaps a la hora de llevar a cabo la cuantificación de cualquier sustancia mediante AF4 es que ésta no se eluya de manera completa, de forma que una fracción quede retenida de forma irreversible en el interior del canal, o bien que se pierda a través de la membrana de permeación en el caso de especies con tamaños próximos al corte de dicha membrana (habitualmente 10 kDa). Por ejemplo, en la caracterización y cuantificación de las especies de plata liberadas desde una superficie recubierta con AgNPs en un ensayo de lixiviación [4], se observó que tras realizar el análisis de los lixiviados mediante AF4-ICP-MS la recuperación de la señal era del 54%. Así, mientras que la cantidad de plata total en los lixiviados era de  $0,82 \pm 0,02 \mu\text{g}$ , la plata cuantificada mediante AF4-ICP-MS en forma de AgNPs era de  $0,47 \pm 0,03 \mu\text{g}$ , tal y como se recoge en la figura 3. Posteriormente, el análisis mediante ultrafiltración e ICP-MS permitió comprobar que el resto se encontraba en forma de plata iónica ( $0,35 \pm 0,01 \mu\text{g}$ ).

Otra de las dificultades a la hora de llevar a cabo la cuantificación de nanomateriales mediante AF4-ICP-MS, y en ICP-MS en general, es la diferencia de sensibilidad entre los estándares elementales y las nanopartículas objeto de estudio. Este efecto se ha observado en la

cuantificación de NPs de óxido de cerio presentes en productos de pulimento comerciales [3].



**Figura 3.** Caracterización y cuantificación de AgNPs liberadas desde una superficie recubierta con nanopartículas .

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en la cuantificación de este producto utilizando una calibración con estándares de cerio disuelto, comparado con una calibración con estándares a base de NPs de óxido de cerio. Tal y como se aprecia, la cuantificación utilizando la calibración con el cerio disuelto, dio una recuperación respecto a la concentración esperada de un  $73 \pm 7\%$ , mientras que en el caso de utilizar el estándar de NPs fue del  $97 \pm 7\%$ .

**Tabla 2.** Recuperaciones de cerio medida en dos suspensiones de NPs de 4 y 10 nm y de una suspensión comercial mediante ICPMS con nebulización directa utilizando Ce (IV) o CeO<sub>2</sub> NPs como estándares de concentración (media±s, n=5).

	Recuperación ICP-MS (%) <sup>a</sup>		Recuperación AF4-ICP-MS (%) vs CeO <sub>2</sub> -NPs std
	vs Ce(IV) std	vs CeO <sub>2</sub> NPs std	
STD 4	58±4	-	-
STD-10	62±6	-	-
Suspensión comercial	73±7	97±7	81±3 (recuperación de canal 82±9%)

<sup>a</sup> En relación a la concentración medida tras digestión ácida asistida por microondas.

Esta estrategia se siguió en la cuantificación de las micropartículas de TiO<sub>2</sub> en surimis [5]. En este caso, la calibración pudo hacerse utilizando un estándar de Ti disuelto, al no apreciarse diferencias significativas en la sensibilidad con las partículas de óxido de titanio, a pesar de que la puesta en disolución podría haber constituido un problema, ya que este tipo de tratamientos pueden llevar a la alteración en la composición, grado de asociación o tamaño de las especies. Aunque en el caso de las nanopartículas de óxido de titanio es posible realizar un ataque ácido de las muestras sin alterar su tamaño, se optó por una digestión alcalina con TMAH, capaz de eliminar la matriz orgánica y poner en suspensión las partículas de TiO<sub>2</sub>, mientras que el medio básico obtenido contribuye a hacer más negativo el potencial zeta de las partículas, lo que incrementa la repulsión con la membrana, consiguiendo unas recuperaciones mayores al 80%.

Mediante este procedimiento se consiguió cuantificar de forma exitosa las micropartículas presentes en surimis,

en un rango de concentraciones del orden de los µg Ti/g. Del estudio también se dedujo que todo el Ti presente se encontraba como micropartículas, en el rango de los 200 a 400 nm, similar al del aditivo alimentario original E-171.

**Mejoras en la eficiencia de la separación mediante modificaciones de los canales**

Otro de los aspectos que requieren atención es la escasa resolución que se obtiene mediante AF4. Aunque en términos generales esto no suele plantear excesivos problemas a la hora de caracterizar nanopartículas en muestras complejas, sí que limita en ocasiones la posibilidad de distinguir la presencia de varias poblaciones en una misma muestra, obteniéndose una única distribución de tamaños más o menos ancha.

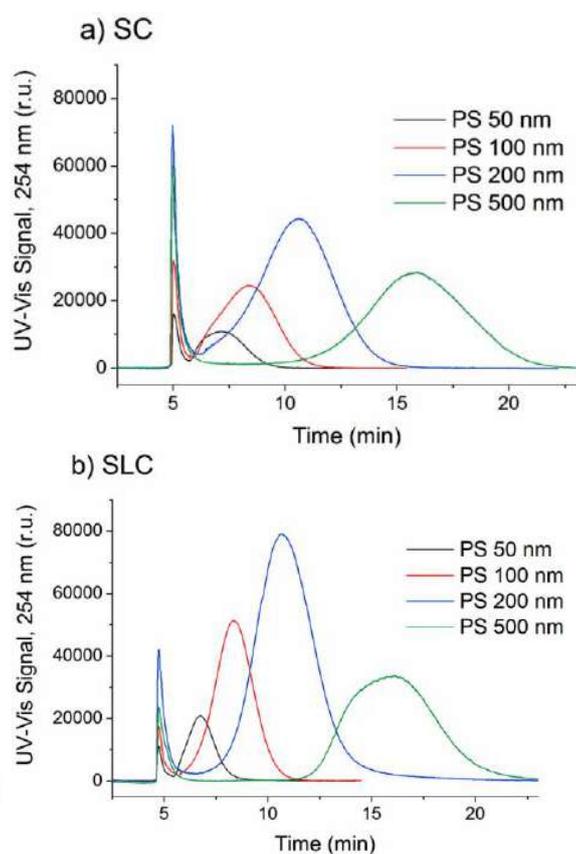
Las variables que influyen sobre la resolución en AF4 son fundamentalmente el caudal del portador y el flujo cruzado aplicado. Mientras que el primero tiene un efecto limitado, ya que provoca el aumento en la presión interior del canal, el segundo puede modificarse en un rango muy amplio, mejorando de forma sustancial la separación. Sin embargo, su aumento suele venir acompañado de una disminución de la recuperación de las especies inyectadas, lo que afecta a su cuantificación. Esto es especialmente importante en la caracterización de nanopartículas, donde los flujos cruzados aplicados son habitualmente bajos, precisamente para evitar interacciones indeseadas con la membrana, con la consiguiente falta de resolución. En un reciente trabajo [13] se ha propuesto el uso de canales comerciales de menor longitud, que permiten mejorar la resolución utilizando las mismas condiciones de separación que los canales convencionales. Aunque el fundamento teórico en el que se apoya este hecho escapa al objeto de esta publicación, se puede aclarar que el uso de un mismo flujo cruzado en un canal más corto implica un aumento en la fuerza ejercida sobre las especies en el interior del canal (mayor velocidad de flujo cruzado), disminuyendo una de las fuentes de dispersión (la denominada de no-equilibrio), por lo que se obtienen picos más estrechos sin alterar los tiempos de retención, mejorando así la resolución. En la figura 4 se muestra el aspecto de los picos obtenidos para distintos estándares de poliestireno de tamaños comprendidos entre 50 y 500 nm en los dos canales estudiados bajo las mismas condiciones de separación (mismo caudal de portador y mismo flujo cruzado).

Comparando los fractogramas obtenidos con ambos canales, se aprecia una menor anchura en los picos de todos los estándares, mientras que los tiempos de retención en el máximo se mantienen. Las mejoras en la resolución se aprecian por ejemplo al comparar la separación de las NPs de 100 y 200 nm, en el que la resolución pasa de 0,7 en el canal convencional (SC) a 1,2 en el caso del canal corto (SLC).

**Algunas conclusiones y consejos**

A lo largo de este artículo se han recogido múltiples ejemplos en los que AF4 ha permitido caracterizar desde macromoléculas como proteínas, hasta micropartículas,

pasando por coloides naturales o nanomateriales sintéticos, habiéndose aplicado en distintos escenarios (medioambiente, análisis de alimentos, ensayos de toxicidad...). Aunque en ocasiones se ha achacado a esta técnica de una cierta incapacidad a la hora de enfrentarse a matrices o entornos complejos, estas limitaciones suelen estar provocadas por la falta de estrategias válidas para obtener información fiable de tamaños, o para su cuantificación, debidas fundamentalmente a las bajas recuperaciones obtenidas. Como norma, el trabajo con AF4 requiere de un estudio pormenorizado de todas las variables que intervienen en la separación, tratando siempre de minimizar las interacciones de nuestras especies, bien sean macromoléculas, nano o micropartículas, con los elementos del canal, y tratando de sacar partido de la información que nos ofrecen todos los posibles detectores que podemos acoplar a esta técnica.



**Figura 4.** Efecto de la longitud del canal en la eficiencia de la separación de distintas NPs de poliestireno en el rango de 50 a 500 nm. a) Canal convencional. b) Canal corto.

A pesar de estos consejos, se ha de tener muy presente las dificultades impredecibles que pueden surgir, y que solo con experiencia y altas dosis de paciencia se pueden solventar.

**Agradecimientos**

Los autores agradecen la financiación por parte del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (Proyecto RTI2018-096111-B-100 (MICINN/FEDER) y al Gobierno de Aragón (E29\_17R).

**Bibliografía**

[1] E. Bolea, M.P. Gorris, M. Bouby, F. Laborda, J.R. Castillo, H. Geckeis, Multielement characterization of metal-humic substances complexation by size exclusion chromatography, asymmetrical flow field-flow fractionation, ultrafiltration and inductively coupled plasma-mass spectrometry detection: A comparative approach, *J. Chromatogr. A.* 1129 (2006) 236–246. doi:10.1016/j.chroma.2006.06.097.

[2] E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, F. Laborda, J.R. Castillo, Size characterization and quantification of silver nanoparticles by asymmetric flow field-flow fractionation coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry, in: *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011: pp. 2723–2732. doi:10.1007/s00216-011-5201-2.

[3] L. Sánchez-García, E. Bolea, F. Laborda, C. Cubel, P. Ferrer, D. Gianolio, I. da Silva, J.R. Castillo, Size determination and quantification of engineered cerium oxide nanoparticles by flow field-flow fractionation coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1438 (2016) 205–215. doi:10.1016/j.chroma.2016.02.036.

[4] I. Abad-Alvaro, E. Bolea, F. Laborda, J.R. Castillo, An ICP-MS-based platform for release studies on silver-based nanomaterials, *J. Anal. At. Spectrom.* 32 (2017). doi:10.1039/c7ja00059f.

[5] D. Ojeda, M.V. Taboada-López, E. Bolea, J. Pérez-Arategui, P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Piñeiro, F. Laborda, Size characterization and quantification of titanium dioxide nano- and microparticles-based products by Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation coupled to Dynamic Light Scattering and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 1122 (2020) 20–30. doi:10.1016/j.aca.2020.04.080.

[6] E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, F. Laborda, I. Abad-Álvaro, C. Bladé, L. Arola, J.R. Castillo, Detection and characterization of silver nanoparticles and dissolved species of silver in culture medium and cells by AsFFFF-UV-Vis-ICPMS: application to nanotoxicity tests, *Analyst.* 139 (2014) 914–22. doi:10.1039/c3an01443f.

[7] I. Abad-Álvaro, C. Trujillo, E. Bolea, F. Laborda, M. Fondevila, M.A. Latorre, J.R. Castillo, Silver nanoparticles-clays nanocomposites as feed additives: Characterization of silver species released during in vitro digestions. Effects on silver retention in pigs, *Microchem. J.* 149 (2019) 104040. doi:10.1016/j.microc.2019.104040.

[8] E. Bolea, F. Laborda, J.R. Castillo, Metal associations to microparticles, nanocolloids and macromolecules in compost leachates: Size characterization by asymmetrical flow field-flow fractionation coupled to ICP-MS, *Anal. Chim. Acta.* 661 (2010) 206–214. doi:10.1016/j.aca.2009.12.021.

[9] F. Laborda, S. Ruiz-Beguería, E. Bolea, J.R. Castillo, Study of the size-based environmental availability of metals associated to natural organic matter by stable isotope exchange and quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry coupled to asymmetrical flow field flow fractionation, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 4199–4205. doi:10.1016/j.chroma.2011.01.076.

[10] S. Serrano, M.A. Gomez-Gonzalez, P.A. O’Day, F. Laborda, E. Bolea, F. Garrido, Arsenic speciation in the dispersible colloidal fraction of soils from a mine-impacted creek, *J. Hazard. Mater.* 286 (2015) 30–40. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.12.025.

[11] M.A. Gomez-Gonzalez, A. Voegelin, J. Garcia-Guinea, E. Bolea, F. Laborda, F. Garrido, Colloidal mobilization of arsenic from mining-affected soils by surface runoff, *Chemosphere.* 144 (2016) 1123–1131. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.09.090.

[12] M.A. Gomez-Gonzalez, M. Villalobos, J.F. Marco, J. Garcia-Guinea, E. Bolea, F. Laborda, F. Garrido, Iron oxide - clay composite vectors on long-distance transport of arsenic and toxic metals in mining-affected areas, *Chemosphere.* 197 (2018) 759–767. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.01.100.

[13] D. Ojeda, P. Sánchez, E. Bolea, F. Laborda, J.R. Castillo, How the use of a short channel can improve the separation efficiency of nanoparticles in asymmetrical flow field-flow fractionation, *J. Chromatogr. A.* 1635 (2021) 461759. doi:10.1016/j.chroma.2020.461759.