



Interreg
España - Portugal



UNIÓN EUROPEA
UNIÃO EUROPEIA

Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



Manual de uso para la extracción de NPs metálicas en productos de la acuicultura

- Acción 6 – Entregable 2 -



Cluster de la Acuicultura
Centro Tecnológico del Cluster de la Acuicultura

ÍNDICE

ÍNDICE.....	2
1. Manual de uso para la extracción de células de productos de acuicultura de interés para el proyecto	2
a. Protocolo de extracción de células de branquias de moluscos	2
b. Protocolo de disgregación de tejidos y purificación celular.....	2
2. Manual de uso para la extracción de NPs metálicas en productos de la acuicultura	3
a. Hidrólisis enzimática asistida por ultrasonidos para la extracción de NPs de Ag	3
b. Hidrólisis enzimática asistida por ultrasonidos para la extracción de NPs de TiO ₂	4
c. Metodologías operativas para extraer el Ti y el Ag totales en peces y moluscos.....	4

1. Manual de uso para la extracción de células de productos de acuicultura de interés para el proyecto

a. Protocolo de extracción de células de branquias de moluscos

Para la extracción de branquias de almeja, las almejas se dejan durante 3 días en ayunas en un tanque con agua de mar a 15°C y a una concentración final de Penicilina y Streptomina de 100 U/L y 100 mg/L, respectivamente. A continuación 25 almejas de unos 4cm de largo se retiran del tanque y la concha se desinfecta con etanol al 70%. La apertura se realiza mediante el seccionado del ligamento y de los músculos abductores (anterior y posterior) con la ayuda de un bisturí. A continuación, se procede a la extracción de las branquias en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.

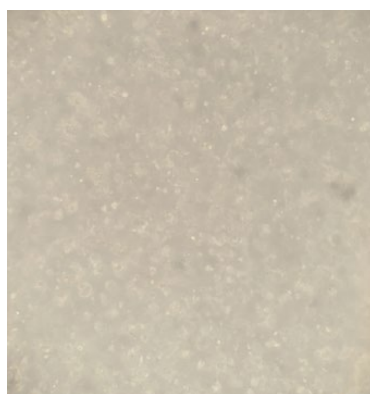


Figura 1. Fotografía de las células obtenidas de branquia de almeja, al microscopio óptico, tomada a 400X aumentos.

b. Protocolo de disgregación de tejidos y purificación celular

Para la disgregación de los tejidos, tanto de riñón como de branquia, cada órgano se corta en pequeños pedazos empleando unas tijeras y se introducen en un vaso de precipitados conteniendo un medio de Leibovitz-15 (L-15) con 10 unidades/mL de heparina y 2% de suero fetal bovino (FBS). En este medio se recogen todos los pedazos de riñón, que posteriormente se pasan por un disgregador celular (con una malla de 100 µm de diámetro de poro) empleando un pistilo. Las células sueltas son recogidas en otro recipiente, en hielo. Del mismo modo que el procedimiento anterior, todo este proceso se realiza en una campana de flujo laminar y empleando material estéril.

Finalmente, para la separación o purificación celular, se emplean tubos Falcon de 15mL conteniendo un gradiente de Percoll, en el que se añadieron las células cuidadosamente, gota a gota. Las células se separan por centrifugación (a 3000g durante 5 min) a 4°C, y se retira la banda conteniendo las células de interés en cada caso con la ayuda de una pipeta Pasteur. En el caso de riñón de los peces, células blancas, mayoritariamente leucocitos; y en el caso de almeja, células sanguíneas y mucosas. Las células recogidas se transfirieren a otro tubo y se lavan un par de veces más por centrifugación (a 1500g durante 5 min), añadiendo más medio L-15 conteniendo un 2% de FBS y en frío.

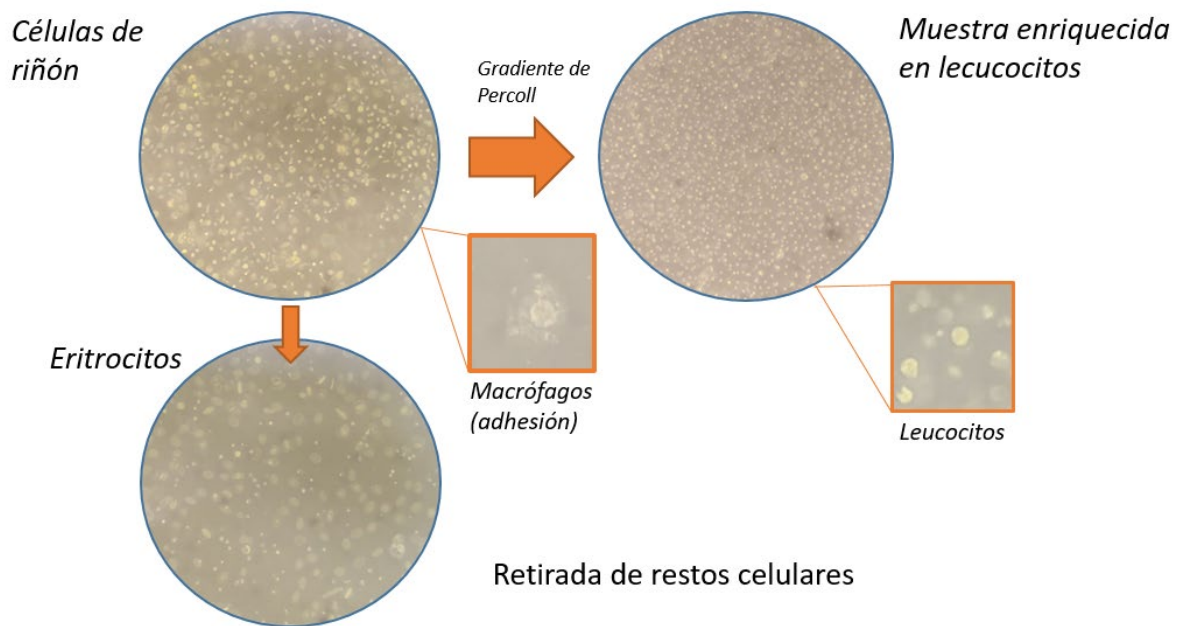


Figura 2. Esquema del proceso de purificación de las células de riñón e imágenes al microscopio óptico de los cultivos celulares obtenidos (Imágenes tomadas a 400X, zoom sobre la misma imagen, en las magnificaciones).

Para terminar, las células se resuspenden en L-15 con un 2% de FBS y 1% de Penicilina/Streptomycin (Thermofisher, 10.000UI/ml de penicilina, 10.000 µg/ml de Streptomycin) a la concentración celular deseada ($4-8 \cdot 10^6$ c/ml), empleando una cámara Neubauer para el recuento celular. Se depositan en placas multipocillo para realizar las diferentes exposiciones con los distintos tipos partículas y concentraciones de estas. Para el caso de las células de riñón, con la finalidad de eliminar posibles macrófagos en la muestra que puedan englobar de forma activa las nanopartículas afectando a los resultados finales de bioacumulación, se añade un paso extra: dejar las células durante un día para que se adhieran los macrófagos y así poder retirarlos del medio, las células no adheridas se transfirieren a otra placa para realizar los ensayos (1 ml de cultivo/pocillo) (Figura 3).

2. Manual de uso para la extracción de NPs metálicas en productos de la acuicultura

a. Hidrólisis enzimática asistida por ultrasonidos para la extracción de NPs de Ag

Se pesa aproximadamente 1,0 g de cada muestra en tubos de plástico de 10 mL y se añaden 10 mL de solución enzimática ($2,0 \text{ g L}^{-1}$ de pancreatina y $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de solución de lipasa preparada en $0,2 \text{ M NaH}_2\text{PO}_4/0,2 \text{ M NaOH}$, con un pH ajustado a 7,4). Se introduce la punta de la sonda de ultrasonidos en el tubo colocado en un baño de hielo y se inicia el tratamiento con ultrasonidos al 80% de amplitud durante 10 min (sonicación continua). Finalmente, el digerido enzimático se separa de los residuos sólidos por centrifugación (8°C , 3900 rpm o 2364 g, 25 min). Los extractos se conservan en tubos de

plástico a 8°C y se protegen de la luz con papel de aluminio antes del análisis. Se realizan dos blancos diferentes y tres réplicas de todas las muestras para cada condición de extracción.

b. Hidrólisis enzimática asistida por ultrasonidos para la extracción de NPs de TiO₂

Se pesa aproximadamente 1,0 g de muestra en tubos de plástico de 10 mL, y a continuación se añaden 7,5 mL de una solución que contenga 3,0 mg L⁻¹ de pancreatina y 3,0 g L⁻¹ de lipasa (solución preparada en NaH₂PO₄ 0,2 M/NaOH 0,2 M, pH ajustado a 7,4). El tubo que contiene la mezcla se coloca en un baño de hielo, y el tratamiento con ultrasonidos se realiza introduciendo la punta de la sonda en la mezcla y sonando (60% de amplitud) durante 10 minutos (sonicación continua). Tras la extracción, el extracto (digestión enzimática) se aísla por centrifugación (8°C, 3900 rpm, 25 min). Los extractos se conservan en frascos de vidrio ámbar a -20°C. Las muestras (o cada conjunto de experimentos) se realizan por triplicado, y se realizan dos blancos para cada conjunto de muestras y condiciones de extracción.

c. Metodologías operativas para extraer el Ti y el Ag totales en peces y moluscos

Digestión ácida asistida por microondas

Se realizan dos blancos diferentes y tres réplicas de cada muestra para todos los conjuntos de condiciones de microondas. Se pesó 1,0 g de muestra húmeda en reactores de teflón. A continuación, se añaden 4 mL de agua ultrapura, 3 mL de HNO₃ 69%(p/v) y 1 mL de H₂O₂ 33%(p/v). El programa de microondas consta de cuatro etapas; la primera de calentamiento en rampa desde la temperatura ambiente a 90°C en 2 minutos, otra de calentamiento en rampa de 90 a 140°C en 5 minutos; una tercera de calentamiento en rampa de 140 a 200°C durante 5 minutos, y una etapa final de calentamiento a 200°C durante 11 minutos. Todas las etapas se llevaron a cabo a 1000 W. La digestión ácida se completa cuando los reactores cerrados se enfrían a temperatura ambiente, aproximadamente 2 horas. Finalmente, los digestos ácidos se completan hasta 25 mL con agua ultrapura. Los digestos ácidos se mantienen en tubos de plástico limpios a temperatura ambiente y, antes de las mediciones de ICP-MS.



Interreg
España - Portugal



UNIÃO EUROPEIA
UNIÃO EUROPEIA

Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



**Manual de uso para la
determinación/caracterización de
NPs en productos piscícolas por sp-
ICP-MS**

- Acción 6 – Entregable 3 -



Cluster de la Acuicultura
Centro Tecnológico del Cluster de la Acuicultura

ÍNDICE

ÍNDICE.....	2
1. Manual de uso para la determinación/caracterización de NPs en productos piscícolas por sp-ICP-MS	2
a. Mediciones de NPs de Ag por sp-ICP-MS	2
b. Mediciones de NPs de TiO ₂ por sp-ICP-MS	3
c. Determinación de Ti y Ag totales por ICP-MS	4

1. Manual de uso para la determinación/caracterización de NPs en productos piscícolas por sp-ICP-MS

a. Mediciones de NPs de Ag por sp-ICP-MS

El recuento y la determinación del tamaño de las NPs requieren la medición de parámetros como el caudal de introducción de la muestra y la eficacia del transporte (TE%). El primer parámetro se evaluó aspirando agua ultrapura durante 1 minuto y calculando la cantidad (volumen) de agua aspirada mediante pesaje (diferencia de peso antes y después de la aspiración/introducción de ICP-MS). La eficiencia del transporte se evaluó analizando un material NIST (NPs de Au, 60 nm, 50 ng L⁻¹). El software de aplicación Syngistix™ Nano calcula la eficiencia de transporte, que varió del 3 al 5% (3,7±1,1%). Se utilizaron las mismas condiciones instrumentales que para las NPs de Ag pero controlando el m/z 197 para el Au.

La calibración acuosa se realizó utilizando 0, 5, 10, 15 y 20 µg L⁻¹ de soluciones estándar de plata iónica. El software de aplicación Syngistix™ Nano fue capaz de calcular directamente la concentración y la distribución de tamaño de las NPs de Ag, así como la concentración de Ag disuelta, basándose en los valores de TE(%) calculados previamente y utilizando las ecuaciones desarrolladas para el procesamiento de datos para el recuento y el dimensionamiento de las nanopartículas mediante sp-ICP-MS. Los digeridos enzimáticos se diluyeron 1:125 con glicerol al 1% (v/v) para recubrir y estabilizar las nanopartículas. Todas las diluciones fueron sonicadas en baño de agua con ultrasonidos (37 kHz) durante 5 minutos antes de su análisis por sp-ICP-MS (condiciones mostradas a continuación).

Parámetros de funcionamiento relativos a las mediciones de partículas individuales

Analyte	Ag
Mass	106.905 uma
Density	10.49 g cm ⁻³
Mass Fraction	100 %
Ionization efficiency	100 %
Sample Flow Rate	0.47 mL min ⁻¹

Dwell time	50 μ s
Sampling time	100 s
Mode	Standard
Number of scanning	1
Number of readings	100000

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

Los digeridos enzimáticos se diluyeron en una proporción de 1:125 con glicerol al 1% (v/v), y las soluciones se sometieron a ultrasonidos (baño de agua con ultrasonidos, 37 kHz) durante 5 minutos antes de las mediciones de sp-ICP-MS (las condiciones de funcionamiento se resumen en la Tabla 1). Se midieron parámetros como el flujo de introducción de la muestra y la eficiencia de transporte antes de cada sección de medición. La eficiencia de transporte (TE%) se calculó analizando un material del NIST (NPs de Au, 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) utilizando soluciones estándar de 0, 5, 10, 15 y 20 μ g L⁻¹. El TE%, así como la calibración de Ti disuelto, la concentración y distribución de tamaño de las NPs de TiO₂ y la concentración de Ti disuelto, se obtuvieron directamente del software de aplicación Syngstix™ Nano. Las condiciones de sp-ICP-MS se enumeran en la siguiente tabla

Parámetros de funcionamiento relativos a las mediciones de partículas individuales

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

c. Determinación de Ti y Ag totales por ICP-MS

El Ti y el Ag totales se determinan por ICP-MS en las condiciones de funcionamiento indicadas en la tabla 1 y tras una dilución 1:10 con agua ultrapura. El estándar interno seleccionado fue rodio (¹⁰³Rh) para la Ag, y germanio (⁷⁴Ge) para el Ti. La calibración por el método de adición de estándar se realiza a concentraciones de Ti y Ag de 0, 1, 5, 10, 50, 100 y 200 $\mu\text{g L}^{-1}$. La Ag se evalúa en condiciones estándar; mientras que el Ti se mide en modo KED (He 1,0 mL min^{-1} como gas de colisión). El límite de detección (LOD) y un límite de cuantificación (LOQ) se calcularon basándose en el criterio de 3 SD/m (10 SD/m) (S.D. desviación estándar de once mediciones de un blanco de reactivo, y m es la pendiente del gráfico de calibración), y fueron 31,7 (LOD) y 105,6 (LOQ) ng g^{-1} para Ti; y 25,0 (LOD) y 83,0 (LOQ) ng g^{-1} para Ag.

Tabla 1 Condiciones de Operación para el sp-ICP-MS

Condiciones de Operación SCP-MS Ti		
Radiofrequency power		1600 W
Gas flows	Nebulization	0.87 mL min^{-1}
	Auxiliary	1.2 mL min^{-1}
	Plasma	16 mL min^{-1}
KED	Entrance cell voltage	-5 V
	Exit cell voltage	-5 V
	Collision cell offset	-16
	Cell gas A (He)	1.00 mL min^{-1}
	Axial field voltage	475.00 V
Analyte / mass	Ti	48.94787 uma
	Ge (internal standard)	73.9212 uma
Condiciones de Operación SCP-MS Ag		
Radiofrequency power		1600 W
Gas flows	Nebulization	0.87 mL min^{-1}
	Auxiliary	1.2 mL min^{-1}
	Plasma	16 mL min^{-1}
Standard	Entrance cell voltage	-5 V
	Exit cell voltage	-5 V
Analyte / mass	Ag	106.905 uma
	Rh (internal standard)	102.905uma