



Interreg
España - Portugal



UNIÓN EUROPEA
UNIÃO EUROPEIA

Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional

**Conocimiento sobre las condiciones
de extracción de NPs de TiO₂ y Ag
que garanticen la cuantitatividad e
integridad de las mismas**



Introducción

El objetivo de este informe es recopilar toda la información obtenida en relación con las condiciones de extracción de nanopartículas (NPs) de TiO_2 y Ag en las especies de peces y moluscos seleccionadas, de gran interés en acuicultura, que garanticen la cuantitatividad e integridad de éstas.

El CETGA ha suministrado las especies objeto de este estudio [lubina (*Dicentrarchus labrax*), dorada (*Sparus aurata*)] y almeja japónica (*Ruditapes philippinarum*)] y la USC ha trabajado en el estudio y optimización de procedimientos de extracción de las NPs referidas.

Las NPs de TiO_2 y Ag presentan un comportamiento muy reactivo, de manera que para garantizar la distribución de tamaños (y su integridad), se ha seleccionado dos procedimientos asistidos con ultrasonidos: la hidrólisis enzimática y la digestión alcalina.

En cuanto al empleo de la sonda de ultrasonidos, los efectos de varios parámetros que afectan a la sonda como son la amplitud, el modo de sonicación y el tiempo de sonicación también han sido estudiados.

La experiencia previa en cuanto a la hidrólisis enzimática para moluscos bivalvos por parte de la USC se centra en las publicaciones científicas (i) M. V.Taboada-López, S. Iglesias-López, P. Herbello-Hermelo, P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Piñeiro, *Ultrasound assisted enzymatic hydrolysis for isolating titanium dioxide nanoparticles from bivalve mollusk before sp-ICP-MS*, Analytica Chimica Acta 1018 (2018) 16-25; y (ii) M. V.Taboada-López, N. Alonso-Seijo, P. Herbello-Hermelo, P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Piñeiro, *Determination and characterization of silver nanoparticles in bivalve molluscs by ultrasound assisted enzymatic hydrolysis and sp-ICP-MS*, Microchemical Journal 148 (2019) 652-600.

La integridad de las NPs de TiO_2 y Ag con los distintos procesos extractivos se evaluó empleando estándares de NPs de Ag y TiO_2 .

Hidrólisis enzimática asistida con ultrasonidos

Las variables relacionadas con la propia hidrólisis enzimática (concentración de cada enzima y el volumen de la solución), pH y fuerza iónica, fueron fijados según los valores recomendados por el fabricante para lograr la máxima eficiencia

Así, para las extracciones se ha utilizado una disolución de pancreatina y lipasa, ya que estas enzimas operan a un pH neutro (7.4) y a una temperatura moderada (37°C). La fuerza iónica de la solución, relacionada con la concentración de los reactivos utilizados para fijar el pH, se fijó en 0,2 M para NaH_2PO_4 y para NaOH.

En el caso de las NPs de TiO_2 , se encontró que las condiciones óptimas de extracción implican una sonicación con una amplitud del 60% durante 10 min y 7,5 ml de una solución de una solución que contenía 3,0 mg L^{-1} de pancreatina y 3,0 g L^{-1} lipasa (solución preparada en NaH_2PO_4 0,2 M / NaOH 0,2 M, pH ajustado a 7,4) para 1,0 g de muestra.

Para la extracción de NPs de Ag, las condiciones óptimas encontradas para 1,0 g de muestra fueron utilizando 10 ml de solución enzimática de 2,0 g L^{-1} de pancreatina y 2,0 g L^{-1} de solución

de lipasa (preparada en NaH_2PO_4 0,2 M / NaOH 0,2 M, pH ajustado a 7,4) a una amplitud del 80% durante 10 min.

Digestión alcalina asistida con ultrasonidos

Para aislar las NPs de los tejidos de las especies seleccionadas se empleó de una digestión alcalina con hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) al 25% (v/v), sonicando en baño de ultrasonidos. En el caso del TiO_2 , el procedimiento se realizó partiendo de 0.25 g de muestra con 2,0 mL de TMAH asistido por ultrasonidos durante 2h. A continuación, la mezcla se centrifugó a 3900 rpm y 8 °C durante 10 min.

Este pretratamiento resultó infructuoso para el aislamiento de NPs de Ag debido a la inestabilidad (ionización) de las NPs de Ag en el medio TMAH.



Interreg
España - Portugal



UNIÓN EUROPEA
UNIÃO EUROPEIA

Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



**Conocimiento sobre la
determinación y caracterización de
NPs de TiO₂ y Ag en peces y
moluscos de interés en acuicultura
Acción 2 – E2**

Contenido

Introducción.....	2
1. Estudios de determinación/caracterización de NPs de TiO ₂ y Ag en productos de acuicultura por sp-ICP-MS y sc-ICP-MS	2
a. Mediciones de NP de TiO ₂ por sp-ICP-MS	2
b. Mediciones de NP de TiO ₂ por sp-ICP-MS	3

Introducción

El objetivo de este informe es recopilar toda la información obtenida con relación a la determinación y caracterización de nanopartículas (NPs) de TiO₂ y Ag en tejidos y células de tejidos de las especies acuícolas seleccionadas (dorada, lubina y almeja japónica).

En esta acción han participado CETGA, que suministro de líneas celulares de las distintas especies acuícolas expuestas a NPs de TiO₂ y Ag, y USC, involucrada en la determinación y caracterización de las NPs por sp-ICP-MS y sc-ICP-MS.

1. Estudios de determinación/caracterización de NPs de TiO₂ y Ag en productos de acuicultura por sp-ICP-MS y sc-ICP-MS

Se optimizarán las condiciones de adquisición y tratamiento de las señales en la metodología analítica sp-ICP-MS para la determinación y caracterización (distribución de tamaños de nanopartículas) de NPs de TiO₂ y Ag. Igualmente, se llevarán a cabo los estudios de optimización para las determinaciones por sc-ICP-MS y la caracterización de células (estudios in vitro de la Actividad 1). En ambos casos, se validará la metodología nanométrológica con criterios analíticos contrastados.

a. Mediciones de NP de TiO₂ por sp-ICP-MS

Las digestiones enzimáticas se diluyeron 1: 125 con glicerol al 1% (v / v) y las soluciones se sometieron a ultrasonidos (baño de agua con ultrasonidos, 37 kHz) durante 5 min antes de las mediciones de sp-ICP-MS (condiciones de operación resumidas en la Tabla 1). Se midieron parámetros como el flujo de introducción de la muestra y la eficiencia del transporte antes de cada sección de mediciones. La eficiencia de transporte (TE%) se calculó analizando un material NIST (Au NP, 60 nm, 518 ng L⁻¹) en las mismas condiciones instrumentales que las muestras, pero controlando m / z 197 para el oro. Los valores válidos de TE% estaban dentro del rango de 1-5%. Se realizó una calibración acuosa de titanio disuelto (iónico) usando soluciones estándar de 0, 5, 10, 15 y 20 µg L⁻¹. El TE%, así como la calibración de Ti disuelto, la concentración y distribución de tamaño de NP de TiO₂, y la concentración de Ti disuelto, se obtuvieron directamente del software de aplicación SyngistixTM Nano. Las condiciones de sp-ICP-MS se enumeran en la siguiente tabla

Operating conditions for sp-ICP-MS

Operating parameters regarding single particle measurements	
Analyte	Ti
Mass	48.9479 uma
Density	4.23 g cm ⁻³
Mass fraction	59.9%
Ionization efficiency	100%
Sample flow rate	0.41 - 0.42 mL min ⁻¹
Dwell time	100 μs
Sampling time	100 s
Mode	Standard
Cell gas A	0
RPa	0
RPq	0.5
Number of scanning	1
Number of readings	25000
Replicates	3

b. Mediciones de NP de TiO₂ por sp-ICP-MS

Los extractos de TMAH que contenían NP de TiO₂ se diluyeron con Triton X-100 (ac) al 0,05% (v / v) (dilución de 1: 5 a 1:10) antes del análisis de sp-ICP-MS. Los extractos de NP de TiO₂ se sometieron a ultrasonidos durante 5 min a 35 kHz antes de la dilución y medición para evitar la aglomeración de nanopartículas. El ajuste de las condiciones operativas de ICP-MS también se realizó a diario, y la tasa de flujo de la muestra y la evaluación de la eficiencia de transporte (TE%) mediante el uso de una suspensión acuosa de AuNP (concentración de partículas de 518 ng L⁻¹ y 60 nm de diámetro nominal) también se realizó diariamente antes de la sp. ICP-MS (software de aplicación SyngistixTM Nano). Los valores de TE% obtenidos fueron cercanos al 5%. Se realizó una calibración igualada de titanio iónico (0-20 μg L⁻¹) para la evaluación de la

distribución del tamaño de partículas de las NP de TiO₂; mientras que, la concentración de masa de NP se calculó mediante la frecuencia de eventos de NP

Operating conditions for sp-ICP-MS

Operating parameters regarding single particle measurements	
Analyte	Ti
Mass	48.9479 uma
Density	4.23 g cm ⁻³
Mass fraction	59.9%
Ionization efficiency	100%
Sample flow rate	0.41 - 0.42 mL min ⁻¹
Dwell time	100 μ s
Sampling time	100 s
Mode	Standard
Cell gas A	0
RPa	0
RPq	0.5
Number of scanning	1
Number of readings	25000
Replicates	3
