

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Caracterización y transformación de nanopartículas
metálicas y de metaloides en muestras biológicas y
medioambientales**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Gustavo Moreno Martín

Directoras

Yolanda Madrid Albarrán
María Eugenia de León González

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

CARACTERIZACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS Y
DE METALOIDES EN MUESTRAS BIOLÓGICAS Y MEDIOAMBIENTALES

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Gustavo Moreno Martín

DIRECTORAS

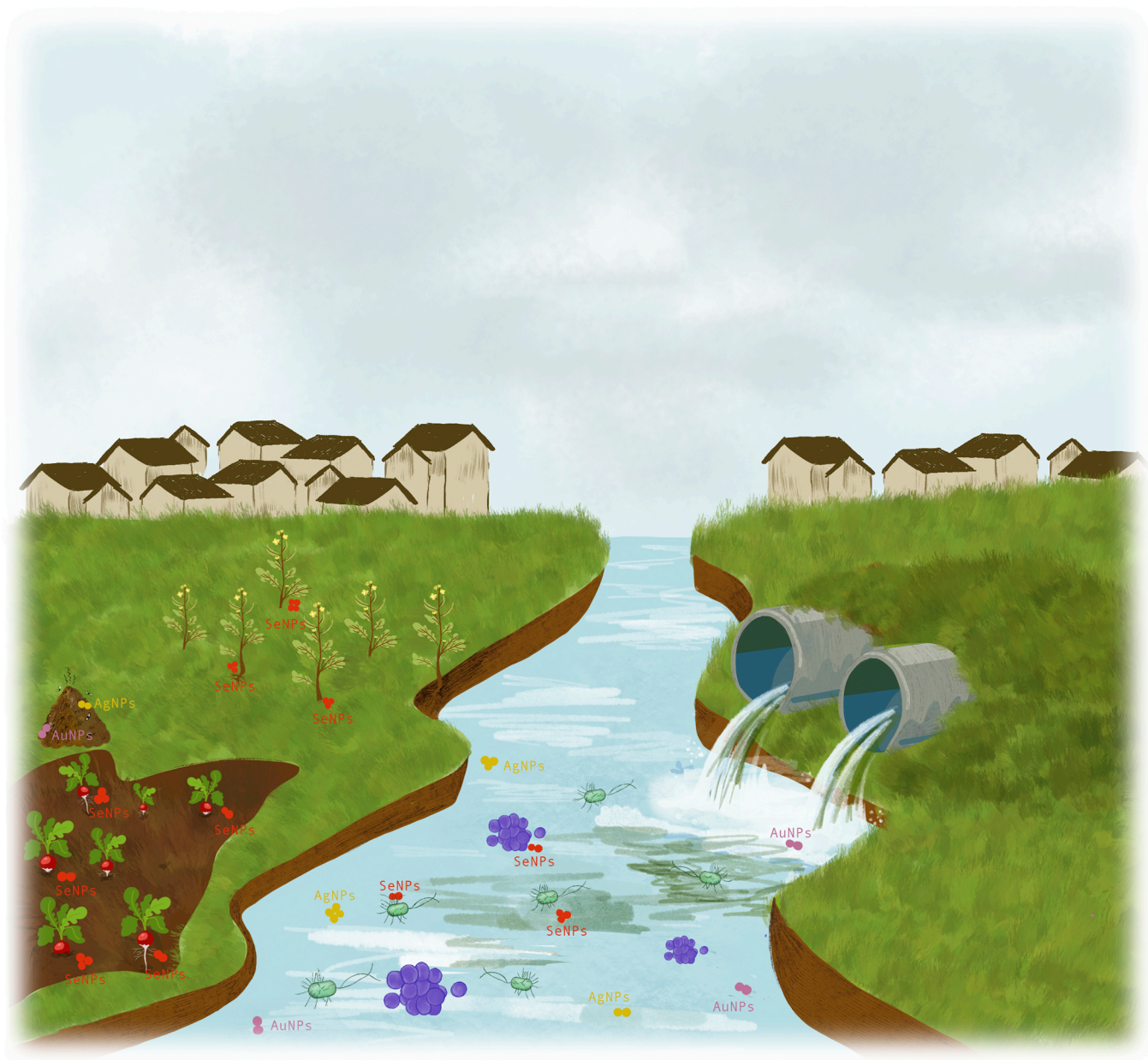
Yolanda Madrid Albarrán

María Eugenia de León González



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DPTO. QUÍMICA ANALÍTICA

CARACTERIZACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS Y DE METALOIDES EN MUESTRAS BIOLÓGICAS Y MEDIOAMBIENTALES



GUSTAVO MORENO MARTÍN

DIRECTORAS :

Yolanda Madrid Albarrán
María Eugenia de León González

TESIS DOCTORAL
MENCIÓN INTERNACIONAL
MADRID 2022

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el marco de los Proyectos de Investigación: CTQ2014-54801-C2-1-R, CTQ2017-83569-C2-1-R, PID2020-114714RB-I00, S2013/AB1-3028 (AVANSECAL-CM), S2018/BAA-4393 (AVANSECAL-II-CM) y 4129230 (MERFISH: MSCA-RISE).

Se agradece la financiación recibida a través del contrato predoctoral de personal investigador en formación otorgado por la Universidad Complutense de Madrid (CT42/18-CT43/18) para realizar una parte del trabajo presentado.

Aunque algunas veces el camino correcto no es el más fácil, siempre uno encuentra personas que hacen que merezca la pena recorrerlo. De hecho, a lo largo de esta Tesis Doctoral he conocido a personas que, de una u otra manera, me han ayudado a que hoy pueda escribir estas líneas, sinónimo del que espero sea el comienzo de una nueva etapa en mi carrera investigadora. Y es por eso, que se merecen mi más sincero agradecimiento.

El Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias se convirtió en mi segunda casa durante todo el Doctorado, gracias al Equipo Directivo formado por María Cruz Moreno Bondi, María Pedrero Muñoz y Mari Luz Mena Fernández, que permitieron mi incorporación a este departamento. Especial mención quiero hacer a María Pedrero por la labor que realiza con nosotros, los doctorandos, organizando nuestra docencia y haciéndonos partícipes de todas las actividades que organiza el departamento.

Durante bastante tiempo he tenido el placer de ser el representante de los alumnos de postgrado en el Consejo de Departamento, lo que me ha permitido tener un mayor contacto con todos los profesores que lo constituyen, y a quienes también quiero dar las gracias. No obstante, tengo que destacar a dos personas que, sin su ayuda, la verdad que en muchas ocasiones las situaciones no se habrían resuelto tan fácilmente. La primera de ellas, el profesor Daniel Rosales, que siempre mostró una gran disposición cuando tuve problemas con los equipos de absorción atómica, y estuvo ahí para intentar solucionarlos y evitar que perdiese ese día de medida. La segunda persona es el profesor Fernando Navarro, quien no solo me ha solucionado numerosos problemas relacionados con los ordenadores, invirtiendo una gran cantidad de horas en ello, sino también con los equipos de absorción atómica y cromatografía.

Dentro del departamento tampoco puedo olvidarme de los técnicos del laboratorio Miriam, Marcos y David, una pieza clave para los doctorandos cuando no disponemos de algún reactivo/ material, cuando necesitamos medir en los equipos del departamento o cuando comenzamos nuestro turno de laboratorio con los alumnos del grado. Por todo ello, muchas gracias por vuestra paciencia.

Una de las cosas que más me enorgullece de este departamento es haber podido formar parte del grupo de Trazas, Especiación y Proteómica. Un grupo constituido por excelentes investigadores que sobresalen por su gran calidad humana, y que sin lugar a

duda se ha acabado convirtiendo en mi segunda familia durante todo este tiempo. El haber podido formar parte de esta gran familia se lo debo a las directoras Yolanda Madrid Albarrán y María Milagros Gómez Gómez, quienes me permitieron ser un miembro más de este grupo al que tanto debo y al que siempre estaré agradecido.

Las personas con las que siempre voy a estar en deuda y a las que no tengo palabras para agradecer el esfuerzo, la paciencia y la comprensión que han demostrado conmigo durante todos estos años son mis Directoras de Tesis Yolanda Madrid Albarrán y María Eugenia de León González. No solo os habéis involucrado a nivel laboral, formándome como investigador y compartiendo conmigo todos vuestros conocimientos, sino también a nivel personal, preocupándoos por mí y empatizando conmigo. Aunque es cierto que los comienzos no fueron del todo fáciles, como siempre os he dicho no dudaría en repetir esta andadura siempre que fuera con vosotras, porque para mí no solo sois dos de las mejores investigadoras que he conocido, sino también dos grandísimas personas que no dudáis en poneros en la piel del doctorando, y a quienes os considero parte de mi familia.

Dentro de este grupo he tenido el placer de conocer y compartir momentos con personas muy top.

Teresa, sin duda has sido mi mayor descubrimiento, la persona que aún en los momentos no tan buenos siempre has tenido una palabra de apoyo, y nunca me has permitido tener esa visión pesimista que me caracteriza en muchas ocasiones. Gracias por estar siempre ahí y ayudarme y comprenderme. No puedo olvidarme tampoco de los riquísimos postres que traes para tus niños del laboratorio, postres que sin duda mejoran el día a cualquiera.

Jon, tú también eres otra de las personas que siempre que lo he necesitado me ha escuchado y me ha dado grandes consejos. A pesar de nuestros pequeños rifirrafes, gracias por permitirme colaborar contigo, por echarme una mano cuando algún equipo no funcionaba y por tirar siempre del carro.

Noelia, responsable junto con Eugenia de que me presentara como representante de estudiantes de postgrado en el Departamento. Gracias por tener siempre buenas palabras y estar pendiente de nosotros, mandándonos correos de todos los

cursos/seminarios que nos podían interesar. Siempre me acordaré del congreso de Huelva donde fuiste como nuestra madre.

Rían, gracias por los momentos y las charlas que hemos compartido en tu despacho. Algo que mi cerebro nunca va a borrar de su recuerdo es la aparición de Carolina en el congreso de Huelva, ¡qué momentazo! y ¡qué pedazo congreso vivimos! sin duda, irrepetible.

Estefanía, gracias por estar también disponible cuando algo no funcionaba en el laboratorio y echarnos una mano. No me voy a olvidar de nuestras salidas al teatro, musicales... todo ello precedido de unas succulentas cenas.

Mila, gracias por estar siempre tan atenta con nosotros y pasar de vez en cuando a preguntarnos cómo íbamos o incluso cuando nos encontrábamos por los pasillos. La verdad, que es un gesto de agradecer el que la gente se preocupe.

Por supuesto tampoco me puedo olvidar del resto de los componentes que forman y han formado parte de este grupo de investigación: Jose, Lola, Mari Luz, Conchita...

Sin embargo, es evidente que el día a día en el laboratorio me ha permitido conocer a grandes compañeros, algunos de los cuales ya estaban terminando cuando yo empezaba, pero aun así tengo muy buenos recuerdos de los pequeños ratos que pudimos compartir. Es por ello por lo que tengo que mencionar a María Palomo, Irene, Noemí, Sonia y Pablo. Tampoco me puedo olvidar de Sandra, con quien he compartido más tiempo y demostró que a pesar de las circunstancias siempre se podía contar con ella y estaba ahí para lo que se necesitara.

También quiero mencionar a las nuevas generaciones que están en estos momentos en el laboratorio dando el callo para sacar su tesis adelante, Tamara, Paloma, Rodrigo, Alejandro, Héctor, Guillermo y Andrés. Iván, muchas gracias por las palabras de apoyo y por estar siempre pendiente de todo. David, aunque ya estás en la etapa final, nunca voy a olvidar los quebraderos de cabeza y el tiempo que compartimos durante los análisis de los líquenes del suizo, ¡vaya paliza! Elena, gracias por ayudarme en mi investigación durante tu TFG y TFM. Mencionar también a Fernando, Federica, Marina, Natalia y Micaela, personas que decidieron hacer una estancia en nuestro grupo y con los que tuve el placer de trabajar y aprender cosas nuevas, sin lugar a duda vuestro paso ha dejado huella.

Y ahora sí que sí es el momento de mencionar a mis grandes apoyos, a las personas que sin dudarlo se han convertido en una pieza clave en esta tesis doctoral, y que tengo claro que van a seguir formando parte de mi vida con independencia de donde nos lleven nuestros caminos, ya que en eso se basa la verdadera amistad. Elena, contigo he pasado momentos divertidísimos y de verdadera complicidad durante el TFG pero sobre todo en el máster, me encantan tus momentos de locura y gracias por haberme estado apoyando desde Farmacia. Mari, hemos vivido momentos inolvidables tanto dentro como fuera del laboratorio, no puedo sacar de mi cabeza nuestras sevillanas en el laboratorio sin importar la hora y quien estuviera. Nos entendíamos con solo mirarnos y aunque estemos lejos sé que siempre voy a tener una amiga gallega para lo que necesite. Mis Malditas Bea, Esther y Emma, qué habría hecho yo sin vosotras. Bea, juntos desde el principio, te has convertido en una persona incondicional para mí, que me has levantado cuando me he caído y no has dudado nunca en echarme una mano. Contigo he vivido grandes momentos en el laboratorio, nuestras risas cuando metíamos la pata y no sabíamos que hacer, nuestros congresos cuando preguntaban si de verdad compartíamos habitación... Tengo mil y una anécdota, pero no tengo palabras para agradecerte todo lo que me estás aportando. Esther, sin duda eres quien ha conseguido levantarme el ánimo, siempre con una sonrisa y viendo el lado positivo de las cosas. Me encantan nuestras conversaciones dentro y fuera del despacho, no sé cómo lo haces, pero consigues que en los días nublados salga el sol. Espero seguir contagiándome de ese positivismo que desprendes y que algo se me llegue a pegar. Emma, aunque apareciste en la última etapa de mi tesis, te has convertido en una de las personas imprescindibles y no sabes cuánto agradezco el que te hayas cruzado en mi camino. Me encanta la complicidad que tenemos, ya que somos tan parecidos que nos entendemos con solo mirarnos. Sin duda, una referente a seguir.

La última etapa de la Tesis la pasé en Pau, Francia, concretamente en el Instituto de Ciencias Analíticas y Química Física para el Medio Ambiente y los Materiales (IPREM) haciendo una estancia en la empresa Advanced Isotopic Analysis (AiA) y en el grupo dirigido por David Amouroux, a quien agradezco que esto haya sido posible. Pero sin duda, a quien también voy a estar siempre agradecido es a Zoyne Pedrero Zayas, que desde el primer momento en que contactamos con ella nos puso las cosas muy fáciles (a pesar del COVID) para que yo pudiera realizar esta aventura. Además, durante esos tres meses me hizo sentir como en casa desde el primer momento, y me permitió adentrarme

en la investigación del mercurio, hasta el momento desconocida para mí. Sin lugar a duda, Yolanda no se equivocó cuando me dijo que la mejor persona con quien podía hacer esta estancia era contigo. Además, en ese tiempo también conocí a grandes personas que hicieron que mi paso por Pau fuera inmejorable, por eso tengo que mencionar a Fernanda, Pilar, Adrey y especialmente a Marta, con quien compartí muchas aventuras dentro y fuera de la ciudad, y a Kholoud, que desde antes de mi llegada y durante todo mi paso por Pau me facilitó mucho la estancia. De quienes sí que no me puedo olvidar es de mis compañeros del IPREM: Silvia, Javi, Mikel, Claudia, Rosanna, Yaidel, Celia y Fran, con quienes he compartido la mayor parte del tiempo y a quienes tengo que agradecer que me lo pusieran todo tan fácil desde el primer momento. Siempre voy a recordar los grandes momentos que pasamos: las comidas y las cenas, las tradicionales hamburguesas de los jueves, los momentos en el laboratorio, las cervezas en el Bondi, nuestros bailes en Baracuba, etc. Sin duda, gracias a vosotros esta última etapa de mi Tesis ha sido una de las mejores, a pesar de que siempre suele ser una de las más difíciles, y espero que nos podamos volver a encontrar.

Tampoco puedo olvidarme de mis amigos de toda la vida, los del pueblo, que, aunque en muchas ocasiones no entendían esta situación, siempre han estado ahí para escucharme y aconsejarme.

Y sin lugar a duda, las piezas fundamentales a las que debo el poder estar hoy aquí y el haberme convertido en la persona que soy, son mis padres. No tengo palabras para poder agradecerlos todo lo que me dais y siempre, aunque la situación no sea la mejor, lucháis para que consiga lograr mis sueños. Sé que durante esta etapa os he dado muchos quebraderos de cabeza con mis agobios, sobre todo a ti mamá, pero a pesar de que esta situación era nueva para vosotros, siempre habéis tenido las palabras y consejos adecuados para que consiguiera olvidarme de todo y tirar de nuevo para adelante. Todo este esfuerzo y trabajo no es solo mérito mío sino también vuestro. Sois lo mejor que tengo y estoy orgulloso de la familia que me ha tocado.

A mis padres y mi tía Trini

La ciencia es la única construcción fuerte de la humanidad

El árbol de la ciencia, Pío Baroja

ÍNDICE

I.RESUMEN	23
II.SUMMARY	29
III.INTRODUCCIÓN.....	35
1. NANOPARTÍCULAS Y SU CARACTERIZACIÓN	37
1.1. Métodos para la caracterización de nanopartículas	38
1.1.1. Microscopía electrónica	40
1.1.2. Difracción de rayos-X.....	46
1.1.3. Métodos de dispersión de luz.....	46
1.1.4. Métodos de separación.....	48
1.1.4.1. Métodos no cromatográficos	48
1.1.4.2. Métodos cromatográficos.....	54
1.1.5. Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo para el análisis de nanopartículas utilizando el modo de detección de partículas individuales	55
1.2. Metodologías analíticas para evaluar la biotransformación de nanopartículas...	63
1.2.1. HPLC-ICP-MS y HPLC-ESI-MS/MS	64
1.2.2. HS-SPME-GC-MS.....	65
1.3. Herramientas quimiométricas para la evaluación de datos.....	66
1.3.1. ANOVA multivariante.....	67
1.3.2. Análisis de componentes principales	68
1.3.3. Métodos de calibración multivariantes.....	69
1.3.4. Diseño experimental. Diseños factoriales	72
2. INTERACCIONES DE NANOPARTÍCULAS CON SISTEMAS BIOLÓGICOS Y MEDIOAMBIENTALES.....	73
2.1. Transformaciones y destino de nanopartículas en los medios acuático y terrestre	74

2.1.1. Transformaciones físicas	76
2.1.2. Transformaciones químicas	80
2.1.3. Transformaciones biológicas	83
2.2. Interacción de nanopartículas con sistemas biológicos	85
2.3. Nanopartículas de selenio	86
IV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
V. OBJETIVOS	133
VI. OBJECTIVES	137
VII. PARTE EXPERIMENTAL	141
1. DESARROLLO DE PLATAFORMAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS EN MATRICES MEDIOAMBIENTALES	143
1.1. Determinación simultánea del tamaño y la concentración de AgNPs en muestras de agua por espectrofotometría UV-Vis y herramientas quimiométricas	147
1.2. Caracterización de AgNPs y AuNPs en lodos de depuradora a través de la detección individual de partículas mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo	161
2. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE SeNPs. METABOLIZACIÓN DE SELENIO POR ORGANISMOS VIVOS: PLANTAS Y BACTERIAS	183
2.1. Microextracción en fase sólida <i>in vivo</i> para el análisis cuantitativo de compuestos orgánicos volátiles de selenio en plantas	189
2.2. Conocimiento de la acumulación y transformación de Ch-SeNPs por <i>Raphanus sativus</i> y <i>Brassica juncea</i> : Efecto sobre la incorporación de elementos esenciales	201
2.3. Determinación del tamaño y de la concentración en masa y en número de las SeNPs biogénicas sintetizadas por bacterias del ácido láctico mediante un enfoque multimétodo	221

2.4. Cuantificación <i>in vivo</i> de compuestos orgánicos volátiles de selenio liberados por bacterias expuestas a selenio con HS-SPME-GC-MS. Efecto del selenito y de las nanopartículas de selenio.....	231
2.5. Transformación metabólica del selenito y las nanopartículas de selenio por <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> utilizando técnicas basadas en HPLC/MS.....	241
VIII.DISCUSIÓN INTEGRADORA	273
IX.CONCLUSIONES	307
X.CONCLUSIONS.....	313
XI.LISTA DE ABREVIATURAS	319
XII.ANEXOS	325
A.1. Nanoespeciación mediante fraccionamiento de flujo de campo.....	327
A.2. Elementos traza: ¿qué es la especiación?	353
A.3. Producción científica	377

I.RESUMEN

La nanotecnología, y en particular las nanopartículas metálicas y de metaloides han demostrado ser de gran utilidad en aplicaciones relacionadas con la salud, el medioambiente, la tecnología o la alimentación. Sin embargo, su liberación al medioambiente a lo largo de su ciclo de utilización puede constituir un riesgo potencial y poco conocido para la salud, el medioambiente y los ecosistemas. Las nanopartículas una vez que llegan al medioambiente e interaccionan con las sustancias químicas del entorno o con sistemas biológicos pueden experimentar modificaciones en sus propiedades fisicoquímicas (tamaño, morfología, estado de agregación, carga superficial, procesos de disolución o transformación a otras especies químicas del mismo elemento). Todo ello afectará sin duda a su destino final e impacto sobre los ecosistemas. En este sentido, la Química Analítica, juega un papel clave para establecer dichas transformaciones, mediante el desarrollo de nuevas estrategias y/o la adaptación y combinación de técnicas y métodos existentes. La presente Tesis Doctoral titulada “Caracterización y transformación de nanopartículas metálicas y de metaloides en muestras biológicas y medioambientales” aborda esta problemática mediante el desarrollo de metodologías analíticas que permitan caracterizar y estudiar las transformaciones que sufren las nanopartículas metálicas de plata (AgNPs) y de oro (AuNPs) al estar en contacto con muestras medioambientales de distinta naturaleza, y las nanopartículas de selenio (SeNPs) en su interacción con sistemas biológicos como plantas y bacterias. El empleo de una plataforma multitécnica basada en la combinación de técnicas de microscopía electrónica, técnicas de dispersión de luz, técnica de difracción de rayos X, técnicas de separación y la técnica de espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), en modo convencional y en modo de detección de partículas individuales (spICP-MS), ha hecho posible la caracterización del tamaño, morfología, estado de agregación y concentración de las AgNPs y AuNPs en aguas de río, aguas de grifo y lodos de depuradora, y de las de SeNPs en cultivos bacterianos y tejidos biológicos de plantas. Esta plataforma ha permitido establecer las variaciones en las características originales de las nanopartículas mencionadas durante los procesos de tratamiento de muestra y/o extracción, y en su interacción con los sistemas biológicos ensayados. Además, ha posibilitado la caracterización de SeNPs sintetizadas de forma biogénica mediante el empleo de bacterias ácido-lácticas.

En el presente trabajo de investigación se han desarrollado dos métodos analíticos para la caracterización y cuantificación de nanopartículas metálicas en muestras medioambientales. El primero de ellos, se basó en los cambios de la resonancia del

plasmón superficial de las AgNPs cuando forman agregados con la L-cisteína. Esta propiedad en combinación con la espectrofotometría UV-Vis y la calibración multivariante basada en la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) permitió determinar simultáneamente el tamaño y la concentración de estas nanopartículas en muestras de agua. En el segundo se desarrolló un método analítico basado en la técnica splCP-MS para la determinación del tamaño y la concentración en número de partículas de las AgNPs y de las AuNPs en lodos de depuradora previa extracción de las mismas con pirofosfato de sodio (TSPP). La utilidad de la técnica splCP-MS para distinguir entre el metal en forma disuelta y particulada, junto con herramientas quimiométricas permitió evaluar el efecto de la extracción (tipo de extractante, velocidad y tiempo de centrifugación, y temperatura) sobre las características originales de las nanopartículas, así como su estabilidad en el lodo durante un periodo de 12 meses.

Una parte importante de la presente Tesis Doctoral se ha centrado en la interacción de las SeNPs con sistemas biológicos. El cultivo de diferentes especies de plantas (*Raphanus sativus* y *Brassica juncea*) y de bacterias (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*) en presencia de las SeNPs ha permitido estudiar las transformaciones de estas nanopartículas a especies de selenio tanto de naturaleza volátil como no volátil. Para la monitorización y cuantificación *in vivo* de las especies volátiles dimetilselenio (DMSe) y dimetildiselenio (DMDSe), liberadas por estos organismos, se desarrolló una metodología basada en la calibración interna en fibra para su empleo en microextracción en fase sólida (SPME) en su modalidad de espacio en cabeza (HS), y detección por cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS). Además de las especies volátiles de selenio, este procedimiento permitió identificar en los cultivos bacterianos especies volátiles de azufre y mixtas de selenio y azufre, como el sulfuro de dimetilselenio. Por otra parte, la determinación de especies no volátiles de selenio (selenoaminoácidos) se basó en la extracción enzimática de las especies y su posterior análisis por cromatografía de líquidos acoplada a ICP-MS (HPLC-MS) y a masas en tandem (HPLC-ESI-MS/MS). La aplicación de esta metodología confirmó la transformación de las SeNPs a selenocisteína (SeCys) en las bacterias, y a selenometionina (SeMet), selenometilselenocisteína (SeMetSeCys) y γ -glutamil-Se-MetSeCys en las plantas. La determinación del selenoaminoácido SeCys en las bacterias supuso una mayor complejidad al ser necesaria una ruptura de la pared bacteriana con lisozima, y un proceso de carbamidometilación

para preservar la integridad de dicha especie mediante la protección de los residuos de SeCys, y evitar así que reaccionasen formando puentes Se-Se y/o Se-S.

En los estudios con sistemas biológicos, la aplicación de herramientas quimiométricas como el análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial y el análisis de componentes principales (PCA) fue de gran utilidad para el análisis de datos, y para establecer relaciones de causa-efecto entre la presencia de SeNPs y la incorporación de metales esenciales por las plantas, así como el diferente comportamiento de las bacterias ante la presencia de SeNPs y otras especies de selenio como el selenito.

II.SUMMARY

Nanotechnology, and particularly metal and metalloid nanoparticles, have proven to be very useful in applications related to health, the environment, technology, and food. However, their release into the environment throughout their use cycle may constitute a potential and poorly known risk to health, the environment, and even the ecosystems. Once nanoparticles reach the environment and interact with surrounding chemicals or biological systems, they can undergo modifications in their physicochemical properties (size, morphology, state of aggregation, surface charge, dissolution processes or transformation to other chemical species of the same element). All this will undoubtedly affect their final fate and impact on ecosystems. In this sense, Analytical Chemistry plays a key role in establishing these transformations, through the development of new strategies and/or the adaptation and combination of existing techniques and methods. This Doctoral Thesis entitled "Characterization and transformation of metallic and metalloid nanoparticles in biological and environmental samples" addresses this problem by developing analytical methodologies to characterize and study the transformations that metallic silver (AgNPs) and gold (AuNPs) nanoparticles undergo when they are exposed to environmental samples of different nature, and selenium nanoparticles (SeNPs) when interacting with biological systems such as plants and bacteria. The use of a multi-technique platform based on the combination of electron microscopy techniques, light scattering techniques, X-ray diffraction technique, separation techniques and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), in conventional mode and single particle detection mode (spICP-MS), has made possible the characterization of the size, morphology, aggregation state and concentration of AgNPs and AuNPs in river water, tap water and sewage sludge, and SeNPs in bacterial cultures and biological plant tissues. This platform has allowed to establish the variations in the original characteristics of the mentioned nanoparticles during the sample treatment and/or extraction processes, along with their interaction with the tested biological systems. In addition, it has enabled the characterization of SeNPs synthesized biogenically using lactic acid bacteria.

In the present research work, two analytical methods have been developed for the characterization and quantification of metallic nanoparticles in environmental samples. The first one was based on the changes of the surface plasmon resonance of AgNPs when they form aggregates with L-cysteine. This property in combination with UV-Vis spectrophotometry and multivariate calibration based on partial least squares (PLS) regression, allowing simultaneous determination of the size and concentration of these

nanoparticles in water samples. In the second, an analytical method based on the splCP-MS technique was developed for determining the size and particle number concentration of AgNPs and AuNPs in sewage sludge after extraction with tetrasodium pyrophosphate (TSPP). The usefulness of the splCP-MS technique to distinguish between the metal in solution and in particulate form, together with chemometric tools, made it possible to evaluate the effect of the extraction (type of extractant, centrifugation rate and time, and temperature) on the original characteristics of the nanoparticles, as well as their stability in the sludge for 12 months.

An important part of this Doctoral Thesis has focused on the interaction of SeNPs with biological systems. The culture of different plant species (*Raphanus sativus* and *Brassica juncea*) and bacteria (*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*) in presence of SeNPs has enabled studying their transformations to selenium species of both volatile and non-volatile nature. For *in vivo* monitoring and quantification of volatile dimethylselenium (DMSe) and dimethyldiselenium (DMDSe) species released by these organisms, a methodology based on in-fiber internal calibration was developed. For this purpose, solid-phase microextraction (SPME) in its headspace (HS) mode was used for the extraction of the volatile species, and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) for their detection and quantification. In addition to volatile selenium species, this procedure allowed the identification of volatile sulfur and mixed selenium-sulfur species, such as dimethylselenium sulfide, in the bacterial cultures. On the other hand, the determination of non-volatile selenium species (selenoamino acids) was based on the enzymatic extraction of the species and their subsequent analysis by liquid chromatography coupled to ICP-MS (HPLC-MS) and tandem mass (HPLC-ESI-MS/MS). The application of this methodology confirmed the transformation of SeNPs to selenocysteine (SeCys) in bacteria, and to selenomethionine (SeMet), selenomethylselenocysteine (SeMetSeCys) and γ -glutamyl-Se-MetSeCys in plants. The determination of the selenoamino acid SeCys in bacteria was more complex since a bacterial wall disruption with lysozyme, and a carbamidomethylation process was required. In this way, the integrity of this species was preserved by protecting the SeCys residues, thus avoiding the formation of Se-Se and/or Se-S bridges.

In the studies involving biological systems, the application of chemometric tools such as multifactorial analysis of variance (ANOVA) and principal component analysis

(PCA) was very useful for data analysis, to establish cause-effect relationships between the presence of SeNPs and the incorporation of essential metals by plants, and the different behavior of bacteria in the presence of SeNPs and other selenium species such as selenite.

III.INTRODUCCIÓN

1. NANOPARTÍCULAS Y SU CARACTERIZACIÓN

El físico estadounidense y Premio Nobel de Física en 1965, Richard Feynman, ha sido considerado el padre de la nanotecnología moderna al introducir el concepto de manipulación de la materia a nivel atómico en la conferencia titulada *There's a Plenty of Room at the Bottom* ("Hay mucho sitio en el fondo"), que presentó durante la reunión de la Sociedad Americana de Física en 1959 (Hulla *et al.*, 2015). Sin embargo, no fue hasta principios del siglo XXI cuando el interés por los campos de la nanociencia y la nanotecnología se incrementó de forma notable (Bayda *et al.*, 2020), dando lugar al desarrollo y a la producción de una gran variedad de nanomateriales.

En el año 2011, la Comisión Europea adoptó una definición en la que por "nanomaterial" se entiende todo aquel material natural, secundario o fabricado que contenga partículas sueltas o formando un agregado o aglomerado, y en el que el 50% o más de las partículas en la granulometría numérica presente una o más dimensiones extensas en el intervalo de tamaños comprendido entre 1 y 100 nm. En casos específicos y cuando se justifique por preocupaciones medioambientales, salud, seguridad o competitividad, el umbral de la granulometría numérica del 50% puede sustituirse por un umbral comprendido en el 1 y el 50% (Comisión Europea, 2011).

Dentro de los nanomateriales se encuentran las nanopartículas (NPs, *Nanoparticles*), un amplio grupo de materiales que incluyen sustancias particuladas que tienen al menos una dimensión inferior a 100 nm (Laurent *et al.*, 2010). Esta reducción drástica del tamaño hace que aparezca el efecto cuántico, con la creación de nuevos niveles energéticos, y que se produzca un importante aumento de su área superficial (relación superficie/volumen), mostrando una superficie más activa químicamente. Como consecuencia, las propiedades relacionadas con la superficie, como las propiedades ópticas, eléctricas, magnéticas, mecánicas o químicas, dependen del tamaño y es lo que les permite diferenciarse de sus partículas análogas de mayores dimensiones, también conocidas como *bulk* (Guo *et al.*, 2014; I. Khan *et al.*, 2019). En función de su composición, las nanopartículas pueden clasificarse en dos grandes grupos:

- Nanopartículas con base de carbono. Dentro de este grupo se encuentran nanotubos, fullerenos, nanoglóbulos, nanopartículas de látex, grafeno, etc.

- Nanopartículas metálicas y de metaloides. Este grupo a su vez se puede subdividir en nanopartículas metálicas (Au, Ag, Fe), de metaloides (Se, Te), de óxidos metálicos y de metaloides (TiO₂, ZnO, Fe₂O₃, SiO₂), de aluminosilicatos (zeolitas, cerámicas, arcillas), y también en los conocidos quantum dots o partículas semiconductoras (CdSe, CdS, ZnSe, HgTe).

Las propiedades únicas y novedosas que surgen en la materia a escala nanométrica han suscitado un notable interés, convirtiendo a las nanopartículas en el centro de la investigación científica y producción industrial actual. Las nanopartículas se aplican en una amplia variedad de campos, que incluyen la medicina (administración de fármacos, diagnóstico, ingeniería de tejidos), el medioambiente (saneamiento, tratamiento del agua), la alimentación (aditivos, envases), la energía (pilas de combustible, células solares, aditivos para combustibles), productos de consumo (cosméticos, textiles) o la construcción (pinturas, revestimientos, aleaciones) (Al-Mubaddel *et al.*, 2017; Hulla *et al.*, 2015; Weinberg *et al.*, 2011). En la Tabla 1 se recogen diferentes tipos de nanopartículas y sus aplicaciones.

El uso extensivo de los productos que contienen nanopartículas acaba provocando la liberación, ya sea voluntaria o involuntaria, de estas partículas de tamaño nanométrico al medioambiente y a los diferentes ecosistemas. Las continuas transformaciones y modificaciones que experimentan las nanopartículas tras su interacción con matrices biológicas y medioambientales influyen en su detección y cuantificación, dificultando su caracterización (Abbas *et al.*, 2020b). Por lo tanto, se requiere disponer de métodos analíticos que permitan detectar, caracterizar y cuantificar las nanopartículas en muestras biológicas y medioambientales, así como evaluar las transformaciones que puedan experimentar como resultado de dicha interacción.

1.1. Métodos para la caracterización de nanopartículas

La caracterización de las nanopartículas supone un reto para la Química Analítica, la variedad de tamaños, formas y composiciones, así como el uso de recubrimientos superficiales explican la complejidad inherente en su caracterización. Por eso cuando las nanopartículas se convierten en el analito objeto de estudio, se debe aportar: 1) información cuantitativa relativa a la concentración en masa y en número, y 2) información cualitativa que abarca desde la detección de estas partículas a su caracterización tanto

química (composición del núcleo y del recubrimiento) como física (tamaño, forma, estado de agregación y área superficial) (Laborda *et al.*, 2016a; López-Sanz *et al.*, 2019).

Tabla 1. Tipos de NPs y sus aplicaciones más características. Adaptada de (Marcoux *et al.*, 2013).

Tipo de NPs	NPs	Aplicaciones/ usos
Base de Carbono	Nanotubos de carbono	○ Electrónica, aditivo para neumáticos, lubricantes y adsorción de contaminantes
	Fullerenos	○ Uso médico y cosmético
Metálicas/ Metaloides	Ag	○ Agente antimicrobiano en aplicaciones domésticas, pintura, textiles, plásticos, envases
	Fe	○ Depuración de aguas contaminadas con PCBs, plaguicidas organoclorados y disolventes orgánicos clorados, y degradación de contaminantes como PAHs
	Pt, Pd	○ Catalizadores de automóviles
	Sn	○ Pinturas
	Se	○ Nutracéuticos y suplementos para la salud, envases activos y biomedicina
	Cu	○ Microelectrónica
	Al	○ Revestimiento
Óxidos metálicos/ metaloides	TiO ₂	○ Cosmética, pinturas, revestimiento, envases alimentarios y nanocatalizador en plantas de tratamiento de agua residual
	ZnO	○ Cosmética, pinturas, revestimiento y envases alimentarios
	CeO ₂	○ Catalizador de combustible
	SiO ₂	○ Pinturas, revestimientos, protección UV, barniz, cerámica, electrónica, productos farmacéuticos y odontología
	Al ₂ O ₃	○ Baterías y pinturas
	Fe ₃ O ₄	○ Ensayos bioquímicos, biomanipulación y eliminación de contaminantes
Aluminosilicatos	Nanoarcillas	○ Envases de plástico
	Cerámicas	○ Revestimiento
Quantum dots		○ Electrónica, tecnología, bioimagen

La caracterización de las nanopartículas va adquiriendo complejidad a lo largo de su ciclo de utilización. La caracterización más completa se puede lograr en las nanopartículas sintetizadas en el laboratorio o fabricadas por la industria al estar en su estado más puro (pristina). La posterior incorporación de las nanopartículas a diferentes productos industriales o de consumo aumentará la dificultad de su caracterización en función de la complejidad de la matriz. Los ensayos de liberación, migración, destino, comportamiento y (eco)toxicidad realizados a escala de laboratorio con estos productos, o incluso con las nanopartículas en su estado puro, incrementan de nuevo el grado de complejidad en la caracterización, no solo por la matriz sino también porque las concentraciones que se esperan son más bajas y, además, pueden originarse transformaciones en las mismas. Sin embargo, el mayor reto se produce cuando las

nanopartículas se incorporan al medio ambiente o a los seres vivos. En cualquier caso, la caracterización de un nanomaterial debe ser adecuada ya que una caracterización incompleta o incorrecta comprometerá la fiabilidad y validez de los resultados, proporcionando información errónea acerca de su impacto sobre la salud y los ecosistemas, e impidiendo un uso y comercialización segura del mismo (Laborda y Bolea, 2018).

La gran variedad de parámetros cualitativos y cuantitativos que se deben estudiar a la hora de caracterizar las nanopartículas, junto con las dificultades comentadas en cuanto a su caracterización, hacen que un reto actual de la Química Analítica se centre en desarrollar metodologías analíticas para detectar, caracterizar y cuantificar de forma unívoca las nanopartículas presentes en muestras complejas, en concentraciones realistas (desde los $\mu\text{g L}^{-1}$ a los ng L^{-1} , en matrices líquidas y desde los mg Kg^{-1} a los ng Kg^{-1} , en matrices sólidas) y en presencia de otras partículas, de similar o diferente naturaleza. Asimismo, debe preservarse la integridad de las propiedades originales de las nanopartículas. En la mayoría de los casos, estas estrategias requieren el uso de varios métodos analíticos complementarios o plataformas multimétodo, dado que es poco probable que un solo método sea suficiente para proporcionar una caracterización completa de las nanopartículas (Laborda *et al.*, 2016a; Laura Soriano *et al.*, 2018). En la Tabla 2 se resumen las características analíticas de los métodos más empleados para la caracterización de nanopartículas en muestras complejas.

1.1.1. Microscopía electrónica

La microscopía electrónica es una de las técnicas más útiles para la caracterización de nanopartículas, gracias a su capacidad para visualizar objetos a escala nanométrica y, por tanto, para obtener información sobre su tamaño, morfología y estado de agregación. La capacidad de visualización de estas técnicas se combina con diferentes herramientas espectroscópicas, como la espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDXS, *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*) o la espectroscopía electrónica de pérdidas de energía (EELS, *Electron Energy-Loss Spectroscopy*), que permiten obtener información elemental y estructural, y de este modo detectar y cuantificar elementos más pesados que el boro, con una incertidumbre del 15-20% (Laborda *et al.*, 2016a; Laborda y Bolea, 2018).

Tabla 2. Métodos analíticos y sus características para la caracterización de nanopartículas en muestras complejas.

Técnica	LOD tamaño	LOD concentración	Información analítica
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA			
Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	0,1 nm	10 ⁹ partículas L ⁻¹	○ Tamaño <i>core</i> (promedio y distribución) ○ Forma ○ Estado de aglomeración/agregación ○ Composición elemental/molecular (+EDXS; +EELS)
Microscopía electrónica de barrido (SEM)	1 nm	10 ¹² partículas L ⁻¹	○ Tamaño <i>core</i> (promedio) ○ Forma ○ Estado de aglomeración/agregación ○ Composición elemental/molecular (+EDXS)
Microscopía electrónica de transmisión ambiental (ETEM)	0,17 nm		○ Tamaño <i>core</i> (promedio y distribución) ○ Forma ○ Estructura de red ○ Composición elemental (+EDXS)
Microscopía electrónica de transmisión húmedo (Wet-TEM)	0,23 nm		○ Tamaño <i>core</i> (promedio y distribución) ○ Forma ○ Estado de aglomeración/agregación
Microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM)	30 nm		○ Tamaño <i>core</i> (promedio y distribución) ○ Forma ○ Estado de aglomeración/agregación ○ Composición elemental (+EDXS)
Microscopía electrónica de barrido húmedo (Wet-SEM)	10 nm		○ Tamaño <i>core</i> (promedio y distribución) ○ Forma ○ Estado de aglomeración/agregación ○ Composición elemental (+EDXS)

Tabla 2 cont. Métodos analíticos y sus características para la caracterización de nanopartículas en muestras complejas.

Técnica	LOD tamaño	LOD concentración	Información analítica
MÉTODOS DE DISPERSIÓN DE LUZ			
Difracción de rayos X (XRD)	0,5 nm	1% (w/w)	○ Tamaño (promedio) ○ Estructura cristalina
Dispersión dinámica de luz (DLS)	1 nm	mg L ⁻¹	○ Tamaño hidrodinámico (promedio y distribución) ○ Carga superficial (potencial zeta) ○ Grado de dispersión
Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA)	10 nm	10 ⁹ partículas L ⁻¹	○ Tamaño hidrodinámico (promedio y distribución) ○ Carga superficial (potencial zeta) ○ Grado de dispersión ○ Concentración en número de partículas
MÉTODOS DE SEPARACIÓN NO CROMATOGRÁFICOS			
Ultracentrifugación	1 nm		○ Tamaño (promedio y distribución) ○ Estado de aglomeración/agregación ○ Velocidad de sedimentación
Ultrafiltración			○ Tamaño (promedio) ○ Detección de elemento disuelto/NP
Extracción en punto de nube (CPE)			○ Tamaño (promedio) ○ Detección de elemento disuelto/NP
Fraccionamiento en flujo mediante campo de sedimentación (SdFFF)	50 nm	ng L ⁻¹ -mg L ⁻¹ *	○ Tamaño (promedio y distribución) ○ Estado de aglomeración/agregación ○ Concentración en masa ○ Detección de elementos complejados/NP

Tabla 2 cont. Métodos analíticos y sus características para la caracterización de nanopartículas en muestras complejas.

Técnica	LOD tamaño	LOD concentración	Información analítica
MÉTODOS DE SEPARACIÓN NO CROMATOGRÁFICOS cont.			
Fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF ⁴)	1-5 nm	ng L ⁻¹ -µg L ⁻¹ *	○ Tamaño (promedio y distribución) ○ Estado de aglomeración/agregación ○ Concentración en masa ○ Detección de elementos complejados/NP
Electroforesis capilar (CE)	1-5 nm	ng L ⁻¹ -µg L ⁻¹ *	○ Tamaño (promedio y distribución) ○ Detección de elemento disuelto/NP ○ Concentración en masa
MÉTODOS DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICOS			
Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)	1 nm	µg L ⁻¹ *	○ Tamaño (promedio y distribución) ○ Estado de aglomeración/agregación ○ Detección de elemento disuelto/NP ○ Concentración en masa
Cromatografía hidrodinámica (HDC)	5 nm	µg L ⁻¹ *	○ Tamaño (promedio y distribución) ○ Estado de aglomeración/agregación ○ Detección de elemento disuelto/NP ○ Concentración en masa
Cromatografía en fase inversa (RPC)	1-5 nm	µg L ⁻¹ *	○ Tamaño (promedio y distribución) ○ Estado de aglomeración/agregación ○ Detección de elemento disuelto/NP ○ Concentración en masa

Tabla 2 cont. Métodos analíticos y sus características para la caracterización de nanopartículas en muestras complejas.

Técnica	LOD tamaño	LOD concentración	Información analítica
ESPECTROMETRÍA ATÓMICA			
Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)		ng L ⁻¹	○ Composición elemental/molecular ○ Concentración en masa
Detección individual de partículas mediante ICP-MS	10-20 nm NPs metálicas >100 nm NPs óxidos metálicos	10 ⁶ partículas L ⁻¹	○ Tamaño <i>core</i> (promedio y distribución) ○ Estado de aglomeración/agregación ○ Detección de elemento disuelto/NP ○ Concentración en masa ○ Concentración en número

*Rango que depende del detector (principalmente ICP-MS) al que se acople la técnica.

Sin embargo, estas técnicas no se pueden considerar como un referente para la cuantificación, debido al elevado número de partículas que se han de contar y dimensionar para obtener resultados estadísticamente significativos y representativos. Además, se trata de técnicas que requieren de mucho tiempo de análisis sino se dispone de un análisis de imagen automatizado (Howard, 2010).

Las modalidades más utilizadas son 1) la microscopía electrónica de transmisión (TEM, *Transmission Electron Microscopy*) que, con una resolución inferior a 1 nm, es utilizada para la caracterización de nanopartículas en matrices con diferentes grados de complejidad, y 2) la microscopía electrónica de barrido (SEM, *Scanning Electron Microscopy*) que ofrece una profundidad de campo con resoluciones más bajas, permitiendo el estudio de estructuras aglomeradas o su grado de aglomeración. Sin embargo, los procedimientos de preparación de la muestra en ambas técnicas (deposición de la gota seguida de la evaporación del disolvente, deposición por adsorción y recolección por ultracentrifugación) junto con las condiciones de alto vacío, necesarias para obtener una buena caracterización de las nanopartículas, pueden generar artefactos y alterar las propiedades físicas iniciales de las nanopartículas, principalmente su distribución de tamaño (López-Sanz *et al.*, 2019; Tiede *et al.*, 2009).

Con el objetivo de intentar solventar estos inconvenientes en la preparación de la muestra, la superficie de la rejilla, donde se deposita la muestra, puede funcionalizarse con una sustancia que le confiera una carga opuesta a la de las nanopartículas objeto de estudio (por ejemplo, poli-L-lisina para nanopartículas con carga negativa, o ligandos carboxilados en el caso de nanopartículas con carga positiva). De esta manera, se mejora la adhesión de las nanopartículas a la superficie de la rejilla, evitando así su agregación (Prasad *et al.*, 2015). Por otro lado, la evolución de estas técnicas tradicionales de microscopía electrónica hacia la microscopía electrónica de transmisión/barrido ambiental (ETEM, *Environmental Transmission Electron Microscopy* y ESEM, *Environmental Scanning Electron Microscopy*) y la microscopía electrónica de transmisión/barrido húmedo (Wet-TEM, *Wet Transmission Electron Microscopy* y Wet-SEM, *Wet Scanning Electron Microscopy*) ha contribuido a mejorar algunos de los problemas antes mencionados ya que, aunque presentan desventajas en cuanto a su resolución, permiten obtener imágenes de las nanopartículas en su estado original, bajo condiciones de humedad de hasta el 100% (Thiberge *et al.*, 2004; Tiede *et al.*, 2009).

1.1.2. Difracción de rayos-X

La difracción de rayos X (XRD, *X-Ray Diffraction*) es una de las técnicas más utilizadas para la caracterización de nanopartículas, debido a que proporciona información sobre la estructura cristalina, la naturaleza de la fase, los parámetros de red y el tamaño de grano cristalino (número de granos por unidad de área). Además, permite conocer la proporción de cada fase presente en la muestra a través del área de los picos obtenidos en el difractograma (Mourdikoudis *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2012).

Al igual que en las técnicas de microscopía electrónica, el proceso de secado de la muestra, necesario para su análisis por XRD, puede alterar las propiedades físicas originales de las nanopartículas. Para obtener información fiable sobre el tamaño de la partícula es necesario utilizar métodos de análisis adicionales, como TEM o SEM, dado que la información proporcionada por esta técnica surge de las propiedades estructurales de los dominios de los cristales y no necesariamente de toda la partícula. Asimismo, aunque esta técnica está limitada a la caracterización de nanopartículas puras (prístina) o aisladas, es adecuada para la caracterización de nanopartículas cristalinas tanto de naturaleza inorgánica como orgánica (Hassellöv *et al.*, 2008; Laborda y Bolea, 2018).

1.1.3. Métodos de dispersión de luz

Los métodos de dispersión de luz proporcionan información sobre dos importantes parámetros fisicoquímicos de las nanopartículas en suspensiones acuosas: el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta. El diámetro hidrodinámico depende del tamaño del núcleo de las nanopartículas y de su recubrimiento superficial. Su medida se basa en el movimiento Browniano de las nanopartículas y en la dispersión de la luz, así como en la aplicación de la ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación 1) para relacionar la difusión con el tamaño (Brar y Verma, 2011; Mourdikoudis *et al.*, 2018). Por su parte, el potencial zeta hace referencia a la diferencia de potencial entre el medio de suspensión y la capa estacionaria del fluido unida a las nanopartículas dispersadas. Este parámetro se deduce a partir de la movilidad electroforética de las nanopartículas en un campo eléctrico, y su medida facilita información sobre la carga superficial de las nanopartículas, su estabilidad a largo tiempo y, por tanto, su grado de agregación en la suspensión. Generalmente, valores de potencial zeta superiores a ± 30 mV confieren estabilidad a las suspensiones mediante repulsiones electrostáticas, mientras que a potenciales inferiores

la atracción supera a la repulsión y, las nanopartículas pueden aglomerarse. En cualquier caso, este parámetro depende de la composición, la fuerza iónica y el pH del medio de suspensión (Baldassarre *et al.*, 2015; Laborda y Bolea, 2018; Titus *et al.*, 2019).

$$D = \frac{k_B T}{6\pi \eta d_h} \quad (1)$$

Donde D es el coeficiente de difusión de las partículas, k_B la constante de Boltzman, T la temperatura, η la viscosidad dinámica del fluido y d_h el diámetro hidrodinámico.

Entre las diferentes técnicas de dispersión de luz, la dispersión dinámica de luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*) es ampliamente utilizada para el análisis del tamaño hidrodinámico de la partícula y la determinación del potencial zeta. Aunque la rapidez y la sencillez de su funcionamiento, así como la mínima perturbación que ejerce sobre la muestra le otorgan ciertas ventajas, esta técnica suele limitarse al análisis de muestras monodispersas. La presencia de otras partículas distintas a las de interés o las muestras que contienen partículas con distribuciones de tamaño heterogéneas, como ocurre generalmente en todas las muestras medioambientales o biológicas, pueden sesgar el tamaño medido al ser la técnica incapaz de detectar la presencia de partículas más pequeñas entre las grandes, como consecuencia de la fuerte influencia del tamaño de la partícula sobre la luz dispersada. Por tanto, en muestras polidispersas, el DLS debe combinarse con una técnica de separación para mejorar la fiabilidad de la caracterización del tamaño. A pesar de estas limitaciones para determinar el tamaño hidrodinámico de las nanopartículas en matrices complejas, esta técnica es muy válida para monitorizar los comportamientos de agregación a través del potencial zeta (Brar y Verma, 2011; Kato, 2012). El análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA, *Nanoparticle Tracking Analysis*) es otra técnica de dispersión de luz relativamente novedosa, que incorpora un microscopio con cámara de video permitiendo así visualizar las nanopartículas como puntos de dispersión de luz. Esta técnica no solo consigue solventar los problemas del DLS, en cuanto a la medida del tamaño hidrodinámico en suspensiones polidispersas, sino que también proporciona información sobre la concentración en número de las nanopartículas presentes en la muestra. La técnica exhibe una elevada sensibilidad en términos de concentración en número, una mínima perturbación de la muestra y distribuciones de tamaño fiables en presencia de grandes partículas o agregados, siendo

los resultados fiables para partículas con diámetros hidrodinámicos superiores a 20 nm (Filipe *et al.*, 2010; Gallego-Urrea *et al.*, 2011).

1.1.4. Métodos de separación

La concentración de nanopartículas en muestras complejas, como las medioambientales y biológicas, cabe esperar que sean inferiores a las que pueden medirse directamente en las nanopartículas recién sintetizadas, y al mismo tiempo, puede que sea necesario eliminar los componentes de la matriz. En consecuencia, el análisis de nanopartículas requiere en muchos casos una separación previa de las partículas que, aunque mayoritariamente se realiza en función de su tamaño, también puede llevarse a cabo en base a otras propiedades como su superficie, densidad o carga, para lograr, en cualquier caso, la selectividad y sensibilidad requeridas. En este sentido, los métodos no cromatográficos y cromatográficos de separación constituyen una buena herramienta para la separación de nanopartículas por tamaños, diferenciación entre material nanoparticulado y disuelto, separación de las nanopartículas de otros componentes de la matriz y preconcentración de nanopartículas. Asimismo, los detectores a los que se pueden acoplar estas técnicas son muy variados, destacando los detectores de UV-Vis e ICP-MS, siendo este último el de elección en el caso de nanopartículas constituidas por metales y/o metaloides.

1.1.4.1. Métodos no cromatográficos

Los métodos no cromatográficos más empleados en el campo de análisis de nanopartículas son: la centrifugación, la ultracentrifugación, la filtración, la ultrafiltración, la diálisis, la extracción en punto de nube (CPE, *Cloud Point Extraction*), el fraccionamiento de flujo de campo (FFF, *Field Flow Fractionation*), la electroforesis en gel (GE, *Gel Electrophoresis*) y la electroforesis capilar (CE, *Capillary Electrophoresis*).

La centrifugación tradicional se puede considerar el método más sencillo para aislar las nanopartículas de una suspensión acuosa, pudiendo obtener información sobre la distribución de tamaño. Sin embargo, no se considera un método eficiente para el fraccionamiento de nanopartículas por la posible presencia de sólidos no deseados aislados junto con las nanopartículas, a pesar de utilizar fuerzas centrífugas elevadas y tiempos prolongados. Este método ha demostrado ser útil para el aislamiento de especies disueltas, como en el caso de elementos unidos a compuestos de alto peso molecular

entre los que se encuentran la materia orgánica disuelta o las proteínas (Tsao *et al.*, 2011; Unrine *et al.*, 2012).

En la ultracentrifugación se fracciona la muestra según el comportamiento de sedimentación de las especies presentes, lo cual depende del tamaño, la forma y la densidad de las nanopartículas. Así, este método proporciona información sobre la distribución de tamaño y densidad de las nanopartículas. Sin embargo, la interpretación de los datos y la conversión de los parámetros de sedimentación en información sobre el tamaño y la forma no es trivial, y puede verse afectada por factores como la concentración de la muestra o las interacciones de las nanopartículas con los componentes de la matriz de la muestra (Carney *et al.*, 2011; Krpeti *et al.*, 2013; Laborda y Bolea, 2018; Modena *et al.*, 2019).

Aunque la filtración ya no se acepta como un método para distinguir las fracciones disueltas de las nanoparticuladas, se está utilizando la filtración en serie, normalmente combinada con la ultrafiltración, para el fraccionamiento por tamaños (Mitrano *et al.*, 2014).

Por su parte, la ultrafiltración y la diálisis se basan en el empleo de membranas nanoporosas de diferentes materiales y distintos tamaños de corte, estando disponibles en el mercado membranas con un tamaño de poro como mínimo de 3kDa, que equivalen a un tamaño de corte de entorno a los 2 nm. La acción de la fuerza centrífuga, para la ultrafiltración, y de la presión osmótica, en el caso de la diálisis, permite que las especies de tamaño y/o masa molecular inferior al tamaño de poro de la membrana pasen a su través. Sin embargo, dependiendo de la composición y las características de la superficie de la membrana, las nanopartículas y las correspondientes especies disueltas pueden interaccionar con la superficie de las membranas y afectar a su recuperación. La capacidad de aislar la fracción nanoparticulada de la fracción disuelta hace que ambos métodos sean utilizados para estudiar la solubilidad de las nanopartículas, principalmente en las de naturaleza inorgánica, llevar a cabo su purificación y modificar el disolvente en el que se encontraban dispersadas (Ke *et al.*, 2020; Markus *et al.*, 2018; Odzak *et al.*, 2014; Picó, 2016).

La extracción en punto de nube (CPE) está creciendo en popularidad en los últimos años al tratarse de una metodología de microextracción en fase líquida de bajo coste, y

respetuosa con el medioambiente. Aunque su fundamento es similar al de la extracción líquido-líquido, en este caso se lleva a cabo la adición de un surfactante, generalmente de naturaleza no iónica, a una concentración superior a su concentración micelar crítica. Cuando la temperatura de la disolución se encuentra por encima de la temperatura de punto de nube del surfactante, la fase rica en el surfactante y la fase rica en el disolvente se separan, quedando las nanopartículas en la primera de ellas. De esta manera, la CPE no solo se utiliza como método de separación de la fracción nanoparticulada, sino también como método de preconcentración de nanopartículas, cuando su concentración es muy baja (El Hadri y Hackley, 2017; Torrent *et al.*, 2019). La principal desventaja de este método reside en su optimización debido al elevado número de parámetros que influyen en el desarrollo del proceso (pH, tipo de surfactante y su concentración, temperatura, tiempo de extracción, etc.) y que puede minimizarse utilizando metodologías de diseño experimental y optimización.

El fraccionamiento de flujo de campo (FFF) es una familia de técnicas analíticas que se desarrolló para la separación y caracterización de materiales que van desde las macromoléculas hasta nanopartículas (macromoléculas, conjuntos supramoleculares, coloides y (nano)partículas). La separación tiene lugar en una canal delgado y alargado sin fase estacionaria, provocada por la acción de un campo externo aplicado perpendicularmente a un flujo laminar (Figura 1) (Contado, 2017).

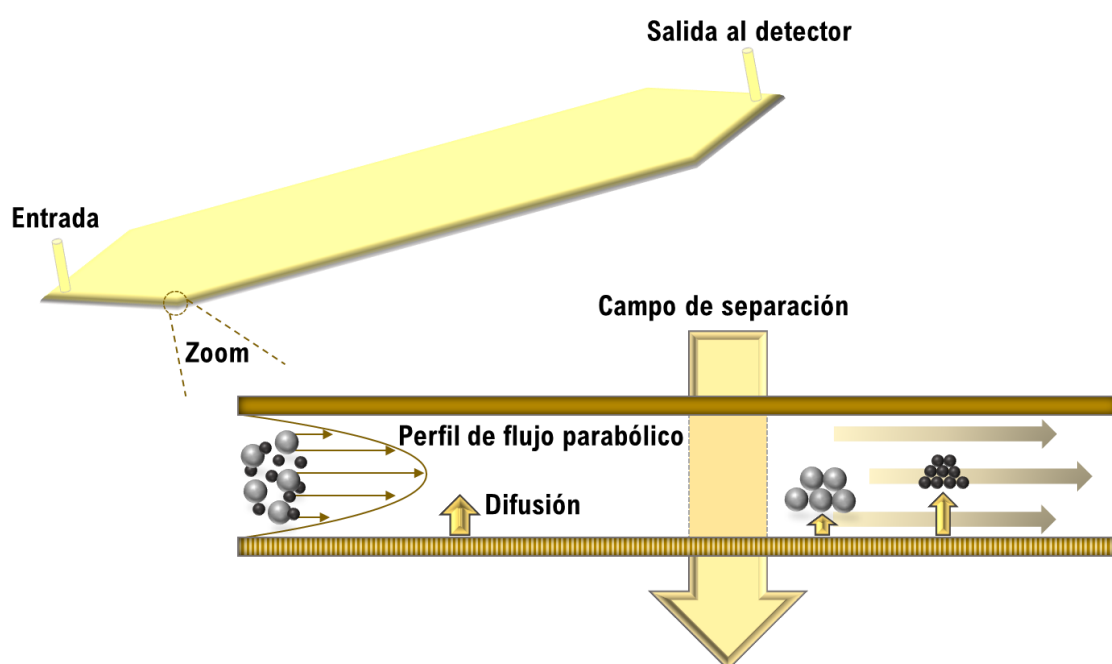


Figura 1. Esquema simplificado del proceso de separación que tiene lugar en un canal de FFF.

La naturaleza del campo/gradiente externo aplicado ha permitido el desarrollo de diferentes subtécnicas: FFF térmica (ThFFF, *Thermal Field Flow Fractionation*) emplea gradientes de temperatura, FFF eléctrica (ElFFF, *Electrical Field Flow Fractionation*) utiliza el potencial eléctrico, FFF de flujo (FiFFF, *Flow Field Flow Fractionation*) aplica un flujo transversal o cruzado, FFF de sedimentación, ahora conocida como FFF de centrifugación (antes SdFFF, y ahora CFFF, *Centrifugal Field Flow Fractionation*) se ayuda de la fuerza centrífuga, FFF gravitacional (GrFFF, *Gravitational Field Flow Fractionation*) utiliza la fuerza gravitacional, FFF dielectroforética (DEP-FFF, *Dielectrophoretic Field Flow Fractionation*) hace uso de la fuerza dielectroforética, FFF acústica (AcFFF, *Acoustic Field Flow Fractionation*) aplica la onda acústica estacionaria y FFF magnética (MgFFF, *Magnetic Field Flow Fractionation*) hace uso del campo magnético. De entre todas estas subtécnicas, una variante del FiFFF, denominada de flujo asimétrico (AF⁴ o AsFiFFF, *Asymmetric Flow Field Flow Fractionation*) es considerada la más universal dado que el flujo cruzado aplicado afecta a todas las especies inyectadas y, por tanto, se puede emplear tanto a la separación de polímeros y macromoléculas, como a (nano)partículas. En AF⁴ el campo externo aplicado es un flujo secundario, conocido como flujo cruzado o *cross flow*, perpendicular al flujo portador del sistema que circula en régimen laminar a través del canal de separación. La retención tiene lugar por el equilibrio entre la fuerza del campo generado y la fuerza opuesta ejercida por las partículas. El campo externo lleva las partículas hacia la base del canal, donde se encuentra una membrana semipermeable colocada sobre un soporte poroso que permite la circulación del flujo cruzado, desde donde las partículas se desplazan en sentido opuesto al campo aplicado. La membrana en AF⁴ es una membrana de ultrafiltración, que permite el paso del flujo cruzado, evitando al mismo tiempo que las partículas y las nanopartículas se filtren a su través. La elución puede producirse bajo un modo normal o bajo un modo estérico, dependiendo fundamentalmente del tamaño de partícula y el grado de polidispersidad de la muestra. En el caso de las nanopartículas, por regla general predomina el modo de elución normal, donde las partículas de menor tamaño son las primeras en eluir, al ser un proceso controlado por fenómenos de difusión (Contado, 2017; Kim *et al.*, 2018; Laborda *et al.*, 2016a; Schimpf *et al.*, 2000).

La separación de nanopartículas mediante AF⁴ requiere de la optimización de una serie de parámetros, que afectan al fraccionamiento y dependen de la naturaleza de las nanopartículas objeto de estudio. Estos parámetros son 1) la membrana (material y tamaño de poro o corte), 2) las dimensiones del canal de elución, 3) la composición de la

fase móvil, 4) el caudal del flujo cruzado y del flujo portador, 5) la temperatura y 6) la masa inyectada y el tiempo de inyección (Moreno-Martin *et al.*, 2017). Uno de los parámetros que permite establecer la eficacia de la separación en AF⁴ es la recuperación del analito, basada en la relación entre la cantidad de analito eluido y la cantidad de analito inyectado. A pesar de estas dificultades, el amplio intervalo de tamaños abarcado por el AF⁴, limitado por el corte de la membrana de ultrafiltración (generalmente de 1 a 10 kDa), junto con la separación basada exclusivamente en las diferencias de tamaño hidrodinámico de las nanopartículas, han convertido a esta subtécnica de FFF en la más utilizada para la separación y caracterización de nanopartículas en muestras complejas. Asimismo, el papel que desempeña la membrana permitiendo el paso de las especies iónicas a su través, hace que esta técnica puede utilizarse para eliminar la fracción disuelta y aislar así las nanopartículas antes de su análisis y caracterización (Grombe *et al.*, 2014; Hetzer *et al.*, 2017; López-Heras *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2020). Una de las grandes ventajas que presenta esta técnica con respecto a las de separación cromatográfica, que veremos posteriormente, es que al no tener fase estacionaria se evitan las interacciones de las partículas con la misma preservándose las características originales de las nanopartículas (Contado, 2017).

Para determinar el tamaño hidrodinámico de las nanopartículas a través de esta técnica, se pueden utilizar dos enfoques diferentes, ambos basados en la caracterización del coeficiente de difusión, parámetro que viene definido por el tamaño de las partículas. El primero de estos enfoques consiste en utilizar estándares certificados en tamaño con el fin de calibrar la relación tiempo de retención-tamaño para unas condiciones de flujo específicas. Una práctica común para calibrar la difusión es el empleo de esferas de poliestireno o de nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos bien caracterizadas y disponibles en el mercado, en las que se supone que la interacción entre la membrana y este calibrante, y entre la membrana y las nanopartículas, cuyo tamaño se quiere determinar, es similar en función de la carga superficial en una fuerza iónica conocida. Sin embargo, aunque las propiedades superficiales del calibrante y de las nanopartículas objeto de estudio sean similares, se ha demostrado que la composición de las nanopartículas contribuye en gran medida a su retención en el canal, pudiendo dar lugar a una determinación inexacta de su difusión y, por tanto, de su tamaño. El segundo enfoque utilizado para determinar el tamaño hidrodinámico de las nanopartículas se basa en aplicar la teoría de FFF, a través de la cual el tiempo de retención de estas partículas

se puede relacionar con su tamaño, tal y como muestra la Ecuación 2, siempre que la viscosidad de la fase móvil, el espesor del canal y los caudales sean conocidos (Baalousha *et al.*, 2011; Moreno-Martin *et al.*, 2017).

$$t_R = \frac{\omega^2 \pi \eta d_h}{2k_B T} \ln \left(1 + \frac{V_{cross}}{V_p} \right) \quad (2)$$

Donde t_R es el tiempo de retención, ω el espesor del canal, η la viscosidad de la fase móvil, d_h el diámetro hidrodinámico, k_B la constante de Boltzmann, T la temperatura, V_{cross} el flujo cruzado y V_p el flujo del canal.

De la técnica AF⁴ también cabe destacar su versatilidad para ser acoplada a una gran variedad de detectores, siendo los más comunes UV-Vis, MALS, DLS, NTA e ICP-MS. En el caso del ICP-MS también se puede emplear en modo de detección de partículas individuales, lo que ha permitido llevar a cabo la separación, caracterización y cuantificación de diferentes nanopartículas metálicas, de óxidos metálicos y de metaloides en muestras complejas tanto de naturaleza biológica como medioambiental (Bednar *et al.*, 2013).

Finalmente, dentro de este grupo de métodos no cromatográficos caben destacar las técnicas electroforéticas, concretamente la GE y la CE, basadas en la migración de especies bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado. Aunque ambas son utilizadas para la caracterización fisicoquímica de las nanopartículas en cuanto a movilidad electroforética, tamaño y distribución de cargas, potencial zeta, funcionalización de la superficie y estabilidad coloidal, la CE proporciona una mejor eficacia de separación y análisis de nanopartículas. La ventaja de utilizar esta técnica de separación con respecto a otras es su elevada resolución y su capacidad de analizar tanto la fracción disuelta como la fracción nanoparticulada. Sin embargo, las diferentes características de la superficie de las nanopartículas en los estándares y en las muestras, pueden modificar las interacciones de las partículas con el surfactante y provocar comportamientos de migración incoherentes. Por tanto, se debe tener especial cuidado en el caso de muestras complejas, como son las de naturaleza biológica y medioambiental, donde la interacción con otras macromoléculas puede modificar la superficie de carga de las nanopartículas y alterar los tiempos de elución y la resolución de los picos (Kruszewska *et al.*, 2020; Mudalige *et al.*, 2018; Qu *et al.*, 2017; Trapiella-Alfonso *et al.*, 2016).

1.1.4.2. Métodos cromatográficos

Dentro de los métodos cromatográficos, la cromatografía de líquidos se ha hecho un hueco en la caracterización de nanopartículas, al permitir su separación en base al tamaño y forma, así como su aislamiento de la fracción disuelta. La cromatografía de exclusión por tamaños (SEC, *Size Exclusion Chromatography*), la cromatografía hidrodinámica (HDC, *Hydrodynamic Chromatography*), y la cromatografía en fase inversa (RPC, *Reversed- Phase Chromatography*) se encuentran entre los métodos más comúnmente utilizados (Laborda *et al.*, 2016a; Liu, 2009; López-Sanz *et al.*, 2019).

La SEC utiliza columnas con partículas porosas, de manera que las nanopartículas son retenidas en función de su tamaño y forma. Las interacciones de las nanopartículas con la fase estacionaria podrían limitar su aplicabilidad al producir separaciones inadecuadas. En el caso de la HDC, las columnas están rellenas por partículas no porosas y la separación se basa únicamente en el tamaño hidrodinámico de las partículas, abarcando un amplio rango de tamaños desde moleculares hasta partículas de tamaño micrométrico. Aunque esta técnica evita las interacciones con la fase estacionaria, otros factores podrían afectar a la velocidad de transporte de las nanopartículas a través de la columna. La RPC, de reciente aplicación en la caracterización de nanopartículas, ha permitido separar las nanopartículas de distinto tamaño, así como la fracción disuelta, a pesar de que el mecanismo de separación está basado en la adsorción/reparto del analito entre la fase móvil y la fase estacionaria (Kruszewska *et al.*, 2020; Laborda y Bolea, 2018; López-Sanz *et al.*, 2017; Sötebier *et al.*, 2016; Wei, 1999).

Los métodos cromatográficos y no cromatográficos, descritos en este apartado, han demostrado ser adecuados para la separación de nanopartículas en función de su tamaño, superficie, densidad y características de carga. Asimismo, para la resolución de escenarios complejos, su acoplamiento con diferentes sistemas de detección sensibles y selectivos pueden proporcionar una base sólida para intentar dar solución a este tipo de escenarios. Aunque entre los sistemas de detección más utilizados se encuentran UV-Vis, DLS o fluorescencia, las limitaciones se hacen evidentes cuando se lleva a cabo el análisis de nanopartículas a concentraciones muy pequeñas en muestras complejas, como aquellas que provienen de sistemas medioambientales o biológicos. El sistema de detección más adecuado para la determinación de nanopartículas que contienen metales y/o metaloides es la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-

MS, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) por sus excelentes propiedades analíticas de sensibilidad y selectividad.

1.1.5. Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo para el análisis de nanopartículas utilizando el modo de detección de partículas individuales

En los últimos años, el uso del ICP-MS en modo de detección de partículas individuales (spICP-MS, *Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) para la caracterización de nanopartículas ha ganado en popularidad al combinar las ventajas de una técnica de alta especificidad y selectividad para la detección de metales y metaloides, con las de una técnica de recuento de partículas, en la que las medidas se realizan partícula a partícula. Esto permite detectar y cuantificar tanto formas disueltas como (nano)particuladas del elemento en la misma muestra, proporcionando así información sobre sus propiedades fisicoquímicas (Laborda y Bolea, 2018).

Aunque esta técnica, spICP-MS, fue utilizada por Degueldre y Favarger (Degueldre y Favarger, 2003) a principios del 2000 para el análisis de suspensiones coloidales y micropartículas, no fue hasta el 2010 cuando se produjo su consolidación, al demostrarse su aplicación en el análisis de nanopartículas sintéticas (Laborda *et al.*, 2011; Pace *et al.*, 2011).

La elevada aplicabilidad de spICP-MS reside fundamentalmente en la posibilidad de realizar el análisis con cualquier instrumento ICP-MS disponible en el mercado, y en la variedad de información que se puede conseguir de una forma relativamente sencilla. Además, mientras que el ICP-MS en su modo de operación convencional solo proporciona información sobre la composición elemental y la concentración en masa de los elementos presentes en una muestra que contiene nanopartículas, spICP-MS permite obtener información tanto cualitativa como cuantitativa sobre: 1) la presencia de formas particuladas y/o disueltas, 2) el tamaño medio y la distribución de tamaño de las partículas, siempre que su composición, morfología y densidad sean conocidas, así como del contenido y la distribución en masa del elemento por partícula, y 3) la concentración en número de partículas (partículas L^{-1}) y en masa ($ng\ L^{-1}$) de la forma disuelta y de la forma particulada (Abad-Álvaro *et al.*, 2016; Laborda *et al.*, 2016b).

La técnica spICP-MS se basa fundamentalmente en el distinto comportamiento que presenta el analito en el plasma cuando se encuentra en forma disuelta o en forma

nanoparticulada. Las formas solubles del analito se distribuyen de forma homogénea en la disolución y, por tanto, en las gotas del aerosol originando una señal constante durante el tiempo de adquisición (siempre y cuando la masa del elemento que entra en el plasma por unidad de tiempo y que llega al detector en forma de iones, sea constante). Por el contrario, si se nebuliza una suspensión de nanopartículas, el elemento no se distribuye homogéneamente, sino que está presente como un grupo discreto de átomos y solo en una pequeña fracción de gotas. De esta manera, si una suspensión de nanopartículas suficientemente diluida se introduce en el plasma, se generará un paquete de iones que serán detectados por el espectrómetro como un pulso o evento (Laborda *et al.*, 2016b).

La clave para trabajar con splCP-MS consiste en emplear suspensiones de partículas con concentraciones en número suficientemente bajas y utilizar frecuencias de adquisición de datos lo bastante altas para conseguir que las partículas individuales se registren como eventos discretos sobre una línea continua. Esta línea continua denominada línea base o *background*, suele estar relacionada con las posibles interferencias originadas por especies poliatómicas procedentes del plasma y/o la matriz; la presencia de especies disueltas del elemento medido en la muestra; y/o una combinación de ambas (Abad-Álvaro *et al.*, 2016). De esta forma, el número de eventos es proporcional a la concentración en número de las partículas en suspensión, mientras que la intensidad de cada evento es proporcional a la masa del elemento por partícula, que a su vez se puede relacionar con el tamaño de la partícula si la forma, la composición y la densidad de las partículas son conocidas (Torrent *et al.*, 2019).

La frecuencia en la adquisición de datos es otro parámetro a tener en cuenta a la hora de seleccionar las concentraciones en número de partículas que se vayan a analizar, dado que se debe evitar la aparición de eventos múltiples, es decir, aquellos debidos a dos o más partículas, que suelen aparecer cuando se trabaja con concentraciones demasiado elevadas. Por otro lado, en el caso de los espectrómetros de masas de cuadrupolo, la frecuencia de adquisición está directamente controlada por el tiempo de lectura (*dwell time*), que se puede definir como el tiempo de adquisición de una masa específica, y por el tiempo de asentamiento (*settling time*), entendiéndose como el tiempo dedicado a la estabilización del cuadrupolo una vez cambia de una masa a otra. Además, esta frecuencia también estaría limitada indirectamente por la transmisión y el almacenamiento de datos del instrumento al ordenador (Laborda *et al.*, 2011). Hoy en día,

se pueden encontrar instrumentos con tiempos de lectura que abarcan desde los milisegundos hasta los microsegundos. Asimismo, este parámetro también condiciona la concentración de nanopartículas que se va a analizar. Por ejemplo, con tiempos de lectura en el rango de los milisegundos, comprendidos entre 3 y 10 ms, se recomienda utilizar suspensiones con una concentración en número por debajo de 10^8 partículas L^{-1} , para evitar la medida simultánea de dos o más partículas. Sin embargo, cuando se emplean tiempos de lectura del orden de los microsegundos se puede trabajar con concentraciones en número de partícula más elevadas, lo que evita la aparición de eventos múltiples y los errores asociados a los factores de dilución muy elevados, haciendo que los análisis sean más precisos. Además, la presencia de especies disueltas o la señal de fondo tienen una menor influencia sobre los límites de detección cuando se trabaja con estos tiempos de lectura del orden de los microsegundos. Otra de las diferencias que cabe destacar entre los dos rangos de tiempo de lectura es que las partículas se registran como pulsos o como señales transitorias dependiendo de si se trabaja en milisegundos o microsegundos, respectivamente (Abad-Álvaro *et al.*, 2016). Asimismo, trabajar con tiempos de lectura del orden de los microsegundos permite analizar de manera simultánea varios elementos o isótopos siempre y cuando se utilicen analizadores de masas de tiempo de vuelo (TOF-MS, *Time-Of-Flight Mass Spectrometry*) y no analizadores de masas de tipo secuencial (cuadrapolos, sectores de campo eléctrico/magnético) (Rodríguez *et al.*, 2020).

Las señales en spICP-MS se registran durante un tiempo determinado, obteniendo barridos temporales que consisten en un número de eventos, registrados como señales transitorias o pulsos, por encima de una línea de base constante (Figura 2(a)). Estos barridos temporales en bruto se pueden representar en forma de histograma (Figura 2 (b)) teniendo en cuenta el número de eventos y la intensidad de los mismos. El histograma obtenido se caracteriza por presentar dos distribuciones, donde la primera de ellas se debe a la señal de fondo (interferencias y/o presencia de especies disueltas) mientras la segunda distribución es la propiamente debida a las (nano)partículas. Asimismo, estos histogramas son de gran utilidad a la hora de establecer el límite o *threshold* (Figura 2 (b)) que permite diferenciar la distribución debida a las partículas de la distribución originada por la línea base (Laborda *et al.*, 2014).

En el procesamiento de la señal obtenida tras el análisis por spICP-MS, se deben discriminar los eventos correspondientes a las partículas de los procedentes de la línea

base, tal y como se ha comentado anteriormente. Cuando los eventos de las partículas se registran como pulsos, el uso de un criterio de umbral relacionado con la línea de base es imprescindible. Este criterio consiste en aplicar un múltiplo de la desviación estándar de la línea base, que normalmente suele ser 3σ o 5σ , siendo σ la desviación estándar de la línea base, aunque otros autores han aplicado coeficientes desde 3 hasta 8. En el caso de que los eventos de partículas se registren como señales transitorias, se suelen utilizar enfoques similares a los aplicados a la detección de picos cromatográficos (Laborda *et al.*, 2020).

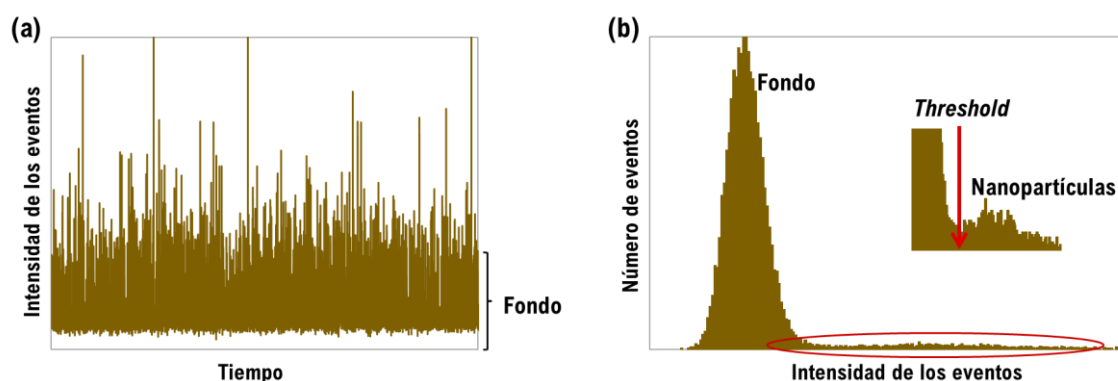


Figura 2. (a) Barridos temporales obtenidos con spICP-MS para una suspensión de nanopartículas que contiene formas disueltas del elemento que compone las nanopartículas. (b) Histograma de frecuencia de las intensidades frente a la intensidad de los eventos que se obtiene al procesar los datos en bruto (a).

Una vez procesadas las señales, para calcular la concentración en número de partícula y el tamaño de partícula se aplican una serie de ecuaciones matemáticas, que se encuentran fundamentadas en las bases teóricas de spICP-MS, establecidas por Degueldre y Favarger (Degueldre *et al.*, 2006a, 2006b; Degueldre y Favarger, 2004, 2003) y resumidas por Laborda *et al.* (Laborda *et al.*, 2016b, 2014, 2013). Si se considera cierta la suposición de que cada evento registrado representa una sola partícula, entonces el número de eventos contados (n_p) durante un tiempo de adquisición (t_i) está directamente relacionado con el número de partículas (C_p), a través de la Ecuación 3:

$$n_p = \eta_{neb} Q_{sam} t_i C_p \quad (3)$$

Donde η_{neb} es la eficiencia de nebulización y Q_{sam} es el caudal de introducción de la muestra.

Por otro lado, la intensidad de cada evento (I_p) es proporcional al número de átomos del elemento monitorizado en cada partícula detectada y, por tanto, a la masa del elemento por partícula (m_p), tal y como se recoge en la Ecuación 4:

$$I_p = K_{ICPMS} K_M m_p \quad (4)$$

Donde K_{ICPMS} es la eficiencia de detección, relación entre el número de iones detectados y el número de átomos introducidos en el ICP. K_M es un factor que está relacionado con la abundancia atómica del isótopo monitorizado (A), el número de Avogadro (N_{AV}) y la masa atómica del elemento (M_m) a través de la Ecuación 5:

$$K_M = AN_{AV}/M_m \quad (5)$$

El tamaño de la partícula conocida su composición, forma y densidad puede relacionarse con la Ecuación 3. En el caso de nanopartículas esféricas y homogéneas, la Ecuación 4 se puede transformar en la Ecuación 6 para calcular el tamaño de partícula:

$$I_p = \frac{1}{6} \pi \rho X_p K_{ICPMS} K_M d^3 \quad (6)$$

Donde d es el diámetro, ρ la densidad y X_p la fracción de masa del elemento en la partícula.

El análisis de partículas individuales depende, como ya se ha comentado, de dos factores 1) el número de eventos, y 2) la intensidad de dichos eventos, que debe ser lo suficientemente grande como para generar pulsos discretos. De acuerdo con esto, si el criterio aplicado para discriminar las partículas de la línea base garantiza que no se detectan partículas en el blanco, el recuento de eventos de partículas en la muestra se puede asimilar a una distribución ideal de Poisson, en la que el valor crítico es 0 y el valor mínimo de detección puede redondearse a 3 eventos de partículas. De esta manera, el límite de detección en concentración en número (LOD_{number}) se podría calcular mediante la Ecuación 7.

$$LOD_{number} = \frac{3}{\eta_{neb} Q_{sample} t_i} \quad (7)$$

En el caso de que se detecten partículas en el blanco y la señal se registre en forma de pulsos, el LOD_{number} se debe calcular a partir de la Ecuación 8.

$$LOD_{number} = \frac{2,33\sigma_{N,B}}{\eta_{neb} Q_{sample} t_i} \quad (8)$$

Donde $\sigma_{N,B}$ es la desviación estándar del número de pulsos de partículas en el blanco.

Por otro lado, si de nuevo se registra la señal en forma de pulsos, la altura del pulso más pequeña que se puede distinguir de la línea base determinará la masa de la partícula más pequeña y, a su vez, el tamaño de nanopartícula más pequeño que se puede detectar. En este sentido, el límite de detección de tamaño (LOD_{size}) se puede establecer a través de la Ecuación 9.

$$LOD_{size} = \left(\frac{30\sigma_B}{\pi\rho X_p K_{ICPMS} K_M} \right)^{1/3} \quad (9)$$

Donde σ_B , es la desviación estándar de la línea base de la señal del blanco. Esta ecuación se utiliza cuando el criterio seleccionado es 5σ . Si, por el contrario, se escoge el criterio 3σ , la Ecuación 9 permitiría calcular el LOD_{size} sustituyendo el $30\sigma_B$ por $18\sigma_B$ (Laborda *et al.*, 2020, 2014).

En base a esto, cuando las medidas por spICP-MS dan lugar a un número de pulsos no significativos sobre la línea base, muchos autores consideran que spICP-MS se debe utilizar como una herramienta de *screening* dado que las concentraciones en número se subestiman y se obtiene una información limitada del tamaño/masa por partícula. Laborda *et al.*, 2019 llevaron a cabo la evaluación y validación de spICP-MS como método de *screening* para la detección de (nano)partículas en suspensiones y productos alimenticios.

En la Tabla 3 se recogen las aplicaciones de los diferentes métodos descritos en este Apartado 1.1. para la caracterización y determinación de nanopartículas en muestras medioambientales.

Tabla 3. Aplicaciones para la caracterización y determinación de nanopartículas en muestras medioambientales.

NPs	Muestra	Preparación de muestra	Técnica	Información analítica	Referencia
TiO₂	Aguas de lago		○ splICP-MS	○ Tamaño	(Gondikas <i>et al.</i> , 2014)
Ag	Aguas de lago		○ ICP-MS ○ splICP-MS ○ AF ⁴ -UV-Vis ○ TEM	○ Composición elemental ○ Concentración en masa ○ Concentración en número ○ Tamaño	(Aznar <i>et al.</i> , 2017)
ZnO	○ Aguas de río ○ Aguas de lago		○ AF ⁴ -UV-Vis ○ DLS ○ TEM ○ XRD	○ Estado de agregación/ aglomeración ○ Concentración en masa ○ Estructura cristalina	(Amde <i>et al.</i> , 2019)
Au	Sedimento	Ultracentrifugación	○ ESEM ○ TEM ○ NTA	○ Tamaño	(Luo <i>et al.</i> , 2013)
Ag	Suelos	Filtración (0,45 µm + 0,22 µm)	○ ICP-MS ○ splICP-MS	○ Tamaño ○ Concentración en masa ○ Concentración en número	(Schwertfeger <i>et al.</i> , 2017)
ZnO NiO CeO₂ CoO CuO	Aguas residuales	Ultrafiltración	○ SEC-ICP-MS ○ DLS ○ TEM	○ Tamaño ○ Carga superficial ○ Concentración en masa	(Zhou <i>et al.</i> , 2016)

Tabla 3 cont. Aplicaciones para la caracterización y determinación de nanopartículas en muestras medioambientales.

NPs	Muestra	Preparación de muestra	Técnica	Información analítica	Referencia
Au	Suelos	CPE	○ ICP-MS ○ splICP-MS ○ AF⁴-ICP-MS ○ AF⁴-UV-Vis	○ Tamaño ○ Concentración en masa ○ Concentración en número	(El Hadri y Hackley, 2017)
Au	○ Aguas de grifo ○ Aguas de lago ○ Influyente (agua residual) ○ Efluente (agua residual)		○ ICP-MS ○ RP-ICP-MS	○ Tamaño ○ Concentración en masa	(Yang <i>et al.</i> , 2018)
CeO₂	Rábanos	Extracción enzimática	○ splICP-MS ○ LA-ICP-MS	○ Tamaño ○ Concentración en masa ○ Concentración en número ○ Distribución espacial	(Wojcieszek <i>et al.</i> , 2019)
TiO₂	Suelos		○ HDC-ICP-MS ○ TEM ○ SEM	○ Tamaño ○ Composición elemental	(Philippe <i>et al.</i> , 2018)
TiO₂	Sedimento		○ SdFFF-ICP-MS ○ SEM	○ Concentración en masa ○ Composición elemental	(Dutschke <i>et al.</i> , 2017)

1.2. **Metodologías analíticas para evaluar la biotransformación de nanopartículas**

En el apartado anterior se ha realizado una descripción de algunas de las técnicas y métodos utilizados para la caracterización de nanopartículas, en base a sus propiedades fisicoquímicas (composición, tamaño, densidad, carga superficial, etc.). Sin embargo, cuando entran en contacto con sistemas biológicos y compartimentos medioambientales las nanopartículas pueden transformarse a otras especies (formas iónicas, nanopartículas de diferente composición, complejos inorgánicos, compuestos organometálicos, especies volátiles, etc.). En consecuencia, para establecer las transformaciones y el impacto real de las nanopartículas, una vez que entran en contacto con los sistemas biológicos y medioambientales, es necesario incorporar al estudio otro tipo de técnicas que nos permitan establecer las formas químicas a las que se han transformado las nanopartículas originales.

Unas de las metodologías más útiles para abordar el estudio de las transformaciones de las nanopartículas metálicas/metaloideas y de óxidos metálicos son las empleadas en los estudios de especiación de elementos traza. Tradicionalmente, la especiación de compuestos metálicos y/o metaloides se ha llevado a cabo mediante el acoplamiento de técnicas que confieren propiedades analíticas de elevada sensibilidad y selectividad. En este sentido destacan 1) la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) acoplada tanto a ICP-MS, ampliamente utilizada en la especiación de especies metálicas y de metaloides no volátiles, como a espectrometría de masas molecular, y 2) la cromatografía de gases (GC, *Gas Chromatography*) acoplada a espectrometría de masas molecular y a ICP-MS, para la especiación de compuestos orgánicos ya sean volátiles o derivatizados para su posterior análisis. En los últimos años el desarrollo de la espectrometría de masas en tándem ha posibilitado su incorporación como una herramienta analítica fundamental a los estudios de especiación.

En la presente Tesis Doctoral se ha abordado la transformación de nanopartículas de selenio tras su interacción con diferentes sistemas biológicos. Para ello se han propuesto dos metodologías de análisis basadas en 1) HPLC-ICP-MS y HPLC-ESI-MS/MS y 2) microextracción en fase sólida en espacio en cabeza (HS-SPME, *Headspace Solid-phase Microextraction*) combinada con GC-MS (HS-SPME-GC-MS).

1.2.1. HPLC-ICP-MS y HPLC-ESI-MS/MS

La capacidad multielemental, los bajos límites de detección, así como su selectividad y la posibilidad de llevar a cabo medidas de dilución isotópica, convierten al ICP-MS en la herramienta idónea para la determinación de metales y metaloides a nivel de trazas. Sin embargo, su falta de selectividad a la hora de distinguir entre especies del mismo elemento, hace que se requiera de su acoplamiento con métodos de separación que permitan separar las distintas formas químicas del elemento de interés. En el caso de especies no volátiles, HPLC es la herramienta ideal para llevar a cabo su separación previa, antes de su determinación por ICP-MS. La técnica de HPLC aporta una gran versatilidad tanto en fases móviles como en fases estacionarias (Caruso y Montes-Bayon, 2003; Szpunar, 2000). Dentro de esta, son la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de fase inversa, las que se encuentran entre las técnicas más utilizadas para la especiación de compuestos metálicos y de metaloides (Szpunar, 2000). De hecho, normalmente son utilizadas de manera conjunta en este tipo de estudios, ya que proporcionan información complementaria permitiendo incrementar así, el conocimiento sobre las especies formadas (Infante *et al.*, 2004; Peachey *et al.*, 2009; Pedrero y Madrid, 2009).

Ambas técnicas tienen sus ventajas e inconvenientes cuando son acopladas a ICP-MS. La cromatografía de intercambio iónico, aunque utiliza fases móviles con alto contenido acuoso y poco modificador orgánico, evitando la desestabilización del plasma, no tiene buena capacidad de resolución cuando se trata de compuestos con una estructura química similar. Por su parte, la cromatografía de fase inversa es cierto que suple la carencia en cuanto a la capacidad de resolución de la cromatografía de intercambio iónico, al ser capaz de discriminar entre compuestos con una estructura química parecida, sin embargo, su compatibilidad con ICP-MS viene limitada por la composición de la fase móvil, cuyo contenido en modificador orgánico suele ser elevado. En estos casos, ni siquiera el uso en ICP-MS de conos de platino y de una unidad de desolvatación, junto con la adición de oxígeno al gas de nebulización, consiguen evitar la disminución de la sensibilidad y la desestabilización del plasma (Makarov y Szpunar, 1999).

Por otra parte, el desarrollo de la espectrometría de masas en tándem ha hecho que cada vez sea más habitual que los estudios de especiación realizados por HPLC-ICP-

MS se complementen con HPLC-ESI-MS/MS (Infante *et al.*, 2009; Kápolna *et al.*, 2009; Ogra *et al.*, 2007; Tie *et al.*, 2015). De esta manera se consigue 1) confirmar la identidad de las especies presentes en la muestra, ya que mediante HPLC-ICP-MS solo se pueden identificar con respecto a los tiempos de retención de los patrones, 2) identificar y confirmar la presencia de especies desconocidas, que por la ausencia de patrón no pudieron ser identificadas por HPLC-ICP-MS, y 3) mejorar la identificación de las especies, dado que por HPLC-ICP-MS es complicado determinar si varias coeluyen, y más teniendo en cuenta la falta de disponibilidad de patrones para todas las especies.

Hay que mencionar que algunas de estas estrategias ya se han empleado para evaluar la biotransformación de SeNPs en selenoaminoácidos, tras su exposición a diferentes organismos vivos como plantas (Palomo-Siguero *et al.*, 2015) y bacterias ácido-lácticas (Palomo-Siguero *et al.*, 2016, 2015; Palomo-Siguero y Madrid, 2017).

1.2.2. HS-SPME-GC-MS

La técnica SPME es muy adecuada para la determinación y monitorización *in vivo* de compuestos volátiles y semivolátiles. Se trata de un método de extracción no exhaustivo, en el que solo se extrae una pequeña porción de los analitos de interés de la matriz de la muestra, y el muestreo provoca una mínima perturbación del sistema. Todo esto hace que el uso de la SPME dé como resultado una mejor caracterización, y una información más precisa sobre el sistema o proceso investigado, en comparación con los métodos que requieren de extensos protocolos de preparación de muestra (Ouyang y Pawliszyn, 2008; Souza-Silva *et al.*, 2015). A la hora de llevar a cabo la extracción de este tipo de compuestos *in vivo*, aparecen mezclas complejas de compuestos volátiles en bajas concentraciones junto con otros componentes no volátiles de la propia matriz, lo que hace que la extracción en espacio en cabeza sea la opción más adecuada. Dentro del espacio en cabeza, la modalidad de espacio en cabeza estático es preferida frente al espacio en cabeza dinámico, ya que no se requiere de un gas de purga que podría alterar las condiciones de crecimiento de los organismos objeto de estudio (Souza-Silva *et al.*, 2015).

En estos estudios de monitorización o determinación *in vivo* de compuestos volátiles o semivolátiles, los principales retos a los que debe hacer frente la SPME son 1) encontrar un sistema de muestreo adecuado que permita llevar a cabo una extracción reproducible y representativa, y 2) la dificultad de encontrar un compuesto que actúe

adecuadamente como patrón interno, ya que debe tener propiedades similares a las de los analitos objeto de estudio y no estar presente en la muestra. Aunque la mejor alternativa hoy en día es utilizar como patrón interno los mismos analitos que se están estudiando, pero deuterados, su disponibilidad en el mercado está reducida a un número de compuestos muy pequeños, a lo que se debe añadir su elevado coste (Ouyang y Pawliszyn, 2008). Además, se debe tener en cuenta que, en los estudios de cuantificación de estos compuestos en organismos vivos, la calibración interna se ha de realizar sobre la propia fibra y no adicionar el patrón interno sobre el propio organismo, ya que podría alterar también sus condiciones de crecimiento (Wang *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2007).

Una vez realizada la extracción de los compuestos volátiles y semivolátiles, su separación, detección y cuantificación se suele realizar mayoritariamente a través de GC-MS, siendo necesaria su confirmación mediante GC acoplada a un espectrómetro de masas en tándem (GC-MS/MS). Sin embargo, en el caso de las especies volátiles derivadas de compuestos de metaloides, como es el caso del selenio, no sería necesaria su confirmación mediante GC-MS/MS, ya que 1) las librerías de compuestos disponibles para GC-MS permiten su identificación, y 2) el perfil isotópico del selenio es tan característico que permite la confirmación de esas especies.

1.3. Herramientas quimiométricas para la evaluación de datos

La quimiometría es una disciplina metrológica que maneja los datos de los procesos químicos, utilizando los conocimientos de las matemáticas y la estadística, para extraer de los datos experimentales la mayor cantidad de información y extender el conocimiento del sistema químico. Estas herramientas se basan en métodos multivariantes, como análisis de la varianza (ANOVA, *Analysis of Variance*), análisis de componentes principales (PCA, *Principal Component Analysis*), calibración multivariante, diseño de experimentos y control de calidad (Mongay-Fernández, 2005a).

En el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, las herramientas quimiométricas han sido aplicadas en el estudio de las nanopartículas para el diseño de experimentos, la construcción de modelos de calibración multivariante y la mejora del conocimiento sobre su impacto al interaccionar con sistemas biológicos como plantas y bacterias.

1.3.1. ANOVA multivariante

El ANOVA multivariante es una herramienta estadística que permite estudiar la influencia de más de un factor o variable independiente (en el campo de las nanopartículas podrían ser su tamaño y concentración), sobre una variable dependiente cuantitativa (porcentaje de recuperación en número de partículas).

Para realizar el estudio de ANOVA multivariante se debe tener en cuenta que los datos deben ajustarse a un modelo que se obtiene por regresión de forma que se minimicen los residuales. Un ejemplo de modelo al que se podrían ajustar los datos se muestra en la Ecuación 10.

$$R = b_0 + b_1 \times factor_1 + b_2 \times factor_2 + b_{12} \times factor_1 \times factor_2 + \varepsilon \quad (10)$$

siendo, R la variable dependiente, b_0 el intercepto, b_1 el coeficiente lineal del $factor_1$, b_2 el coeficiente lineal del $factor_2$, b_{12} el coeficiente de interacción del $factor_1$ y el $factor_2$ y ε es el error asociado a la falta de ajuste entre los datos experimentales y el modelo teórico propuesto o residuales.

El principal objetivo del ANOVA multifactorial es determinar qué variables afectan al modelo de forma estadísticamente significativa y si hay interacciones entre dichas variables independientes.

Para poder utilizar este tipo de análisis de forma satisfactoria se deben cumplir tres tipos de hipótesis: 1) cada conjunto de datos debe ser independiente del resto, 2) los resultados obtenidos para cada conjunto deben seguir una distribución normal, y 3) las varianzas de cada conjunto de datos no deben diferir significativamente unas de otras.

En general, una vez finalizado el análisis de la varianza, si se ha obtenido que hay diferencias significativas entre variables independientes, se pueden realizar diversos tipos de análisis entre los que se incluye una prueba estadística de rango múltiple (MRT, *Multiple Range Test*) para identificar dentro de cada variable independiente dónde se producen las diferencias significativas (Mongay-Fernández, 2005b).

A modo de ejemplo, la aplicación de esta herramienta permitió establecer que el impacto de AgNPs en la comunidad microbiana del suelo dependía de la funcionalización y la concentración de estas nanopartículas, así como de su tiempo de exposición y la textura del suelo (Grün *et al.*, 2019).

1.3.2. Análisis de componentes principales

A diferencia del caso anterior, en el PCA no se diferencia entre variables dependientes e independientes, sino que todas se encuentran al mismo nivel, al tratarse de un modelo descriptivo. En base a esto, el PCA es un procedimiento de análisis que se utiliza para investigar grandes conjuntos de datos con el fin de sintetizar la información (reducir el número de variables) y llevar a cabo su clasificación y agrupación.

El objetivo general de este método es la reducción dimensional, con la que se pretende resumir un conjunto de datos en un número relativamente reducido de componentes perdiendo la menor cantidad de información posible. Para ello trata de definir, a partir de un conjunto inicial de variables (observables), otro conjunto de variables (no observables), conocido como componentes principales, que es obtenido por combinación lineal de las variables originales, no correlacionadas entre sí. Se podrán obtener tantos componentes principales como como variables originales existan, aunque posteriormente su número se vea reducido. La contribución de cada una de las variables, dentro de cada componente principal, depende tanto del signo como de la magnitud del coeficiente en la expresión obtenida por combinación lineal de las variables originales (Ecuación 11). Estos coeficientes varían entre +1 y -1, por tanto, cuanto mayor sea su valor absoluto, mayor será su contribución dentro del componente principal.

$$PC_n = \alpha_{n1} \times X_1 + \alpha_{n2} \times X_2 + \alpha_{n3} \times X_3 + \alpha_{np} \times X_{np} \quad (11)$$

Siendo n el número de componente principal (PC , *Principal Component*) α el coeficiente asociado a cada variable original (X) y p el número de variables originales.

Los coeficientes de cada variable en las expresiones de los componentes principales se corresponden con coordenadas en el espacio, que permiten representar los datos en diferentes tipos de gráficas, con el fin de establecer el agrupamiento y la clasificación de los datos. La complejidad de las gráficas viene dada por el número de componentes principales seleccionados para explicar los datos.

En la selección del número de componentes principales se tiene en cuenta el porcentaje de varianza acumulada explicada o bien los valores propios (*eigenvalues*) mayores de 1. De tal manera, que se seleccionan aquellos componentes principales que expliquen, de forma acumulada, al menos entre el 80% y el 90% de la variación de los datos. En este sentido, el primer componente principal es el más importante por ser el

que explica mayor porcentaje de la varianza de los datos (Gardiner, 1997a; Mongay-Fernández, 2005c). Los únicos requerimientos previos para la aplicación del PCA son la continuidad de las variables y que el número de individuos o muestras debe ser mayor al número de variables originales (variables observables). Por otra parte, este método no exige ni la normalidad ni la homocedasticidad de los datos originales.

Este tipo de análisis es utilizado para comprender y evaluar el impacto de las nanopartículas tras su exposición a diferentes seres vivos. Su aplicación permitió relacionar el efecto de las ZnONPs sobre las comunidades bacterianas del suelo, en presencia y ausencia del cultivo de plantas, y cómo se vio afectado este cultivo por la variación de la población bacteriana (Lee *et al.*, 2012).

1.3.3. Métodos de calibración multivariantes

Para determinar simultáneamente diferentes analitos utilizando múltiples respuestas se recurre a un sistema superdeterminado y a la calibración multivariante. Esta herramienta quimiométrica establece un modelo matemático del sistema de estudio, donde los parámetros de calibración se derivan de cálculos estadísticos a partir de datos empíricos. Para establecer ese modelo matemático, en este Apartado se van a tratar modelos de calibración lineal basados en 1) regresión por mínimos cuadrados ordinarios (OLS, *Ordinary Least-Squares*), 2) regresión sobre componentes principales (PCR, *Principal Component Regression*), y 3) regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS, *Partial Least-Squares*) (Mermet *et al.*, 2004a).

El método de OLS busca la combinación de los parámetros del modelo lineal (pendiente e intercepto) que proporcione el valor más pequeño de los residuales al cuadrado, es decir, las diferencias al cuadrado entre los valores estimados por el modelo y sus correspondientes valores reales. El modelo se trata en forma matricial como se muestra en la Ecuación 12.

$$\mathbf{Y} = \mathbf{XB} + \text{Residuales} \quad (12)$$

Donde $\mathbf{Y}$ es la matriz de las variables dependientes con dimensiones $n \times m$, $\mathbf{X}$ es la matriz de las variables independientes con dimensiones $n \times p$ y $\mathbf{B}$ es la matriz de los coeficientes de regresión con dimensiones $p \times m$. Siendo n el número de disoluciones, m el número de respuestas instrumentales y p el número de componentes.

Normalmente la matriz de variables independientes, X , no es cuadrada por lo que los coeficientes de regresión, B , se estiman por el método de la inversa generalizada (Ecuación 13).

$$B = (X^T X)^{-1} X^T Y \quad (13)$$

Siendo X^T , la matriz traspuesta de las variables independientes.

En la etapa de predicción es necesario de nuevo recurrir al método de la inversa generalizada para poder estimar la matriz de variables independientes, X (Ecuación 14).

$$X = a (B^T B)^{-1} B \quad (14)$$

Siendo a el vector de las señales instrumentales y B^T la matriz traspuesta de los coeficientes de regresión.

La principal limitación del método de regresión por OLS, es que exista correlación entre las variables independientes. Esta correlación haría que el modelo no tuviese solución ya que, al aplicar los métodos de la inversa generalizada, para calcular B y X , alguna de las columnas o filas de las matrices serían combinación lineal unas de otras, o podrían llegar a ser ceros, impidiendo de esta manera la resolución del sistema de regresión.

Ante esta problemática, existen otros métodos de calibración multivariante basados en regresión lineal inversa por mínimos cuadrados, que serían la PCR y la regresión por PLS.

En ambos casos la etapa de calibración, al tratarse de un método inverso, presenta la expresión que se recoge en la Ecuación 15.

$$X = BY \quad (15)$$

Siendo X la matriz de variables independientes, B la matriz de coeficientes de regresión e Y la matriz de variables dependientes.

Para poder obtener el valor de X lo primero que hacen ambos métodos es calcular la B , siendo este cálculo lo que los diferencia. En el caso de PCR, la B se calcula a través de la pseudoinversa de Y (Ecuación 16).

$$B = XY^+ \quad (16)$$

Donde Y^+ es la matriz pseudoinversa de las variables dependientes.

Para calcular esta matriz pseudoinversa, el método PCR descompone primero la Y en dos matrices ortonormales U y V que están unidas por una matriz diagonal W , de valores singulares (Ecuación 17), siendo estas matrices las que se utilizan para el cálculo de Y^+ (Ecuación 18).

$$Y = U W V^T \quad (17)$$

$$Y^+ = V W^+ U^+ \quad (18)$$

Luego en la etapa de calibración, una vez conocidos Y^+ y X se puede calcular B . En lo que respecta a la etapa de predicción, como ya se conocen B e Y (que en este caso proceden de las muestras), se puede llevar a cabo el cálculo de X .

Por su parte la regresión por PLS, calcula B (Ecuación 19) haciendo uso del algoritmo conocido como algoritmo PLS, basado en la obtención de variables latentes.

$$B = W(P^T W)^{-1} Q^T \quad (19)$$

Siendo W la matriz de pesos de PLS, Q^T la matriz traspuesta obtenida a través de la descomposición de Y y P^T la matriz traspuesta resultante tras la descomposición de X .

La obtención de Q^T y P^T se obtienen por la descomposición de Y (Ecuación 20) y de X (Ecuación 21), respectivamente, en matrices ortogonales más sencillas.

$$Y = T Q^T + F \quad (20)$$

$$X = T P^T + E \quad (21)$$

Siendo F y E las matrices de error asociadas a Y y X , respectivamente.

Por tanto, una vez obtenida B , en la etapa de predicción se puede determinar directamente X al conocerse tanto B como Y , siendo esta última matriz el valor de las variables dependientes en las muestras.

A diferencia del método de calibración por OLS, para PCR y PLS no es necesario disponer de todos los datos relativos a las variables independientes para poder construir el modelo de calibración, ya que los métodos matemáticos utilizados no se ven afectados por la existencia de correlación entre las variables independientes. Asimismo, si a alguna

de las variables dependientes el efecto de la matriz (Y) es diferente que el efecto de la muestra, la interferencia en el cálculo de B es poca (Mermet *et al.*, 2004a).

Modelos de calibración multivariante, como PLS, han sido aplicados para determinar el tamaño de AuNPs teniendo en cuenta la agregación inducida por el aminoácido L-cisteína. La construcción del modelo se basó en la relación espectrofotométrica entre el comportamiento cinético de agregación y los diferentes tamaños de AuNPs (Rabbani *et al.*, 2013).

De hecho, en la presente Tesis Doctoral esta herramienta ha permitido desarrollar un modelo rápido de calibración multivariante para determinar simultáneamente el tamaño y la concentración de AgNPs en muestras medioambientales.

1.3.4. Diseño experimental. Diseños factoriales

En Química Analítica la experimentación por ensayo y error no suele conducir a resultados óptimos cuando se intenta evaluar la influencia de diversos factores sobre la respuesta analítica. Ante este tipo de situaciones, los factores más importantes que influyen en un determinado problema analítico se seleccionan sobre la base de enfoques estadísticos de diseño experimental, así como mediante la evaluación de los efectos de los factores y sus interacciones por medio de pruebas estadísticas.

La optimización del problema analítico se basa en encontrar una relación entre la variable o respuesta analítica que se desea optimizar, y los factores que afectan a esa variable o respuesta. La expresión matemática resultante es similar a la que se utiliza en ANOVA multivariante (Ecuación 10), pero con la diferencia de que los factores ahora deben estar normalizados, es decir, estar comprendidos entre -1 y +1.

El diseño más simple es un diseño factorial completo 2^k , donde la base indica el número de niveles de variabilidad de cada factor y k , equivale al número de factores que se van a optimizar. Este tipo de diseño se utiliza cuando el número de factores es pequeño, dado que su aumento implica un incremento drástico en el número de experimentos. En estos casos, se recurre al diseño factorial fraccionado, 2^{k-p} , donde mediante el factor p se reduce considerablemente el número de experimentos.

Cuando el número de niveles de variabilidad de cada factor se incrementa a 3, se tiene el correspondiente diseño factorial completo, 3^k , que presenta las mismas limitaciones anteriormente mencionadas.

A la hora de cuantificar e interpretar las relaciones entre las respuestas y los factores, se recurre a la herramienta de análisis de superficie de respuesta (RSM, *Response Surface Analysis*), aplicable a diseños tanto con 2 como con 3 niveles. Asimismo, esta herramienta es muy útil para encontrar las condiciones óptimas de separación cuando se intenta optimizar una sola variable o respuesta analítica. Por el contrario, cuando se intentan optimizar más de una se hace uso del análisis multirrespuesta (MRA, *Multiple Response Analysis*), que permite determinar la combinación de los factores experimentales que optimizan simultáneamente las respuestas analíticas estudiadas y, por tanto, maximizan la función de deseabilidad. Esta función es la responsable de establecer unas condiciones de compromiso para cada uno de los factores, teniendo en cuenta las respuestas analíticas estudiadas (Gardiner, 1997b; Mermet *et al.*, 2004b).

2. INTERACCIONES DE NANOPARTÍCULAS CON SISTEMAS BIOLÓGICOS Y MEDIOAMBIENTALES

Como ya se ha comentado, los productos basados en nanopartículas se utilizan cada vez más en muchos aspectos de nuestra vida cotidiana: textiles, productos de cuidado personal, envase alimentario, medicina, etc., debido a sus propiedades fisicoquímicas y a sus excepcionales propiedades ópticas y eléctricas en comparación con sus homólogos de mayor tamaño o *bulk*. El uso extensivo de productos que contienen nanopartículas puede originar su liberación al medioambiente en cada etapa de su ciclo de vida, es decir, desde el proceso de producción de las nanopartículas, durante su incorporación a los productos, en la fase de uso de los mismos, así como al final de su ciclo de utilización (Gottschalk *et al.*, 2015; Lien *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2019). A modo de ejemplo, en el caso de los textiles con nanopartículas (Mitrano y Nowack, 2017), los revestimientos de suelos (Bi *et al.*, 2017), y las pinturas de protección UV para exteriores (Clar *et al.*, 2019), la mayoría de las nanopartículas (ZnO, TiO₂ y Ag) se liberan al medioambiente durante el uso de los productos que las contienen. En definitiva, la liberación de las nanopartículas en el entorno natural constituye un riesgo potencial para el medio ambiente y los ecosistemas (Abbas *et al.*, 2020b).

Una vez liberadas en el medioambiente, las nanopartículas experimentan varios procesos de transformación que modifican sus propiedades fisicoquímicas originales. Estas transformaciones están controladas tanto por las propiedades inherentes de las propias nanopartículas (tamaño, composición, morfología, solubilidad, estabilidad coloidal, reactividad, etc.) como por las propiedades del entorno en el que se liberan (fuerza iónica, pH, presencia de materia orgánica, composición del compartimento medioambiental, etc.). En este sentido, los riesgos y la toxicidad de las nanopartículas para los organismos acuáticos y terrestres no se pueden evaluar sin tener en cuenta estos procesos de transformación de las nanopartículas en el medio natural, dado que las transformaciones químicas, físicas y biológicas que experimentan influirán en su movilidad, biodisponibilidad, persistencia y toxicidad (Garner y Keller, 2014).

En este apartado se van a describir las principales transformaciones físicas, químicas y biológicas que experimentan las nanopartículas cuando entran en contacto con ambientes acuáticos y terrestres, así como, su incorporación a sistemas biológicos (Figura 3).

2.1. Transformaciones y destino de nanopartículas en los medios acuático y terrestre

El vertido de aguas residuales y lodos de depuradora, incluyendo los residuos sólidos, son importantes vías de entrada de las nanopartículas en los sistemas de aguas, suelos y sedimentos (Bolaños-Benítez *et al.*, 2020; Cervantes-Avilés *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2021; Meier *et al.*, 2016). Tras su liberación, las nanopartículas sufren diferentes transformaciones físicas, químicas y biológicas que determinan su destino y biodisponibilidad en los diferentes organismos. De esta manera las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas, tales como el tamaño, el área superficial, el potencial zeta o la carga superficial, la estabilidad coloidal y la composición del núcleo y el recubrimiento, son los parámetros más importantes, además de los parámetros medioambientales, que regulan los procesos de transformación de las nanopartículas (Bhatt y Tripathi, 2011).

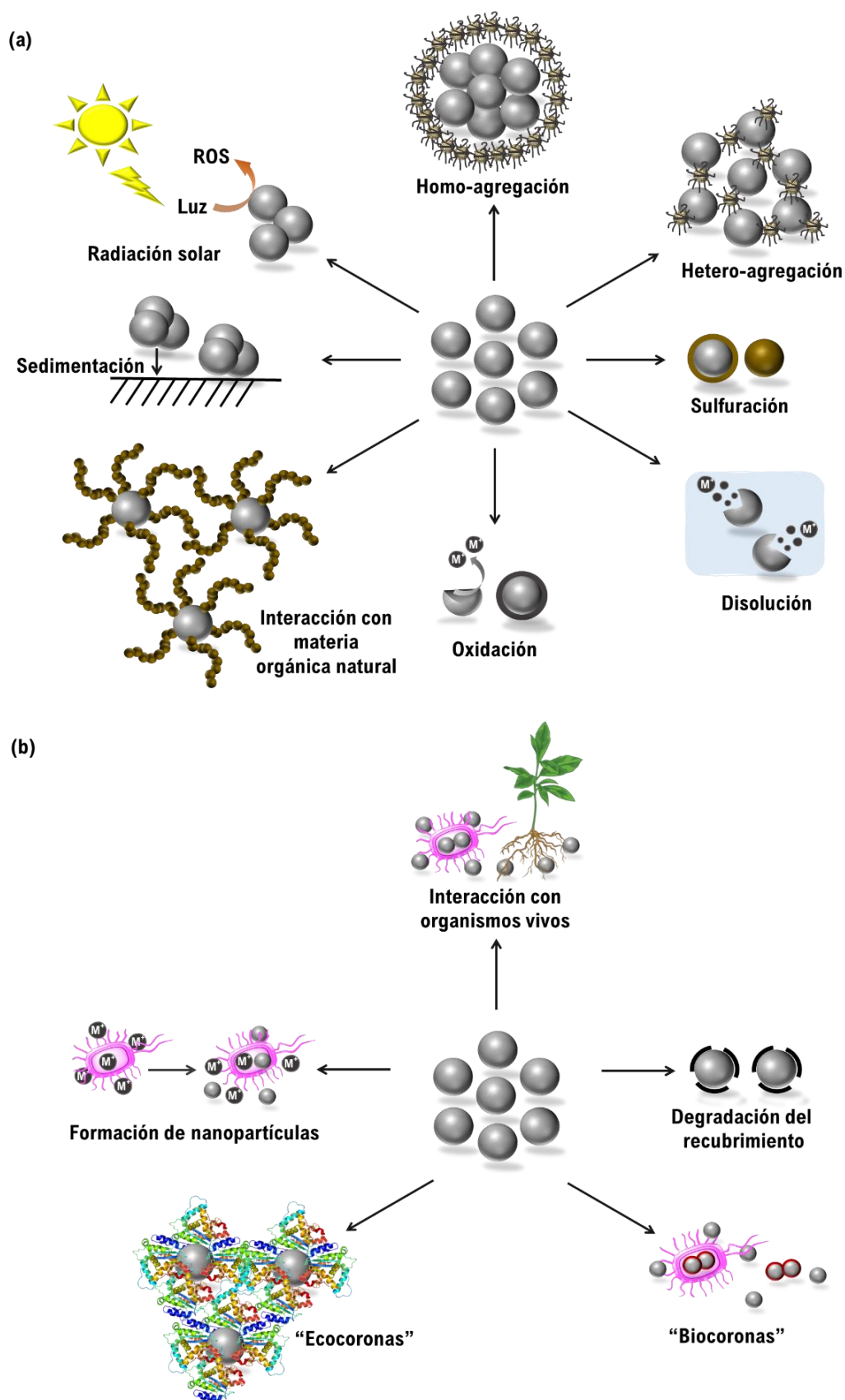


Figura 3. (a) Transformaciones físicas y químicas; y (b) transformaciones biológicas que experimentan las nanopartículas cuando entran en el medioambiente e interaccionan con diferentes organismos vivos.

2.1.1. Transformaciones físicas

En el entorno natural, solo una pequeña fracción de las nanopartículas se encuentra como partículas individuales, debido a su alta carga superficial como resultado de su elevada superficie específica. De esta manera las nanopartículas suelen experimentar un proceso de aglomeración, entendiéndose por aglomerado, según la Unión Europea, “un conjunto de partículas o agregados débilmente ligados en el que la extensión de la superficie externa resultante es similar a la suma de las extensiones de las superficies de los distintos componentes” (Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2011). Estos procesos de aglomeración pueden clasificarse en homo-aglomeración (interacción entre nanopartículas) y hetero-aglomeración (interacción de nanopartículas con partículas coloidales de naturaleza orgánica e inorgánica), predominando en las matrices medioambientales este último debido a las concentraciones traza en las que se encuentran las nanopartículas (Lei *et al.*, 2018). Las interacciones de las partículas coloidales (minerales de arcilla, materia orgánica, sustancias poliméricas extracelulares, etc.) con las nanopartículas modulan la estabilidad y el estado de aglomeración de estas últimas en el medioambiente. El fenómeno de aglomeración en un sistema natural se basa en el movimiento browniano, la sedimentación diferencial y el movimiento de los fluidos. De acuerdo con la teoría de DeJaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO), el tamaño de las partículas, la carga superficial, las fuerzas de van der Waals y la fuerza iónica del medio regulan la velocidad de aglomeración de las nanopartículas. Sin embargo, otros procesos que no están considerados en la teoría DLVO, como el efecto de hidratación, el impedimento estérico, la interacción con polímeros y las interacciones magnéticas e hidrofóbicas, también contribuyen al proceso de aglomeración de las nanopartículas en el medioambiente (Goswami *et al.*, 2017; Navarro *et al.*, 2008).

El proceso de aglomeración aumenta el tamaño de los grupos de nanopartículas a lo largo del tiempo, con una reducción de la concentración en número de nanopartículas tanto en el suelo, como en las suspensiones acuosas, favoreciendo así la deposición/sedimentación de los aglomerados de mayor tamaño. De este modo, una menor aglomeración irá acompañada por una tasa de deposición/sedimentación lenta de las nanopartículas sobre una superficie y, por tanto, la movilidad y biodisponibilidad de esas nanopartículas en la matriz medioambiental se verá incrementada (Mitrano y Nowack, 2017). Generalmente, este proceso de deposición/sedimentación se produce en tres fases

con diferentes velocidades; 1) una fase inicial lenta cuando el proceso de aglomeración está en curso; 2) una fase rápida, y 3) de nuevo una fase lenta debido al menor número de partículas en suspensión como consecuencia de que todas las partículas aglomeradas ya se han depositado/sedimentado (Phenrat *et al.*, 2007).

El proceso de aglomeración también hace que disminuya la relación superficie-volumen y los sitios activos accesibles de las nanopartículas aglomeradas, provocando una disminución de su reactividad y biodisponibilidad cuando se compara con las nanopartículas dispersas. A modo de ejemplo, la acumulación y la toxicidad de las TiO₂NPs en las células de la microalga *Isochrysis galbana* se redujo directamente como consecuencia del proceso de aglomeración e indirectamente por la deposición de los aglomerados (J. Hu *et al.*, 2018).

Entre los factores que afectan al proceso de aglomeración, el pH, la fuerza iónica y el estado de oxidación del electrolito son los factores ambientales clave, además de la concentración inicial y el tipo de nanopartículas, y sus propiedades fisicoquímicas (forma, tamaño, recubrimiento superficial, etc.) (Lead *et al.*, 2018).

El pH influye en el proceso de aglomeración ya que regula el potencial zeta de las partículas. Teóricamente, cuando el pH de una suspensión coloidal se acerca al punto de carga cero o punto isoeléctrico, el sistema coloidal tiene una estabilidad mínima ya que, el efecto neto de la carga superficial de las partículas y su movilidad es nula (Zhang *et al.*, 2016). Por tanto, en los entornos naturales acuáticos y terrestres, algunos coloides afectan a la estabilidad de las nanopartículas por sus diferentes valores de pH del punto isoeléctrico, dado que cuando la carga superficial de estos coloides naturales es opuesta a la de las nanopartículas se forman aglomerados. Cornelis *et al.*, 2013, observaron la formación de hetero-agregados entre las AgNPs y las partículas de arcilla presentes en el suelo sobre todo cuando el valor del pH del suelo estaba por debajo del punto isoeléctrico.

Generalmente, la superficie de las nanopartículas se modifica con agentes de recubrimiento de distinta naturaleza para mejorar su estabilidad. Estos agentes de recubrimiento también pueden verse afectados con el cambio de pH, debido a la presencia de grupos funcionales (-COOH, -OH, -NH₂, -N-(CH₃)₂, -Si-(CH₃)₃ o -SO₃) que pueden protonarse o desprotonarse en función del pH, mejorando o disminuyendo la estabilidad de las nanopartículas y por tanto, favoreciendo o dificultando el proceso de aglomeración

en el entorno natural, al influir en el potencial zeta de las partículas (Tan *et al.*, 2018). Por ejemplo, la carga superficial y los estados de aglomeración de AgNPs estabilizadas electrostáticamente, con citrato y borohidruro sódico, y electrostéricamente, con polietilenimina ramificada, se vieron afectados en el intervalo de pH de 2 a 10 (El Badawy *et al.*, 2010). Asimismo, los agentes de recubrimiento también modifican el destino y la biodisponibilidad de las nanopartículas en matrices medioambientales. Liu *et al.*, 2019, encontraron que la toxicidad de las AgNPs en pez cebra (*Danio rerio*), después de 96 horas de exposición, fue mayor cuando se utilizaba citrato en lugar de polivinilpirrolidona (PVP, *Polyvinylpyrrolidone*) como agente de recubrimiento. Por otro lado, Abbas *et al.*, 2020a, observaron que la presencia de carbón vegetal redujo la biodisponibilidad y la acumulación de CeO₂NPs en plantas de arroz y trigo por la complejación de estas nanopartículas por el carbón vegetal.

La fuerza iónica regula el grado de aglomeración y la estabilidad de las nanopartículas tanto en el suelo como en el agua, y depende del pH del medio natural, la carga iónica, el tipo de electrolito y la concentración. A medida que la fuerza iónica aumenta, se produce una compresión de la doble capa eléctrica, lo que da lugar a una reducción de la carga superficial (potencial zeta) y a una modificación del potencial zeta de las nanopartículas al producirse la adsorción de contraiones. Este proceso favorece la aglomeración de las nanopartículas en el medio, ya que la repulsión estérica entre las partículas es superada por la fuerza de atracción (Abbas *et al.*, 2020b). Para poder aglomerar las nanopartículas superando la barrera de energía electrostática de las partículas, se requiere una concentración iónica mínima, denominada concentración crítica de coagulación. Por tanto, en el medio natural una suspensión coloidal con valores bajos de concentración iónica será estable, y reducirá la velocidad de aglomeración de las nanopartículas (Dwivedi *et al.*, 2015). De hecho, un gran número de investigaciones han probado que un aumento en la fuerza iónica, tanto en sistemas acuáticos como en sistemas terrestres, incrementa la cinética de aglomeración de AuNPs (Afrooz *et al.*, 2013), CuONPs (Conway *et al.*, 2015), ZnONPs (Domingos *et al.*, 2013) y TiO₂NPs (Han *et al.*, 2014). En particular en los suelos, la interacción de los minerales arcillosos, omnipresentes en este compartimento medioambiental, con las nanopartículas puede aumentar o suprimir la aglomeración y, por tanto, influir en la estabilidad de estas dependiendo de la concentración de partículas. Por ejemplo, las partículas de

montmorillonita al interactuar con las AgNPs y TiO₂NPs, desestabilizan el sistema provocando su aglomeración (Zhou *et al.*, 2012).

La materia orgánica natural también desempeña un papel importante en la estabilidad, aglomeración e incluso desaglomeración de las nanopartículas ya aglomeradas, dependiendo de las condiciones ambientales. La materia orgánica natural se refiere al conjunto heterogéneo de compuestos orgánicos que van desde las macromoléculas (ácidos fúlvicos, ácidos húmicos y sustancias poliméricas extracelulares) hasta compuestos de bajo peso molecular basados en el carbono y ligandos que incluyen aminas, grupos carboxílicos y tioles, que se encuentran en entornos naturales terrestres y acuáticos (Lowry *et al.*, 2012b). Su procedencia está relacionada con la descomposición de materia vegetal, microorganismos y residuos animales, y se caracteriza porque posee unas características fisicoquímicas que permiten su adsorción en la superficie de las nanopartículas, provocando su modificación en términos de carga, potencial zeta y orientación estérica. Esta modificación de la superficie de las nanopartículas, por regla general, disminuye su velocidad de aglomeración y mejora su estabilidad en suspensión (Domingos *et al.*, 2013). Hay estudios que indican que con una concentración de materia orgánica natural inferior a 30 mg de carbono L⁻¹, se reduce la aglomeración de las nanopartículas, aumentando su estabilidad. En el caso de las nanopartículas inorgánicas su interacción con la materia orgánica natural se basa o en el intercambio de ligandos con el grupo hidroxilo de la superficie de esta materia, o en las interacciones hidrofílicas con otros grupos funcionales de la superficie (Abbas *et al.*, 2020b). Se debe tener en cuenta que el efecto de la materia orgánica natural sobre la estabilidad de las nanopartículas depende tanto del pH como de la fuerza iónica del medio natural. Li y Chen, 2012, encontraron que las CeO₂NPs eran estabilizadas por los ácidos húmicos a baja fuerza iónica, en presencia tanto de sales monovalentes (KCl) como divalentes (CaCl₂). Sin embargo, cuando la concentración de CaCl₂ fue superior a 10 mmol L⁻¹ se produjo una desestabilización del sistema que desencadenó una rápida aglomeración, como consecuencia de la formación de puentes entre los ácidos húmicos, unidos a las nanopartículas a través del Ca²⁺. Por otro lado, mientras el ácido húmico del río Suwannee induce la desaglomeración de TiO₂NPs ya aglomeradas en función del pH (Jayalath *et al.*, 2018), las ZnONPs son estabilizadas en aguas residuales por la materia orgánica natural en unas condiciones de fuerza iónica alta (Zhou *et al.*, 2015). Por tanto, el papel global de la materia orgánica natural para estabilizar o aglomerar nanopartículas en el medio natural

es bastante complejo, ya que depende tanto de las propiedades intrínsecas de esta materia, como de su origen, y de las condiciones ambientales.

Por último, existen otros factores ambientales como la temperatura, la luz (visible y UV), y las condiciones aerobias que también influyen en la estabilidad y aglomeración de las nanopartículas. La velocidad de aglomeración de las ZnONPs depende de la temperatura, ya que a 35°C la aglomeración fue mayor que a 15°C y 25°C (Majedi *et al.*, 2013). La exposición a la luz solar de quantum dots basados en Cd dio lugar a la formación de aglomerados (Silva *et al.*, 2016), de la misma manera que AgNPs estabilizadas con citrato, experimentaron un proceso de aglomeración entre 3 y 8 veces más rápido cuando se expusieron a condiciones aeróbicas, que cuando se encontraban en un entorno limitado de oxígeno (Wen Zhang *et al.*, 2011).

Por todo lo mencionado en este apartado, es muy importante comprender la cinética de aglomeración de las nanopartículas en el medioambiente, ya que eso determinará su movilidad y biodisponibilidad en las matrices medioambientales.

2.1.2. Transformaciones químicas

Las nanopartículas pueden experimentar diferentes transformaciones químicas, como oxidación-reducción, disolución, adsorción, complejación, degradación y reacciones fotoquímicas (Abbas *et al.*, 2020b).

Las reacciones de oxidación-reducción en condiciones ambientales suelen estar gobernadas por el pH y por la existencia de agentes reductores y oxidantes. Las nanopartículas de elementos metálicos como la Ag y el Cu, así como de óxidos metálicos, tales como los óxidos de hierro y de cerio, son susceptibles de experimentar los procesos de oxidación-reducción. Se ha observado la reducción de CeO₂NPs tanto neutras como cargadas negativamente a Ce(III) cuando interaccionaron con el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Collin *et al.*, 2014). Hay que mencionar que, aunque estas reacciones de oxidación-reducción pueden aumentar la estabilidad de las nanopartículas, al formar una capa insoluble en su superficie, también pueden llegar a disminuir su estabilidad, al desarrollar una capa superficial activa que facilita su interacción con otros componentes del medio natural. Asimismo, la oxidación de los átomos de la superficie de las nanopartículas favorece su disolución, disminuyendo así su estabilidad (Amde *et al.*, 2017).

La disolución es un proceso crucial de transformación química por el que se liberan especies iónicas solubles desde las nanopartículas. En este sentido, las nanopartículas pueden clasificarse en altamente solubles (AgNPs, Cu/CuONPs, FeONPs, QDs y Zn/ZnONPs), poco solubles (CeO₂NPs y TiO₂NPs) o insolubles (nanopartículas basadas en carbono). La velocidad y extensión de la disolución depende tanto de sus propiedades intrínsecas (composición química, tamaño, morfología, área superficial, agente de recubrimiento y estructura cristalina) como de las propiedades del medio en el que se encuentran (pH, potencial, fuerza iónica, temperatura, materia orgánica natural y ligandos inorgánicos) (Abbas *et al.*, 2020b). En cuanto al agente estabilizante de las nanopartículas, se ha demostrado que en sistemas acuáticos las AgNPs estabilizadas con citrato presentaron una mayor velocidad de disolución que sus análogas estabilizadas con PVP y polietilenglicol (Tejamaya *et al.*, 2012). En lo que respecta a las propiedades del medio natural, la fuerza iónica y el pH influyen significativamente en el proceso de disolución, viéndose este proceso reducido cuando la fuerza iónica del medio es elevada, al desencadenarse los procesos de sedimentación y precipitación. Por su parte, la materia orgánica natural, aunque también es dependiente del pH, forma complejos con las nanopartículas disminuyendo su velocidad de disolución, siempre y cuando su concentración en el medio sea elevada (Bian *et al.*, 2011; Domingos *et al.*, 2013). La liberación de formas iónicas desde las nanopartículas tiene un papel importante en la toxicidad de las nanopartículas ya que, generalmente, las formas iónicas de los metales suelen presentar una mayor toxicidad que sus análogas nanoparticuladas.

Los iones liberados por la disolución u oxidación de las nanopartículas pueden ser adsorbidos por las partículas del suelo o componentes del agua, o formar complejos con diferentes ligandos, influyendo así en su biodisponibilidad y toxicidad. En el caso de AgNPs, Cu/CuONPs y ZnONPs, su elevada tendencia a formar sulfuros, hace que se forme sobre su superficie una capa de sulfuro del correspondiente metal relativamente insoluble, cuando se combinan con biomoléculas que contienen una alta proporción de azufre, o con azufre inorgánico presente en suelos y sedimentos (Lowry *et al.*, 2012b, 2012a). El mecanismo y el alcance del proceso de sulfuración de las nanopartículas depende principalmente de la concentración de azufre en el medio de reacción. En el caso de las AgNPs, cuando se encuentran en ambientes con elevadas concentraciones de azufre (1-100 mg L⁻¹), se transforman en nanopartículas Ag₂S mediante la reacción directa o vía de oxisulfuración. Por el contrario, cuando la concentración de azufre en el medio es inferior

a 1 mg L^{-1} , primero se produce la liberación de los iones Ag^+ biológicamente activos procedentes de la oxidación de las AgNPs y a continuación, estos iones generados forman puentes de Ag_2S entre las partículas adyacentes (Liu *et al.*, 2011). De esta forma se han encontrado nanopartículas metálicas sulfuradas de Ag y de Zn en aguas residuales y lodos de depuradora (He *et al.*, 2019; Oleszczuk *et al.*, 2019). Estos procesos de sulfuración no impiden que las nanopartículas dejen de estar biodisponibles para las comunidades microbianas y las plantas, pero sí reducen la liberación de los correspondientes iones metálicos, al disminuir la velocidad de disolución, lo que se puede traducir en una reducción de su toxicidad (Abbas *et al.*, 2019). Sin embargo, en algunos casos la sulfuración puede aumentar el proceso de disolución como se detectó en las CuONPs sulfuradas, donde se incrementó el número de iones Cu^{2+} liberados, con el posible aumento de su biodisponibilidad y toxicidad (Ma *et al.*, 2014). Además, en el caso del Zn se ha observado que su interacción con el ion fosfato puede dar lugar a la formación de ZnONPs recubiertas por una capa de $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$, reduciendo así su disolución y la liberación de iones Zn^{2+} (Lv *et al.*, 2012). Por tanto, la presencia de diferentes tipos de ligandos en el medioambiente puede provocar procesos de transformación en las nanopartículas que afecten a su comportamiento, destino y toxicidad.

Elementos potencialmente tóxicos (Cd, Pb, Hg, As, Cr, Ni, etc.), pesticidas, compuestos organoclorados y elementos radioactivos en suelos, sedimentos o como partículas en suspensión pueden experimentar procesos de adsorción física o química sobre la superficie de las nanopartículas. De esta manera, las nanopartículas pueden actuar como transportadores de estos contaminantes y entrar en el organismo como un complejo partícula-contaminante, desencadenando un posible aumento de la biodisponibilidad y la toxicidad de estos contaminantes en el organismo por el denominado efecto “Caballo de Troya” a través de las nanopartículas (Abbas *et al.*, 2020b). En este sentido se ha observado que la adsorción de éteres difenílicos polibromados a TiO_2NPs a través de los grupos éteres aromáticos y el Br, suprimió la aglomeración de estas nanopartículas en aguas naturales, aumentado el transporte y la exposición de ambos compuestos a los organismos acuáticos (R. Khan *et al.*, 2019). Por otro lado, mientras la exposición conjunta del pesticida imidacloprid con CeO_2NPs y AgNPs, en la especie de planta *Curcubita pepo*, no modificó la acumulación de ambas nanopartículas en comparación con la ausencia del pesticida, la acumulación del imidacloprid disminuyó solamente en su exposición conjunta con las AgNPs (De La Torre Roche *et al.*, 2018).

También se encontró que la exposición de ZnONPs junto con Pb^{2+} aumentó la acumulación del Pb en los principales órganos de los ratones, con el consiguiente incremento de la toxicidad (Jia *et al.*, 2017). En los últimos años se ha puesto el foco en los microplásticos como nuevos contaminantes emergentes del ecosistema acuático. Estos microplásticos pueden interaccionar con las nanopartículas modificando sus propiedades fisicoquímicas, así como el transporte y la toxicidad de ambos compuestos, tras su interacción. Davarpanah y Guilhermino, 2019, encontraron que la mezcla de microplásticos y AuNPs redujo considerablemente la velocidad de crecimiento del alga *Tetraselmis chuii*. Por tanto, la adsorción de contaminantes a la superficie de las nanopartículas no solo podría modificar su destino en el medioambiente sino también la ecotoxicidad de los complejos nanopartículas-contaminantes.

Finalmente, las reacciones fotoquímicas, como la fotorreducción y la fotoxidación, la fotólisis y la fotocatalisis pueden modificar diversas propiedades y características de las nanopartículas tales como el agente estabilizante (Cheng *et al.*, 2011), el estado de oxidación, la producción de radicales libres (Bhuvaneshwari *et al.*, 2015) y su persistencia en el medioambiente. La influencia de estas reacciones y, por tanto, la extensión de las transformaciones fotoquímicas de las nanopartículas, vienen determinadas por su banda de energía y la longitud de onda de la luz incidente. Las nanopartículas con actividad fotocatalítica ven modificada su toxicidad en presencia de luz, en comparación con la oscuridad. Por ejemplo, la dosis letal 50 de TiO_2 NPs en *Escherichia coli* disminuyó casi 350 veces cuando estas nanopartículas se irradiaron con luz solar durante 30 minutos (Dasari *et al.*, 2013). Sin embargo, ese mismo tipo de nanopartículas mostró un incremento de su toxicidad sobre el crustáceo *Daphnia magna* cuando su exposición se combinó con irradiación UV (Soler de la Vega *et al.*, 2021).

2.1.3. Transformaciones biológicas

Las principales transformaciones biológicas de las nanopartículas se pueden resumir en biodegradación del agente estabilizante, formación de nanopartículas a partir de los correspondientes iones metálicos por parte de extractos tisulares y microorganismos, y formación de eco/biocoronas. La extensión de estas transformaciones va a depender de la interacción de las nanopartículas con enzimas extracelulares, sustancias poliméricas extracelulares y microorganismos.

La capacidad de algunos microorganismos de degradar compuestos poliméricos, utilizados en muchas ocasiones como recubrimientos de las nanopartículas, hace que la estabilidad de estas nanopartículas se vea alterada dado que la biodegradación del recubrimiento activa los procesos de aglomeración y deposición. Sin embargo, como la concentración de macromoléculas naturales es mayor que la concentración de nanopartículas en el medioambiente, el recubrimiento de estas nanopartículas por parte de las macromoléculas podría llegar a dificultar el proceso de biodegradación al alterar su biodisponibilidad para los organismos (Abbas *et al.*, 2020b).

En el entorno natural existen una gran variedad de macromoléculas (biomoléculas), producidas y secretadas por un grupo muy diverso de flora y fauna. La existencia de enzimas reductoras y grupos funcionales reductores en los extractos excretados pueden provocar la reducción de los iones metálicos y, por consiguiente, su transformación en nanopartículas (Oza *et al.*, 2020). Este proceso ha sido observado en diferentes especies de plantas, cuyos extractos fenólicos actúan como agentes reductores y quelantes de metales durante el proceso de formación de nanopartículas en el medioambiente, como fue el caso de AgNPs y AuNPs sintetizadas a través de extractos de Aloe vera, *Camella sinensis*, *Datura metel*, entre otras (Mittal *et al.*, 2013). Del mismo modo, microorganismos, donde se incluyen varias especies de hongos, bacterias y algas, también son capaces de transformar los iones metálicos en sus respectivas nanopartículas. A modo de ejemplo, el hongo *Aspergillus fumigatus* fue capaz de sintetizar AgNPs tras la reducción del ion metálico (Shahzad *et al.*, 2019), la bacteria *Geobacter sulfurreducens* redujo el Pt(II) a Pt(0) en forma de nanopartículas (Yates *et al.*, 2013) y el alga *Gracilaria edulis* llevó a cabo la síntesis de ZnONPs a partir de Zn^{2+} (Asik *et al.*, 2019).

Algunos compuestos moleculares (polisacáridos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.) presentes en el medioambiente, con pesos moleculares comprendidos entre 10 y 2.000.000 Da, pueden modificar las nanopartículas. Estos compuestos son excretados por todo tipo de organismos vivos y pueden crear una capa alrededor de la superficie de las nanopartículas, denominada “corona” o “ecocorona”, cuya interacción depende de las propiedades fisicoquímicas de estas partículas a escala nanométrica y de las condiciones del medio natural (pH, fuerza iónica, temperatura, irradiación de la luz, etc.) (Nasser *et al.*, 2020; Pulido-Reyes *et al.*, 2017). La “ecocorona” modifica el tamaño y la composición superficial de las nanopartículas, confiriéndolas una identidad biológica

distinta de la nanopartícula inicial. Este recubrimiento de biomoléculas naturales altera la estabilidad de las nanopartículas y generalmente, desempeña un papel protector al disminuir la toxicidad de estas partículas frente a algas (Morelli *et al.*, 2018) y plantas (Huang *et al.*, 2020). Por tanto, el tipo de organismo y su hábitat desempeñan un papel importante en la naturaleza y composición de la “ecocorona”, además de determinar si esta estructura mitiga o potencia la toxicidad de las nanopartículas. Cuando las nanopartículas entran en un sistema biológico (cultivos celulares), la capa de biomoléculas que se forma en su superficie se conoce como “biocorona”, sistema análogo a las “ecocoronas” en los ambientes ecológicos. En este caso, las proteínas que formen la “biocorona” serán las biomoléculas encargadas de controlar las interacciones entre las nanopartículas y los receptores celulares específicos, las vías de internalización y la respuesta inmunitaria (Canesi *et al.*, 2017; Pulido-Reyes *et al.*, 2017). Al igual que las “ecocoronas”, las “biocoronas” también tienden a disminuir la toxicidad de las nanopartículas.

2.2. Interacción de nanopartículas con sistemas biológicos

Las transformaciones físicas, químicas y biológicas que experimentan las nanopartículas, cuando llegan al medioambiente, juegan un papel relevante en la incorporación de estas partículas por parte de los seres vivos, al influir en su biodisponibilidad. Brevemente, factores como el pH, la fuerza iónica y la materia orgánica natural, que controlan los diferentes tipos de transformaciones medioambientales, determinan el grado de biodisponibilidad de las nanopartículas. Generalmente, un aumento de la fuerza iónica favorece la aglomeración y deposición de las nanopartículas, disminuyendo así su grado de biodisponibilidad. La presencia de materia orgánica natural suele favorecer la biodisponibilidad de estas partículas, siempre y cuando el recubrimiento que se genere sea biocompatible. Y el pH, que influye principalmente en el grado de disolución de las nanopartículas, tenderá a mejorar la biodisponibilidad siempre que sus valores favorezcan el proceso de disolución de las nanopartículas (Amde *et al.*, 2017).

Las principales vías de incorporación de las nanopartículas y sus productos de transformación en plantas y microorganismos son la difusión pasiva, la difusión facilitada, el transporte activo y la endocitosis (Schultz *et al.*, 2015). Su incorporación está marcada por el tamaño, el grado de agregación, la carga superficial y el agente estabilizante, después de las transformaciones sufridas en el medio natural que las contiene. De entre

todos estos parámetros, el tamaño de las nanopartículas es el que afecta más significativamente al transporte y a la incorporación de nanopartículas, dado que, para entrar en las células de un organismo, estas partículas de tamaño nanométrico deben atravesar los poros y las membranas celulares, que dependen directamente del tamaño de las nanopartículas (Tripathi *et al.*, 2017). En este sentido, las nanopartículas más pequeñas que contengan el agente de recubrimiento y la carga superficial adecuadas serán incorporadas en el interior de los organismos, con la posibilidad, en el caso de las plantas, de experimentar un proceso de translocación desde la raíz hasta la parte aérea.

Una vez incorporadas al interior del organismo, las nanopartículas pueden experimentar transformaciones idénticas a las que sufren en el medioambiente, y que estarán controladas por los mismos factores.

En la presente Tesis Doctoral, las transformaciones de las nanopartículas tras su exposición a sistemas biológicos como plantas y bacterias se han centrado en las SeNPs, un tipo especial de nanopartículas de metaloide que en los últimos años han despertado un gran interés en la comunidad científica por sus propiedades y prometedoras aplicaciones en múltiples campos, como el de la biomedicina, la industria alimentaria o la agricultura, entre otros. A continuación, se describen las características más relevantes de este tipo de nanopartículas.

2.3. Nanopartículas de selenio

El selenio es un elemento que en concentraciones traza es esencial para los organismos vivos, ya que como componente de las selenoproteínas regula importantes funciones biológicas y bioquímicas como la homeostasis redox, el metabolismo de la hormona tiroidea y la estimulación del sistema inmune para incrementar la producción de anticuerpos (Peñas *et al.*, 2012). Asimismo, se ha demostrado que este elemento también desempeña un papel protector frente al estrés oxidativo y la inflamación crónica, condiciones comúnmente asociadas a varias enfermedades crónicas (Navarro-Alarcon y Cabrera-Vique, 2008). A pesar de esta esencialidad, el selenio presenta carácter tóxico a niveles de concentración más elevados dando lugar a un rango estrecho de concentración de ingesta dietética recomendada. Las estimaciones indican que una ingesta de este elemento superior a 900 µg al día es potencialmente perjudicial para el ser humano, mientras que una ingesta inferior a 30 µg diarios es inadecuada (Fairweather-Tait *et al.*,

2011). Además, se debe tener en cuenta que la toxicidad del selenio depende de la concentración y la forma química en la que esté presente y, en este sentido, las especies orgánicas de selenio han mostrado ser menos tóxicas que las especies inorgánicas (Constantinescu-Aruxandei *et al.*, 2018).

La incorporación del selenio al organismo es a través de la dieta y, su cantidad diaria recomendada varía en función del país, la edad y el sexo (Kipp *et al.*, 2015). En el caso de España, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) es la encargada de establecer la cantidad diaria recomendada de los diferentes minerales. En la Tabla 4 se especifican los valores recomendados para la ingesta diaria de selenio por esta agencia, comparados con los establecidos por la Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética (FESNAD) y por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, *European Food Security Authority*) (Alonso Calleja *et al.*, 2019).

En varias regiones del mundo como Europa, Oriente Medio, Nueva Zelanda y el noroeste de China, el estatus del selenio no es óptimo y, por tanto, su ingesta llega a ser deficiente en la mayor parte de la población (Constantinescu-Aruxandei *et al.*, 2018). Esta situación se debe fundamentalmente a la concentración de selenio en los suelos y, por consiguiente, a la concentración de este elemento en las plantas comestibles cultivadas en ellos. Una estrategia que permite mejorar la ingesta humana de selenio y el estatus de este elemento es la biofortificación, basada en la aplicación tradicional de fertilizantes enriquecidos en selenio en el suelo o en una alternativa, denominada fertilización foliar, que aplica el fertilizante directamente sobre la superficie de las hojas del cultivo (Dhillon *et al.*, 2017). Independientemente del modo de aplicación, a través de esta estrategia se consigue mejorar la concentración de selenio en las plantas, al ser una función de la concentración de este elemento en el suelo, de la forma química en la que se encuentra presente, de su biodisponibilidad, así como de la actividad microbiana del suelo (Winkel *et al.*, 2015). Los fertilizantes más utilizados en la biofortificación de los cultivos son las especies inorgánicas de selenio, prevaleciendo el empleo del selenato frente al selenito, al tratarse de una especie que en el suelo presenta mayor solubilidad y movilidad y, por consiguiente, mayor biodisponibilidad (Schiavon *et al.*, 2020). Fertilizantes verdes u orgánicos enriquecidos en selenio, es decir, plantas enriquecidas en selenio empleadas como abono, también son utilizados al presentar las especies orgánicas menor toxicidad

y mayor biodisponibilidad que las especies inorgánicas de este elemento (Dhillon *et al.*, 2017).

Tabla 4. Cantidad diaria de selenio recomendada según diferentes instituciones nacionales y europeas (Alonso Calleja *et al.*, 2019).

Edad	Sexo	Condición	AESAN	FESNAD (2010)	EFSA (2017)
Valor de referencia			INR*	IDR*	AI*
Unidades			µg día ⁻¹	µg día ⁻¹	µg día ⁻¹
0-6 meses			12	10	
7-12 meses			15	15	15
1-3 años			19	20	15
4-5 años			22	20	20
6-9 años			30	25	35
10-13 años			45	35	55
14-19 años	Mujer		60	45	70
	Hombre		60	50	70
20-29 años	Mujer		55	55	70
	Hombre		70	55	70
30-39 años	Mujer		55	55	70
	Hombre		70	55	70
40-49 años	Mujer		55	55	70
	Hombre		70	55	70
50-59 años	Mujer		55	55	70
	Hombre		70	55	70
60-69 años	Mujer		55	55	70
	Hombre		70	55	70
>70 años	Mujer		55	55	70
	Hombre		70	55	70
	Mujer	Embarazo	60	55	70
		Lactancia	70	70	85

*Ingesta Nutricional de Referencia (INR), Ingesta Dietética de Referencia (IDR) e Ingesta Adecuada (AI, *Adequate Intake*).

La vía de incorporación del selenio por parte de las plantas depende de la forma química en la que se ha suplementado. Mientras los transportadores de sulfato son responsables del transporte de selenato al interior de la planta, debido a la similitud química entre el selenato y el sulfato, se cree que la incorporación del selenito tiene lugar a través de los transportadores de fosfato, localizados en las raíces de las plantas. La incorporación directa de especies orgánicas, como la selenometionina (SeMet, *Selenomethionine*) y la selenocisteína (SeCys, *Selenocysteine*), se realiza por medio de las permeasas de aminoácidos (Natasha *et al.*, 2018). Una vez incorporadas, estas especies de selenio sufren una serie de transformaciones, mediadas por enzimas, que dan lugar a la formación de especies tanto de naturaleza inorgánica como orgánica, y

dentro de esta última se pueden distinguir entre especies volátiles y no volátiles (Figura 4). Las especies de selenio formadas pueden acumularse tanto en la raíz como en la parte aérea de la planta, siendo la translocación del selenio de la raíz a la parte aérea dependiente en gran medida tanto de la especie de planta, como de la forma química de selenio presente en el suelo (Cabannes *et al.*, 2011). Dumont *et al.*, 2006, administraron diferentes formas químicas de selenio a la especie de planta *Brassica juncea* para evaluar la transformación de las especies, así como su distribución en el interior de la planta. Cuando se administró selenato, se observó que en la parte aérea predominaron esta misma especie junto con selenometilselenocisteína (SeMetSeCys, *Selenomethylselenocysteine*) y SeMet, mientras que en la raíz prevalecieron principalmente selenito y en menor medida selenato y SeMet. Por otro lado, al administrar selenito se observó que en la parte aérea había un mayor contenido de este compuesto y SeMet, mientras que en la raíz había principalmente SeMetSeCys seguida de SeMet. Finalmente, tras la suplementación con SeMet se encontró la SeMetSeCys como la especie de selenio predominante.

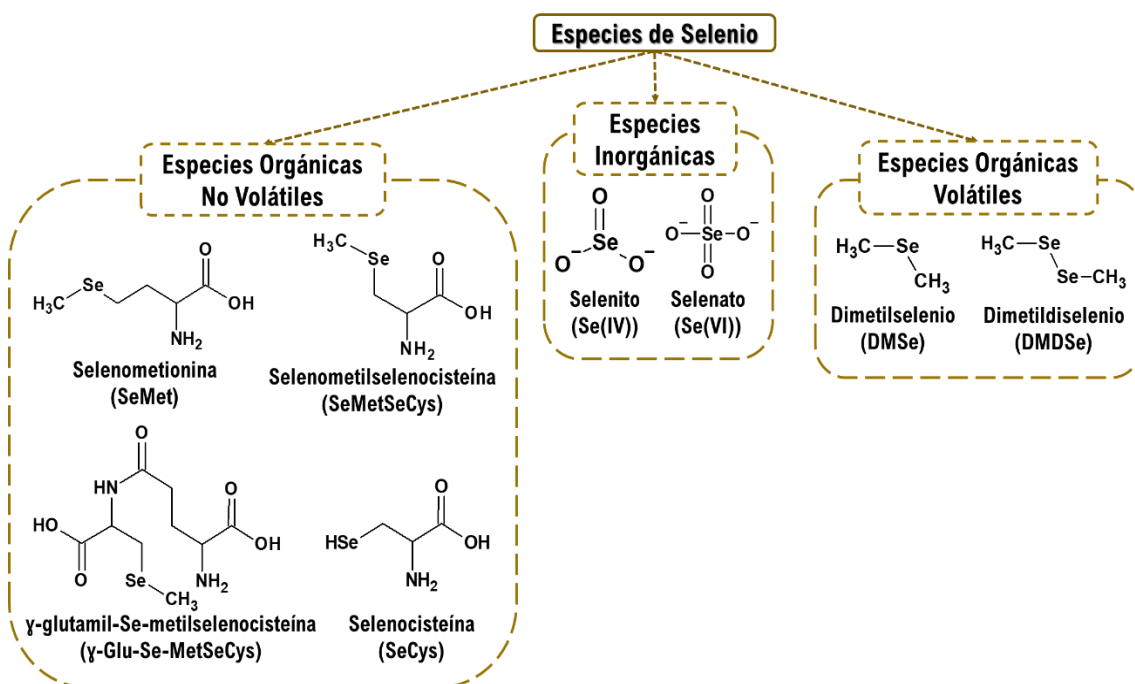


Figura 4. Principales especies de selenio encontradas en plantas y bacterias.

Las principales especies de selenio encontradas en plantas son selenito y/o selenato, SeMet, SeCys, SeMetSeCys y γ -glutamyl-selenometilselenocisteína (γ -Glu-Se-MetSeCys, *γ -Glutamyl-Selenomethyl Selenocysteine*), siendo estas dos últimas características de las plantas acumuladoras (Montes-Bayón *et al.*, 2002). La formación de

SeMet y SeCys tiene especial importancia, ya que ambas están relacionadas con la incorporación del selenio a las proteínas, por su capacidad de sustituir al azufre en biomoléculas gracias a la similitud química entre ambos elementos, permitiendo así incrementar los niveles de selenio en aquellas poblaciones donde su ingesta es insuficiente. Mientras la SeMet puede participar en la síntesis de proteínas, incorporándose de manera inespecífica en el lugar de la metionina, formando las denominadas “proteínas que contienen selenio”, la SeCys, por su parte, se incorpora de forma específica a las proteínas situándose en su centro activo y dando lugar a las conocidas selenoproteínas (Arnér, 2010; Rayman, 2012). Por otro lado, las especies SeMetSeCys y γ -Glu-Se-MetSeCys, y las especies orgánicas volátiles, tales como dimetilselenio (DMSe, *Dimethyl Selenide*), dietilselenio (DESe, *Diethyl Selenide*) y dimetildiselenio (DMDS, *Dimethyl Diselenide*) se producen cuando la planta, frente a ciertos niveles de selenio que comienzan a ser tóxicos, activa un mecanismo de detoxificación por el que convierte el selenio en estos compuestos de menor toxicidad, que o bien acumula en su interior o bien expulsa a la atmósfera (Gupta y Gupta, 2017). En cuanto a las especies SeMetSeCys, caracterizada por sus propiedades anticarcinogénicas, y γ -Glu-Se-MetSeCys, se trata de dos compuestos no proteinogénicos producidos por aquellas plantas que tienen una elevada capacidad para acumular selenio, permitiendo soportar su exposición a altos niveles de este elemento. Cuando las concentraciones de selenio comienzan a ser tóxicas para las plantas, se activa un mecanismo de detoxificación por el que se lleva a cabo la metilación de la SeMet y la SeCys para formar respectivamente los compuestos orgánicos volátiles, DMSe y DMDS, que son emitidos a la atmósfera (Gupta y Gupta, 2017). La formación de estas especies de selenio no solo depende de la forma química y la concentración inicial en la que se encuentre este elemento, sino también de las especies de plantas y los factores del suelo (pH, condiciones de oxidación-reducción, materia orgánica, textura, condiciones microbianas y biológicas) (Natasha *et al.*, 2018).

Los microorganismos y especialmente las bacterias del suelo tienen una estrecha relación con el selenio, dado que este elemento suple tanto las necesidades de nutrientes esenciales como las funciones de generación de energía de las bacterias. Asimismo, el metabolismo bacteriano del selenio muestra similitudes con el de las plantas, al tener capacidad para asimilar selenio inorgánico, tanto selenito como selenato, y transformarlo en especies orgánicas de naturaleza volátil y no volátil. A diferencia de las plantas, las

especies orgánicas no volátiles que se encuentran en las bacterias tras la metabolización del selenio son SeCys y SeMet. En el caso de las especies volátiles, DMSe y DMDSe, su producción se asocia de nuevo a un mecanismo de detoxificación que activan estos microorganismos, ante concentraciones elevadas de este elemento. Además, asociado a este mecanismo de detoxificación, las bacterias son capaces de reducir el selenito a selenio elemental en forma de nanopartículas, una especie menos tóxica que acaban excretando generalmente hacia el medio exterior. De esta manera, las SeNPs se convierten en una nueva especie de este metaloide, que pueden ser asimiladas, transformadas y/o acumuladas por las plantas (Cochran *et al.*, 2017; Staicu *et al.*, 2017).

El crecimiento exponencial de la nanotecnología ha provocado que, en el caso del selenio, el foco de interés se haya puesto sobre las SeNPs. Prueba de ello es que, en los últimos 16 años, el número de publicaciones relacionadas con estas nanopartículas se ha incrementado notablemente como se puede observar en la Figura 5, donde se recoge el número de publicaciones anuales relacionadas con estas nanopartículas. Este creciente interés se debe principalmente a sus excelentes propiedades, tales como sus capacidades antioxidante y antimicrobiana, unidas a su efecto anticarcinogénico y, a su menor toxicidad en comparación con las demás especies orgánicas e inorgánicas de este elemento (Gunti *et al.*, 2019; Khurana *et al.*, 2019).

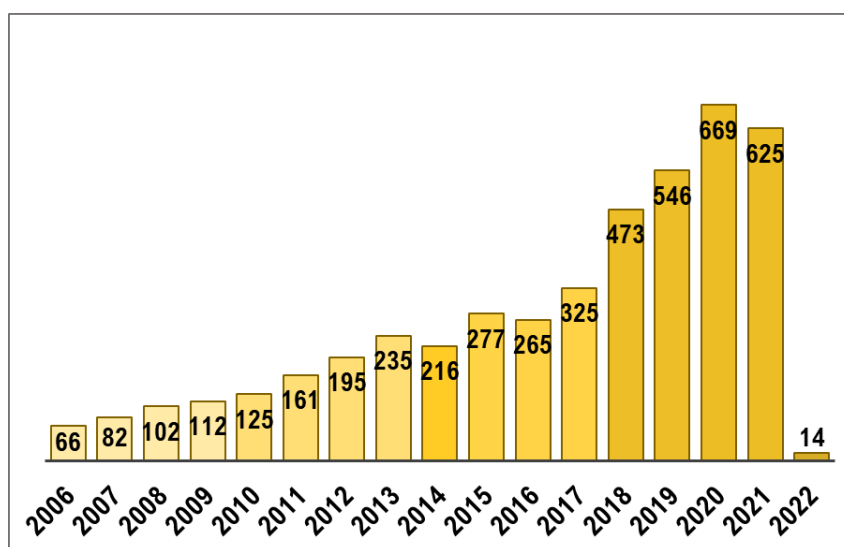


Figura 5. Evolución de las publicaciones dedicadas a SeNPs en los últimos 16 años. Fuente: SCOPUS (fecha de última consulta el 10/11/2021).

La síntesis de SeNPs se puede llevar a cabo a partir de diferentes metodologías que incluyen métodos físicos, químicos y biológicos. Estos dos últimos métodos son los

más utilizados en la síntesis de este tipo de nanopartículas, y los que se han empleado para realizar los diferentes estudios recogidos en la presente Tesis Doctoral. Aunque estos métodos químicos y biológicos se describirán a continuación con más detalle, cabe destacar que, a diferencia de las síntesis física y química, que necesitan condiciones térmicas elevadas, generación de residuos químicos y un pH ácido, el cual no resulta adecuado para aplicaciones biomédicas de estas nanopartículas, la síntesis biológica de SeNPs resulta respetuosa con el medioambiente, barata y no tóxica (Iranifam *et al.*, 2013; Wadhwani *et al.*, 2016). Todos los procedimientos descritos requieren el control de factores como temperatura, pH, concentración del precursor, agente estabilizante y/o tiempo de reacción, que pueden afectar directamente a las propiedades de las nanopartículas, tales como el tamaño, forma, funcionalidad de la superficie y composición (Chiou y Hsu, 2011; Skalickova *et al.*, 2017).

En los métodos químicos, la síntesis de SeNPs más empleada es a través de procesos de oxidación-reducción en disolución acuosa. Se basa en la reducción química de una sal inorgánica de selenio, comúnmente selenito sódico, mediante la acción de un agente reductor (Chhabria y Desai, 2016). Como agentes reductores se han utilizado comúnmente borohidruro sódico, ácido ascórbico, hidracina, citrato sódico y glutatión. Sin embargo, para evitar la toxicidad de alguno de estos compuestos, se ha recurrido a agentes reductores compatibles con la Química Verde como carbohidratos (glucosa (Ingole *et al.*, 2010)), biopolímeros (quitosano (Boroumand *et al.*, 2019)), aminoácidos (L-cisteína (Nonsuwan *et al.*, 2018)), ácido oleico, β -caroteno y alcohol polivinílico, que desempeñan un doble papel al no actuar solo como agentes reductores, sino también como agentes estabilizantes de las nanopartículas (Cavalu *et al.*, 2017). Los agentes estabilizantes juegan un papel muy importante ya que, al recubrir la superficie de las nanopartículas evitan que se produzca su agregación. Además, estos agentes afectan a las propiedades de las nanopartículas al influir en su carga superficial y su tamaño. Asimismo, estos estabilizantes aumentan la reactividad de las nanopartículas, al introducir en su superficie grupos funcionales que van a permitir la unión de diferentes moléculas y biomoléculas, facilitando así su posterior utilización en aplicaciones de distinta naturaleza. Los compuestos más empleados para modificar la superficie de SeNPs, a parte de los ya mencionados, son proteínas (albúmina de suero bovino), polímeros (hidroxietilcelulosa), sacáridos (sacarosa) y tensioactivos no iónicos (Tritón X-100) (Huang *et al.*, 2015; Palomo-Siguero *et al.*, 2016).

Una alternativa a la síntesis química de las SeNPs es la síntesis biogénica. Este tipo de síntesis está en consonancia con los principios de la Química Verde, al reducir tanto el empleo de sustancias químicas como la aplicación de condiciones drásticas de presión y temperatura. La síntesis biogénica utiliza microorganismos tales como hongos, levaduras y bacterias, así como extractos de plantas (Chhabria y Desai, 2016). De entre los microorganismos, las bacterias, tanto Grampositivas como Gramnegativas, son las más utilizadas para sintetizar SeNPs, aprovechando su capacidad para reducir las formas inorgánicas de este elemento (selenito y selenato) a selenio elemental en forma nanoparticulada, como mecanismo de detoxificación. Aunque la síntesis depende de la especie bacteriana, se ha observado que la formación de SeNPs puede ser intracelular, extracelular o estar asociada a la membrana bacteriana (Wadhwani *et al.*, 2016), tal y como se recoge en la Tabla 5. Por su parte, los métodos basados en utilizar extractos de plantas no solo son rápidos, sencillos y baratos, sino que además presentan un alto rendimiento y reducen los gastos derivados del aislamiento de los microorganismos (Korde *et al.*, 2020). En este caso, los componentes bioactivos presentes en los extractos, como flavonoides, alcaloides, fenoles, saponinas, carbohidratos, proteínas, quinina, glucósidos, taninos y esteroides pueden facilitar la síntesis biogénica de SeNPs en un solo paso (Chhabria y Desai, 2016). Varias partes de la planta, como las yemas, las hojas, las semillas y los frutos, así como la cáscara y la pulpa se han utilizado para la síntesis de este tipo de nanopartículas con diferentes morfologías y tamaños, tal y como se muestra en la Tabla 5.

Independientemente de la estrategia de síntesis biogénica seleccionada, las SeNPs obtenidas son más estables debido al recubrimiento natural de su superficie con las moléculas orgánicas y no se agregan con el tiempo, a diferencia de las nanopartículas sintetizadas por vía química donde se quiere la adición externa de agentes estabilizantes (Wadhwani *et al.*, 2016). Sin embargo, el difícil control sobre la distribución del tamaño, la forma y la cristalinidad de las nanopartículas sintetizadas se convierte en un inconveniente y una desventaja de los métodos biogénicos con respecto a los métodos químicos (Narayanan y Sakthivel, 2010).

Las nanopartículas de selenio sintetizadas por vía física, química o biogénica, debido a sus características propiedades, ya mencionadas, han tenido una amplia variedad de aplicaciones científico-tecnológicas en los últimos años como biosensores,

fotocatalizadores, semiconductores, inhibidores de películas antibacterianas, formando parte de células solares y rectificadores, en plantas de tratamiento de agua residual, y en los campos de la electrónica y la xerografía. Asimismo, debido a su menor toxicidad y mayor biodisponibilidad, en comparación con el resto de las especies orgánicas e inorgánicas de selenio, se emplean en diferentes estudios con fines biomédicos y terapéuticos, al mismo tiempo que se convierten en un buen candidato para reemplazar a otras especies de selenio en sus aplicaciones tradicionales como suplementos dietéticos y fertilizantes (Chaudhary y Mehta, 2014; Dwivedi *et al.*, 2013; Ghosh *et al.*, 2015; Khurana *et al.*, 2019; Korde *et al.*, 2020; Panahi-Kalamuei *et al.*, 2014).

Tabla 5. Microorganismos y plantas para la síntesis biogénica de nanopartículas de selenio.

Microorganismos/ Plantas	Tamaño, nm	Forma	Localización	Referencia
BACTERIAS				
GRAMNEGATIVAS				
<i>Zooglea ramigera</i>	30-150*	Esféricas	Extracelular	(Srivastava y Mukhopadhyay, 2013)
<i>Alcaligenes sp.</i>	90-120*	Varilla	Extracto bacteriano	(Mesbahi-Nowrouzi y Mollania, 2018)
<i>Pseudomona alcaliphila</i>	50-500*	Esféricas	Intracelular	(Wenjie Zhang <i>et al.</i> , 2011)
<i>Azospirillum thiophilum</i>	160-250*	Esféricas	Extracelular	(Tugarova <i>et al.</i> , 2018)
<i>Duganella sp.</i>	140-200*	Esféricas	Extracelular y unida a la pared bacteriana	(Bajaj <i>et al.</i> , 2012)
BACTERIAS				
GRAMPOSITIVAS				
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2 y 15	Esféricas	Extracelular	(Alam <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bacillus subtilis</i>	50-400*	Esféricas	Extracelular	(Wang <i>et al.</i> , 2010)
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC393	50-80	Esféricas	Intracelular	(Xu <i>et al.</i> , 2018)
<i>Bacillus cereus</i>	150-200*	Esféricas	Intracelular y unida a la pared bacteriana	(Dhanjal y Cameotra, 2010)
<i>Enterococcus faecalis</i>	29-195*	Esféricas	Extracelular	(Shoeibi y Mashreghi, 2017)
PLANTAS				
<i>Ficus benghalensis</i>	20-140*	Esféricas	Extracto de las hojas	(Tripathi <i>et al.</i> , 2020)
<i>Psidium guajava</i>	8 y 20	Esféricas	Extracto de las hojas	(Alam <i>et al.</i> , 2019)
<i>Allium Sativum</i>	8 y 52	Esféricas	Extracto del capullo	(Vyas <i>et al.</i> , 2018)
<i>Fenugreek</i>	50-150*	Oval	Extracto de las semillas	(Ramamurthy <i>et al.</i> , 2013)
<i>Embilica officinalis</i>	15-40	Esféricas	Extracto de la fruta	(Gunti <i>et al.</i> , 2019)

*Tamaños superiores a 100 nm, pero indicados como nanopartículas.

En el campo de la industria alimentaria, las bacterias del género *Lactobacillus* se utilizan como probióticos por sus beneficios para la salud, debido a sus efectos

inmunomodulador, anticarcinogénico, antimicrobiano y antioxidante. La capacidad de alguna de las especies de este género como *L. bugaricus*, *L. brevis* o *L. plantarum* (Martínez *et al.*, 2020), para acumular selenio y biotransformar las especies inorgánicas de este elemento en especies orgánicas y SeNPs, las convierte en una alternativa para elaborar alimentos funcionales y suplementos dietéticos basados en probióticos enriquecidos en este elemento esencial para los organismos (Pescuma *et al.*, 2017).

En el mundo de la agricultura, cuando se utilizan fertilizantes basados tanto en selenio orgánico como inorgánico, el selenio introducido en el suelo permanece en la capa superior fértil hasta una o, en el mejor de los casos, unas pocas cosechas solamente. A esto se debe añadir que mientras los compuestos inorgánicos se lixivian junto con las lluvias hacia los horizontes menos fértiles del suelo, localizados en las capas inferiores, los compuestos orgánicos, aunque no experimentan el proceso de lixiviación, se degradan con bastante rapidez tras su aplicación. Estos inconvenientes pueden ser solventados en cierta medida incorporando SeNPs a los fertilizantes, ya que no se disuelven en el agua ni en soluciones acuosas, y tampoco se lixivian a capas inferiores del suelo (Gudkov *et al.*, 2020).

Como se ha mencionado, el uso de SeNPs en aplicaciones que abarcan prácticamente todas las áreas científico-tecnológicas conducirá muy probablemente a su liberación en el medioambiente. Una vez en él, estas nanopartículas experimentarán alguno de los procesos de transformación descritos en el Apartado 2.1. y, por lo tanto, podrán interaccionar con diferentes sistemas biológicos, como plantas y bacterias. En el caso de las plantas, la mayoría de los estudios aparecidos en la bibliografía se enfocan en evaluar la acumulación de estas nanopartículas, así como su efecto sobre el crecimiento y la morfogénesis de las plantas (Gudkov *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2018). Por el contrario, muy pocos se han centrado en evaluar las posibles transformaciones que pueden sufrir estas nanopartículas de selenio cuando son acumuladas por las plantas. Mientras Golubkina *et al.*, 2012, observaron la baja capacidad de biotransformación de las nanopartículas de selenio a otras formas orgánicas, tras su aplicación foliar sobre la especie *Allium*, Palomo-Siguero *et al.*, 2015, mostraron la transformación de estas nanopartículas a SeMetSeCys por la especie *Raphanus sativus*, cultivada en medio hidropónico suplementado con estas nanopartículas. Aunque existe una dependencia con la especie de planta y la forma de cultivo, estos estudios ponen de manifiesto que las

plantas son capaces de acumular y biotransformar las SeNPs, lo que va a afectar notablemente a su toxicidad. En el caso de las bacterias, la situación es muy similar, ya que prácticamente todas las investigaciones se basan en utilizar estos microorganismos como herramientas para sintetizar SeNPs de forma biogénica, con el objetivo de evaluar sus propiedades antioxidantes, antibacterianas, anticarcinogénicas, etc., para futuras aplicaciones. De nuevo, Palomo-Siguero y Madrid, 2017, evaluaron el comportamiento y las transformaciones de SeNPs estabilizadas con diferentes agentes de recubrimiento tras su exposición a bacterias ácido-lácticas. Los resultados evidenciaron que las nanopartículas no solo se acumularon en interior de las bacterias, sino que eran transformadas por las bacterias a especies de selenio inorgánico (selenito y selenato) y orgánico (SeMet y SeCys). Todos estos estudios ponen de manifiesto que las bacterias, al igual que las plantas, son capaces de acumular y biotransformar las SeNPs, influyendo así en su toxicidad.

Determinar el contenido total de los elementos traza no ofrece información suficiente sobre su posible función biológica, sus efectos beneficiosos, su toxicidad y/o comportamiento en el medioambiente. Para eso, es imprescindible conocer la forma química en la que se encuentra el elemento de interés una vez ha sido incorporado por los organismos. Esto posibilitará un conocimiento más complejo de los mecanismos de absorción, transporte, almacenamiento y/o excreción. Los estudios de especiación permiten alcanzar ese objetivo dado que tradicionalmente se han utilizado para evaluar las transformaciones químicas de los elementos traza y, por tanto, podrían también aplicarse para estudiar las transformaciones de las SeNPs en diferentes especies de este elemento, cuando son incorporadas por cualquier organismo vivo, tal y como demostraron Palomo-Siguero *et al.*, 2016, 2015; y Palomo-Siguero y Madrid, 2017. La especiación en general, y en el caso del selenio en particular, no es una tarea fácil. La dificultad reside en la necesidad de determinar cada una de las especies de interés a unos niveles de concentración muy pequeños, siendo necesario el empleo de técnicas de elevada sensibilidad y selectividad (Benson *et al.*, 2013; Castañé *et al.*, 2003). A esto se debe añadir, que cualquier etapa que conlleva el proceso analítico puede alterar la forma inicial de las especies y con ello, la representatividad y veracidad del resultado final. Asimismo, la falta de materiales de referencia certificados, para la validación de los resultados, y de patrones comerciales de las distintas especies complican estos estudios.

En el caso del selenio, las etapas de las que constan los estudios de especiación se recogen en la Figura 6. Normalmente, antes de proceder con estos estudios se lleva a cabo la determinación del contenido total de selenio, para así poder establecer qué porcentaje de este elemento añadido ha sido biotransformado por los organismos vivos tras su incorporación (Cabañero *et al.*, 2004; Pedrero *et al.*, 2008, 2007a; Peñas *et al.*, 2012). Para determinar el contenido total de selenio se requiere destruir la matriz orgánica de la muestra mediante una digestión o mineralización, siendo la mineralización por vía húmeda asistida por radiación de microondas el tratamiento más utilizado por su rapidez, eficacia y reproducibilidad.

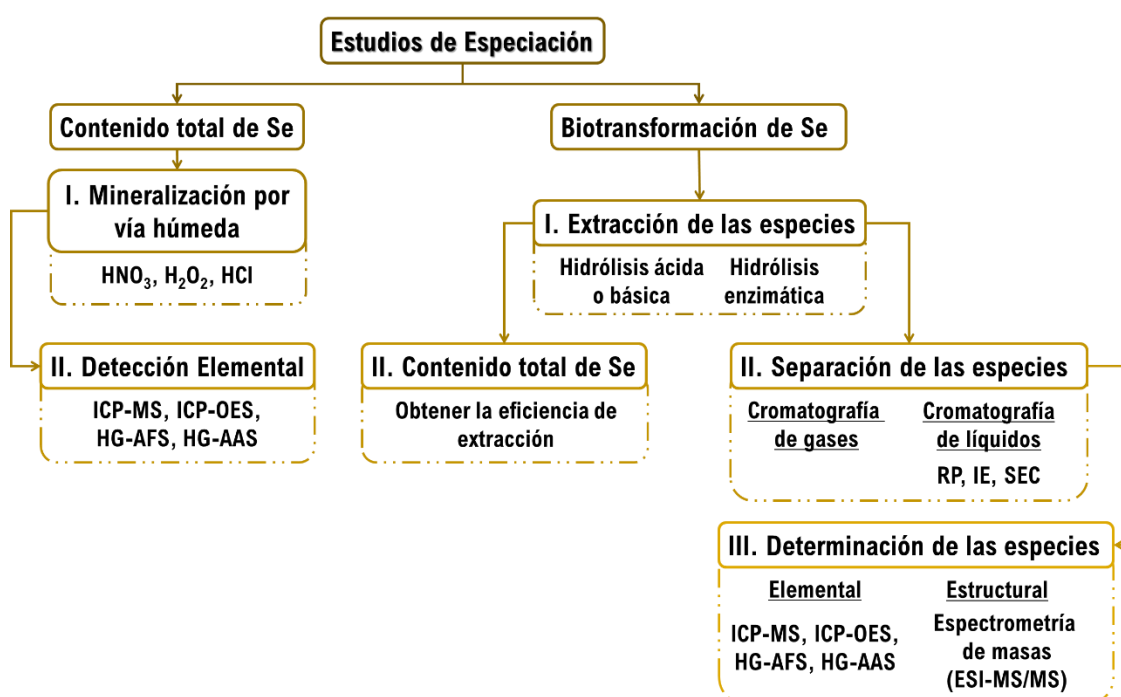


Figura 6. Esquema de las etapas a llevar a cabo en los estudios de especiación de selenio.

En lo que respecta a las etapas que componen el proceso de especiación, la extracción va a depender de la naturaleza de las especies a determinar. En el caso de especies volátiles, la dificultad reside en encontrar un sistema que permita retener estas especies liberadas por los organismos. Una de las metodologías más empleadas para la extracción de compuestos volátiles es la SPME (Dietz *et al.*, 2004). La principal dificultad de la SPME es seleccionar el material de la fibra que permita extraer cuantitativamente estas especies (Dietz *et al.*, 2003). Por otro lado, en lo que respecta a las especies no volátiles, esta etapa de extracción es la más crítica ya que debe extraer cuantitativamente las especies manteniendo la integridad de las mismas. Además, se debe tener en cuenta que para cada matriz el proceso de extracción debe ser optimizado dado que los

rendimientos de extracción pueden variar, aunque se trate de las mismas especies (Pyrzynska y Sentkowska, 2019). Para la extracción de estas especies de selenio, los procesos más empleados son hidrólisis ácidas (con ácido clorhídrico), básicas (con hidróxido de tetrametilamonio (TMAH)) y enzimáticas. Los tratamientos enzimáticos, aunque requieren de un estricto control de determinados parámetros como el pH, la temperatura y el medio de extracción, son los métodos más empleados para extraer las especies de este metaloide al preservar la integridad de las especies en comparación con las hidrólisis ácida y básica (B'Hymer y Caruso, 2006). Por otra parte, muchos de los compuestos orgánicos de interés son selenoaminoácidos de naturaleza proteínogénica. En cuanto al tipo de enzimas seleccionadas, las más utilizadas son las proteasas, es decir, enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos como la proteinasa K (T. Hu *et al.*, 2018), la subtilisina Carlsberg (Cuderman y Stibilj, 2009), la pepsina (Ni *et al.*, 2014) y la pronasa E, también conocida como proteasa tipo XIV aislada de *Streptomyces griseus* (Sele *et al.*, 2018). En muchas ocasiones, debido a la matriz de la muestra, es necesario combinar la acción de las proteasas con otro tipo de enzimas como lipasas (para muestras con alto contenido lipídico) (Zhao *et al.*, 2011), amilasas (para la hidrólisis de glucógeno y almidón) (Fang *et al.*, 2009) y lisozimas (para romper la pared bacteriana) (Kousha *et al.*, 2017).

Los tratamientos enzimáticos para la extracción de las especies de selenio suelen ser largos y tediosos, al implicar largos periodos de incubación que suelen llevarse a cabo a 37°C durante un tiempo comprendido entre 24 y 72 horas. La combinación de estos tratamientos con la energía de ultrasonidos, fundamentalmente la sonda de ultrasonidos, ha permitido realizar la extracción cuantitativa de las especies en un tiempo más reducido, que oscila entre 15 y 180 segundos. Sin embargo, esta reducción del tiempo de extracción viene acompañada por un riesgo de transformación de las especies presentes en la matriz, dado que la energía de ultrasonidos es más agresiva para las muestras (Capelo *et al.*, 2004; Seppänen *et al.*, 2010). Aunque esta metodología, empleando la sonda de ultrasonidos, se ha aplicado para extraer las distintas especies de selenio de diversas matrices biológicas y medioambientales tales como pescados (Vicente-Zurdo *et al.*, 2019), plantas (Both *et al.*, 2020), bacterias (Palomo-Siguero *et al.*, 2016), etc., en los últimos años se está recurriendo de nuevo a la metodología tradicional, basada en la incubación, no solo porque sea menos agresiva para las muestras y minimice la transformación de las especies, sino porque en algunas ocasiones la extracción con la sonda de ultrasonidos

no llega a ser del todo completa y reproducible, posiblemente por el poco tiempo que se deja que las enzimas desempeñen su función.

Una vez realizada la extracción de las especies, es necesario aplicar una etapa de separación previa a su detección y cuantificación. Las técnicas más utilizadas para llevar a cabo estas últimas etapas que componen los estudios de especiación, se han descrito en el Apartado 1.2.

En el caso del selenio, la técnica más utilizada para la separación, detección y cuantificación de las especies no volátiles, ya sean de naturaleza orgánica o inorgánica es HPLC acoplada a ICP-MS. Esta técnica normalmente requiere del empleo de dos mecanismos cromatográficos diferentes, uno de intercambio iónico y otro de fase inversa, para la identificación de las especies. Esto se debe a que cuando se emplea una columna de intercambio iónico, y en muestras que contienen SeCys y SeMet, el patrón de selenocistina, el dímero de la SeCys, utilizado para la identificación del selenoaminoácido, eluye al mismo tiempo de retención que la selenometionina oxidada (SeMetO, *Selenomethionine Oxide*), especie formada principalmente como consecuencia del proceso de extracción (Pedrero *et al.*, 2007c, 2007b). La aplicación de un proceso de carbamidometilación, por el que se protegen los residuos de SeCys altamente reactivos al formar fácilmente enlaces S-Se o Se-Se con otros residuos de SeCys o cisteína, permite identificar con mayor fiabilidad la presencia de SeCys en la muestra, en comparación con el uso del patrón de selenocistina, y además, evita utilizar dos columnas cromatográficas dado que con este proceso el tiempo de retención de la carbamidometil-SeCys (CAM-SeCys, *Carbamidomethyl-selenocysteine*) no coincide con el de la SeMetO (Dernovics y Lobinski, 2008). Sin embargo, para confirmar la presencia de las especies de selenio en la muestra es necesario recurrir a la espectrometría de masas en tándem, como por ejemplo a la técnica HPLC-ESI-MS/MS (Zembrzuska *et al.*, 2014), ya que por HPLC-ICP-MS solo pueden identificarse aquellas especies de las que se dispone un patrón comercial, y su identificación se realiza por coincidencia de los tiempos de retención entre el pico del patrón y el pico de la muestra, y por un aumento en el área del pico de la muestra cuando es enriquecida con dicho patrón (Montes-Bayón *et al.*, 2002).

En cuanto a las especies volátiles de este elemento, la técnica GC-MS es la más utilizada para llevar a cabo su separación, identificación y cuantificación (Burra *et al.*, 2010; Eswayah *et al.*, 2017; Meija *et al.*, 2002). Es cierto, que para confirmar la presencia de

estas especies en la muestra se debería utilizar la técnica GC-MS/MS, sin embargo, las librerías de los compuestos disponibles para GC-MS, junto con el patrón isotópico característico del selenio, hacen que su uso no sea necesario para esa confirmación.

IV.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad-Álvaro, I., Peña-Vázquez, E., Bolea, E., Bermejo-Barrera, P., Castillo, J.R., Laborda, F., 2016. Evaluation of number concentration quantification by single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry: microsecond vs. millisecond dwell times. *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 5089–5097. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9515-y>

Abbas, Q., Liu, G., Yousaf, B., Ali, M.U., Ullah, H., Ahmed, R., 2019. Effects of biochar on uptake, acquisition and translocation of silver nanoparticles in rice (*Oryza sativa* L.) in relation to growth, photosynthetic traits and nutrients displacement. *Environ. Pollut.* 250, 728–736. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.083>

Abbas, Q., Liu, G., Yousaf, B., Ali, M.U., Ullah, H., Mujtaba Munir, M.A., Ahmed, R., Rehman, A., 2020a. Biochar-assisted transformation of engineered-cerium oxide nanoparticles: Effect on wheat growth, photosynthetic traits and cerium accumulation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 187, 109845. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109845>

Abbas, Q., Yousaf, B., Amina, Ali, M.U., Munir, M.A.M., El-Naggar, A., Rinklebe, J., Naushad, M., 2020b. Transformation pathways and fate of engineered nanoparticles (ENPs) in distinct interactive environmental compartments: A review. *Environ. Int.* 138, 105646. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105646>

Afrooz, A.R.M.N., Khan, I.A., Hussain, S.M., Saleh, N.B., 2013. Mechanistic heteroaggregation of gold nanoparticles in a wide range of solution chemistry. *Environ. Sci. Technol.* 47, 1853–1860. <https://doi.org/10.1021/es3032709>

Al-Mubaddel, F.S., Haider, S., Al-Masry, W.A., Al-Zeghayer, Y., Imran, M., Haider, A., Ullah, Z., 2017. Engineered nanostructures: A review of their synthesis, characterization and toxic hazard considerations. *Arab. J. Chem.* 10, S376–S388. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.09.010>

Alam, H., Khatoon, N., Khan, M.A., Husain, S.A., Saravanan, M., Sardar, M., 2020. Synthesis of selenium nanoparticles using probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* and their enhanced antimicrobial activity against resistant bacteria. *J. Clust. Sci.* 31, 1003–1011. <https://doi.org/10.1007/s10876-019-01705-6>

Alam, H., Khatoon, N., Raza, M., Ghosh, P.C., Sardar, M., 2019. Synthesis and characterization of nano selenium using plant biomolecules and their potential applications. *Bionanoscience* 9, 96–104. <https://doi.org/10.1007/s12668-018-0569-5>

Alonso Calleja, C., Cámara Hurtado, M., Daschner, Á., Fernández Escámez, P., Franco Abuín, C.M., Giner Pons, R.M., González Fandos, E., González Muñoz, M.J., López García, E., Mañes Vinuesa, J., Marín Sillué, S., Martínez Hernández, J.A., Morales Navas, F.J., Moreno Arribas, V., Del Puy Portillo Baquedano, M., Rafecas Martínez, M., Rodríguez Lázaro, D., Rubio Armendáriz, C., Ruiz Leal, J., Talens Oliag, P., 2019. Informe del comité científico de la agencia española de seguridad alimentaria y nutrición (AESAN) sobre ingestas nutricionales de referencia para la población española. *Rev. del Com. Científico la AESAN* 29, 43–68.

Amde, M., Liu, J. fu, Tan, Z.Q., Bekana, D., 2017. Transformation and bioavailability of metal oxide nanoparticles in aquatic and terrestrial environments. A review. *Environ. Pollut.* 230, 250–267. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.064>

Amde, M., Tan, Z.Q., Liu, J., 2019. Separation and size characterization of zinc oxide nanoparticles in environmental waters using asymmetrical flow field-flow fractionation. *Talanta* 200, 357–365. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.03.074>

Arnér, E.S.J., 2010. Selenoproteins-What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine?. *Exp. Cell. Res.* 316, 1296–1303. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.032>

Asik, R.M., Gowdhami, B., Jaabir, M.S.M., Archunan, G., Suganthi, N., 2019. Anticancer potential of zinc oxide nanoparticles against cervical carcinoma cells synthesized via biogenic route using aqueous extract of *Gracilaria edulis*. *Mater. Sci. Eng. C* 103, 109840. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109840>

Aznar, R., Barahona, F., Geiss, O., Ponti, J., José Luis, T., Barrero-Moreno, J., 2017. Quantification and size characterisation of silver nanoparticles in environmental aqueous samples and consumer products by single particle-ICPMS. *Talanta* 175, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.048>

B'Hymer, C., Caruso, J.A., 2006. Selenium speciation analysis using inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1114, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.02.063>

Baalousha, M., Stolpe, B., Lead, J.R., 2011. Flow field-flow fractionation for the analysis and characterization of natural colloids and manufactured nanoparticles in

environmental systems: A critical review. *J. Chromatogr. A* 1218, 4078–4103.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.063>

Bajaj, M., Schmidt, S., Winter, J., 2012. Formation of Se (0) nanoparticles by *Duganella* sp. and *Agrobacterium* sp. isolated from Se-laden soil of North-East Punjab, India. *Microb. Cell Fact.* 11, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-64>

Baldassarre, F., Cacciola, M., Ciccarella, G., 2015. A predictive model of iron oxide nanoparticles flocculation tuning Z-potential in aqueous environment for biological application. *J. Nanoparticle Res.* 17, 1–21. <https://doi.org/10.1007/s11051-015-3163-6>

Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., Rizzolio, F., 2020. The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. *Molecules* 25, 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>

Bednar, A.J., Poda, A.R., Mitrano, D.M., Kennedy, A.J., Gray, E.P., Ranville, J.F., Hayes, C.A., Crocker, F.H., Steevens, J.A., 2013. Comparison of on-line detectors for field flow fractionation analysis of nanomaterials. *Talanta* 104, 140–148.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.11.008>

Benson, N.U., Anake, W.U., Olanrewaju, I.O., 2013. Analytical relevance of trace metal speciation in environmental and biophysicochemical systems. *Am. J. Analyt. Chem.* 04, 633–641. <https://doi.org/10.4236/ajac.2013.411075>

Bhatt, I., Tripathi, B.N., 2011. Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment. *Chemosphere* 82, 308–317. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.011>

Bhuvaneshwari, M., Iswarya, V., Archanaa, S., Madhu, G.M., Kumar, G.K.S., Nagarajan, R., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A., 2015. Cytotoxicity of ZnO NPs towards fresh water algae *Scenedesmus obliquus* at low exposure concentrations in UV-C, visible and dark conditions. *Aquat. Toxicol.* 162, 29–38.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.03.004>

Bi, Y., Zaikova, T., Schoepf, J., Herckes, P., Hutchison, J.E., Westerhoff, P., 2017. The efficacy and environmental implications of engineered TiO₂ nanoparticles in a commercial floor coating. *Environ. Sci. Nano* 4, 2030–2042.
<https://doi.org/10.1039/c7en00649g>

Bian, S.W., Mudunkotuwa, I.A., Rupasinghe, T., Grassian, V.H., 2011. Aggregation and dissolution of 4 nm ZnO nanoparticles in aqueous environments: Influence of pH, ionic strength, size, and adsorption of humic acid. *Langmuir* 27, 6059–6068. <https://doi.org/10.1021/la200570n>

Bolaños-Benítez, V., McDermott, F., Gill, L., Knappe, J., 2020. Engineered silver nanoparticle (Ag-NP) behaviour in domestic on-site wastewater treatment plants and in sewage sludge amended-soils. *Sci. Total Environ.* 722, 137794. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137794>

Boroumand, S., Safari, M., Shaabani, E., Shirzad, M., Faridi-Majidi, R., 2019. Selenium nanoparticles: Synthesis, characterization and study of their cytotoxicity, antioxidant and antibacterial activity. *Mater. Res. Express* 6, 0850d8. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab2558>

Both, E.B., Stonehouse, G.C., Lima, L.W., Fakra, S.C., Aguirre, B., Wangeline, A.L., Xiang, J., Yin, H., Jókai, Z., Soós, Á., Dernovics, M., Pilon-Smits, E.A.H., 2020. Selenium tolerance, accumulation, localization and speciation in a Cardamine hyperaccumulator and a non-hyperaccumulator. *Sci. Total Environ.* 703, 135041. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135041>

Brar, S.K., Verma, M., 2011. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. *Trends Analyt. Chem.* 30, 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.08.008>

Burra, R., Pradenas, G.A., Montes, R.A., Vásquez, C.C., Chasteen, T.G., 2010. Production of dimethyl triselenide and dimethyl diselenenyl sulfide in the headspace of metalloids-resistant *Bacillus* species grown in the presence of selenium oxyanions. *Anal. Biochem.* 396, 217–222. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.09.026>

Cabañero, A.I., Madrid, Y., Cámara, C., 2004. Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: An in vitro digestion method. *Anal. Chim. Acta* 526, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.09.039>

Cabannes, E., Buchner, P., Broadley, M.R., Hawkesford, M.J., 2011. A comparison of sulfate and selenium accumulation in relation to the expression of sulfate transporter genes in *Astragalus* species. *Plant Physiol.* 157, 2227–2239. <https://doi.org/10.1104/pp.111.183897>

Canesi, L., Balbi, T., Fabbri, R., Salis, A., Damonte, G., Volland, M., Blasco, J., 2017. Biomolecular coronas in invertebrate species: Implications in the environmental impact of nanoparticles. *NanoImpact* 8, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.08.001>

Capelo, J.L., Ximénez-Embún, P., Madrid-Albarrán, Y., Cámara, C., 2004. Enzymatic probe sonication: Enhancement of protease-catalyzed hydrolysis of selenium bound to proteins in yeast. *Anal. Chem.* 76, 233–237. <https://doi.org/10.1021/ac034871d>

Carney, R.P., Kim, J.Y., Qian, H., Jin, R., Mehenni, H., Stellacci, F., Bakr, O.M., 2011. Determination of nanoparticle size distribution together with density or molecular weight by 2D analytical ultracentrifugation. *Nat. Commun.* 2, 335. <https://doi.org/10.1038/ncomms1338>

Caruso, J.A., Montes-Bayon, M., 2003. Elemental speciation studies - New directions for trace metal analysis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 148–163. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00058-7](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00058-7)

Castañé, P., Topalián, M., Cordero, R., Salibián, A., 2003. Influencia de la especiación de los metales pesados en medio acuático como determinante de su toxicidad. *Rev. Toxicol.* 20, 13–18.

Cavalu, S., Kamel, E., Laslo, V., Fritea, L., Costea, T., Antoniac, I.V., Vasile, E., Antoniac, A., Semenescu, A., Mohan, A., Saceleanu, V., Vicas, S., 2017. Eco-friendly, facile and rapid way for synthesis of selenium nanoparticles production, structural and morphological characterisation. *Rev. de Chim.* 68, 2963–2966. <https://doi.org/10.37358/rc.17.12.6017>

Cervantes-Avilés, P., Huang, Y., Keller, A.A., 2019. Multi-technique approach to study the stability of silver nanoparticles at predicted environmental concentrations in wastewater. *Water Res.* 166, 115072. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115072>

Chaudhary, S., Mehta, S.K., 2014. Selenium nanomaterials: Applications in electronics, catalysis and sensors. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 14, 1658–1674. <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.9128>

Cheng, Y., Yin, L., Lin, S., Wiesner, M., Bernhardt, E., Liu, J., 2011. Toxicity reduction of polymer-stabilized silver nanoparticles by sunlight. *J. Phys. Chem. C* 115,

4425–4432. <https://doi.org/10.1021/jp109789j>

Chhabria, S., Desai, K., 2016. Selenium nanoparticles and their applications, in: Nalwa, H., (Eds.), *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, American Scientific Publisher, pp. 1–32.

Chiou, Y. De, Hsu, Y.J., 2011. Room-temperature synthesis of single-crystalline Se nanorods with remarkable photocatalytic properties. *Appl. Catal. B: Environ* 105, 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2011.04.019>

Clar, J.G., Platten, W.E., Baumann, E., Remsen, A., Harmon, S.M., Rodgers, K., Thomas, T.A., Matheson, J., Luxton, T.P., 2019. Release and transformation of ZnO nanoparticles used in outdoor surface coatings for UV protection. *Sci. Total Environ.* 670, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.189>

Collin, B., Oostveen, E., Tsyusko, O. V., Unrine, J.M., 2014. Influence of natural organic matter and surface charge on the toxicity and bioaccumulation of functionalized ceria nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Sci. Technol.* 48, 1280–1289. <https://doi.org/10.1021/es404503c>

Comisión Europea, 2011. Recomendación de la comisión del 18 de octubre de 2011 relativa a la definición de nanomaterial (2011/696/EU). *Off.J.Eur.Union.* 275/38-275/40.

Constantinescu-Aruxandei, D., Frîncu, R.M., Capră, L., Oancea, F., 2018. Selenium analysis and speciation in dietary supplements based on next-generation selenium ingredients. *Nutrients* 10, 1466. <https://doi.org/10.3390/nu10101466>

Contado, C., 2017. Field flow fractionation techniques to explore the “nano-world.” *Anal. Bioanal. Chem.* 409, 2501–2518. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0180-6>

Conway, J.R., Adeleye, A.S., Gardea-Torresdey, J., Keller, A.A., 2015. Aggregation, dissolution, and transformation of copper nanoparticles in natural waters. *Environ. Sci. Technol.* 49, 2749–2756. <https://doi.org/10.1021/es504918q>

Cornelis, G., Pang, L., Doolette, C., Kirby, J.K., McLaughlin, M.J., 2013. Transport of silver nanoparticles in saturated columns of natural soils. *Sci. Total Environ.* 463–464, 120–130. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.05.089>

Cuderman, P., Stibilj, V., 2009. How critical is the use of commercially available enzymes for selenium speciation? *Anal. Bioanal. Chem.* 393, 1007–1013. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2495-9>

Dasari, T.P., Pathakoti, K., Hwang, H.M., 2013. Determination of the mechanism of photoinduced toxicity of selected metal oxide nanoparticles (ZnO, CuO, Co₃O₄ and TiO₂) to *E. coli* bacteria. *J. Environ. Sci. (China)* 25, 882–888. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(12\)60152-1](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(12)60152-1)

Davarpanah, E., Guilhermino, L., 2019. Are gold nanoparticles and microplastics mixtures more toxic to the marine microalgae *Tetraselmis chuii* than the substances individually? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 181, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.078>

De La Torre Roche, R., Pagano, L., Majumdar, S., Eitzer, B.D., Zuverza-Mena, N., Ma, C., Servin, A.D., Marmioli, N., Dhankher, O.P., White, J.C., 2018. Co-exposure of imidacloprid and nanoparticle Ag or CeO₂ to *Cucurbita pepo* (zucchini): Contaminant bioaccumulation and translocation. *NanoImpact* 11, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2018.07.001>

Deguelldre, C., Favarger, P.Y., 2004. Thorium colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Talanta* 62, 1051–1054. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2003.10.016>

Deguelldre, C., Favarger, P.Y., 2003. Colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectroscopy: A feasibility study. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 217, 137–142. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(02\)00568-X](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00568-X)

Deguelldre, C., Favarger, P.Y., Rossé, R., Wold, S., 2006a. Uranium colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Talanta* 68, 623–628. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.05.006>

Deguelldre, C., Favarger, P.Y., Wold, S., 2006b. Gold colloid analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry in a single particle mode. *Anal. Chim. Acta* 555, 263–268. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.09.021>

Dernovics, M., Lobinski, R., 2008. Characterization of the selenocysteine-containing metabolome in selenium-rich yeast: Part II. on the reliability of the quantitative

determination of selenocysteine. *J. Anal. At. Spectrom.* 23, 744–751.
<https://doi.org/10.1039/b716140a>

Dhanjal, S., Cameotra, S.S., 2010. Aerobic biogenesis of selenium nanospheres by *Bacillus cereus* isolated from coalmine soil. *Microb. Cell Factories* 9, 1–11.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-52>

Dietz, C., Pérez-Corona, T., Madrid-Albarrán, Y., Cámara, C., 2003. SPME for on-line volatile organo-selenium speciation. *J. Anal. At. Spectrom.* 18, 467–473.
<https://doi.org/10.1039/b211460g>

Dietz, C., Sanz Landaluze, J., Ximénez-Embún, P., Madrid-Albarrán, Y., Cámara, C., 2004. Volatile organo-selenium speciation in biological matter by solid phase microextraction-moderate temperature multicapillary gas chromatography with microwave induced plasma atomic emission spectrometry detection. *Anal. Chim. Acta* 501, 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.09.027>

Domingos, R.F., Rafiei, Z., Monteiro, C.E., Khan, M.A.K., Wilkinson, K.J., 2013. Agglomeration and dissolution of zinc oxide nanoparticles: Role of pH, ionic strength and fulvic acid. *Environ. Chem.* 10, 306–312. <https://doi.org/10.1071/EN12202>

Dumont, E., Vanhaecke, F., Cornelis, R., 2006. Selenium speciation from food source to metabolites: A critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* 385, 1304–1323.
<https://doi.org/10.1007/s00216-006-0529-8>

Dutschke, F., Irrgeher, J., Präfrock, D., 2017. Optimisation of an extraction/leaching procedure for the characterisation and quantification of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in aquatic environments using SdFFF-ICP-MS and SEM-EDX analyses. *Anal. Methods* 9, 3626–3635. <https://doi.org/10.1039/c7ay00635g>

Dwivedi, A.D., Dubey, S.P., Sillanpää, M., Kwon, Y.N., Lee, C., Varma, R.S., 2015. Fate of engineered nanoparticles: Implications in the environment. *Coord. Chem. Rev.* 287, 64–78. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.12.014>

Dwivedi, S., AlKhedhairi, A.A., Ahamed, M., Musarrat, J., 2013. Biomimetic synthesis of selenium nanospheres by bacterial strain JS-11 and its role as a biosensor for nanotoxicity assessment: A novel se-bioassay. *PLoS One* 8, 1–10.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057404>

El Badawy, A.M., Luxton, T.P., Silva, R.G., Scheckel, K.G., Suidan, M.T., Tolaymat, T.M., 2010. Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1260–1266. <https://doi.org/10.1021/es902240k>

El Hadri, H., Hackley, V.A., 2017. Investigation of cloud point extraction for the analysis of metallic nanoparticles in a soil matrix. *Environ. Sci. Nano* 4, 105–116. <https://doi.org/10.1039/c6en00322b>

Eswayah, A.S., Smith, T.J., Scheinost, A.C., Hondow, N., Gardiner, P.H.E., 2017. Microbial transformations of selenite by methane-oxidizing bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 6713–6724. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8380-8>

Fairweather-Tait, S.J., Bao, Y., Broadley, M.R., Collings, R., Ford, D., Hesketh, J.E., Hurst, R., 2011. Selenium in human health and disease. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 1337–1383. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3275>

Fang, Y., Zhang, Y., Catron, B., Chan, Q., Hu, Q., Caruso, J.A., 2009. Identification of selenium compounds using HPLC-ICPMS and nano-ESI-MS in selenium-enriched rice via foliar application. *J. Anal. At. Spectrom.* 24, 1657–1664. <https://doi.org/10.1039/b912538h>

Filipe, V., Hawe, A., Jiskoot, W., 2010. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharm. Res.* 27, 796–810. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0073-2>

Gallego-Urrea, J.A., Tuoriniemi, J., Hassellöv, M., 2011. Applications of particle-tracking analysis to the determination of size distributions and concentrations of nanoparticles in environmental, biological and food samples. *Trends Analyt. Chem.* 30, 473–483. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.01.005>

Gardiner, W.P., 1997a, Multivariate analysis methods in chemistry, in: *Statistical analysis methods for chemists*, The Royal Society of Chemistry, pp 293–312

Gardiner, W.P., 1997b, Two-level factorial designs in chemical experimentation, in: *Statistical analysis methods for chemists*, The Royal Society of Chemistry, pp 263–291

Garner, K.L., Keller, A.A., 2014. Emerging patterns for engineered nanomaterials in the environment: A review of fate and toxicity studies. *J. Nanoparticle Res.* 16, 2503. <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2503-2>

Ghosh, S., Jagtap, S., More, P., Shete, U.J., Maheshwari, N.O., Rao, S.J., Kitture, R., Kale, S., Bellare, J., Patil, S., Pal, J.K., Chopade, B.A., 2015. *Dioscorea bulbifera* mediated synthesis of novel Aucore Agshell nanoparticles with potent antibiofilm and antileishmanial activity. *J. Nanomater.* 2015, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2015/562938>

Golubkina, N.A., Folmanis, G.E., Tananaev, I.G., 2012. Comparative evaluation of selenium accumulation by allium species after foliar application of selenium nanoparticles, sodium selenite and sodium selenate. *Dokl. Biol. Sci.* 444, 176–179. <https://doi.org/10.1134/S0012496612030076>

Gondikas, A.P., Von Der Kammer, F., Reed, R.B., Wagner, S., Ranville, J.F., Hofmann, T., 2014. Release of TiO₂ nanoparticles from sunscreens into surface waters: A one-year survey at the old danube recreational lake. *Environ. Sci. Technol.* 48, 5415–5422. <https://doi.org/10.1021/es405596y>

Goswami, L., Kim, K.H., Deep, A., Das, P., Bhattacharya, S.S., Kumar, S., Adelodun, A.A., 2017. Engineered nano particles: Nature, behavior, and effect on the environment. *J. Environ. Manage.* 196, 297–315. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.01.011>

Gottschalk, F., Lassen, C., Kjoelholt, J., Christensen, F., Nowack, B., 2015. Modeling flows and concentrations of nine engineered nanomaterials in the Danish environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12, 5581–5602. <https://doi.org/10.3390/ijerph120505581>

Grombe, R., Charoud-Got, J., Emteborg, H., Linsinger, T.P.J., Seghers, J., Wagner, S., Von Der Kammer, F., Hofmann, T., Dudkiewicz, A., Llinas, M., Solans, C., Lehner, A., Allmaier, G., 2014. Production of reference materials for the detection and size determination of silica nanoparticles in tomato soup. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 3895–3907. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7554-1>

Grün, A.L., Manz, W., Kohl, Y.L., Meier, F., Straskraba, S., Jost, C., Drexel, R., Emmerling, C., 2019. Impact of silver nanoparticles (AgNP) on soil microbial community depending on functionalization, concentration, exposure time, and soil texture. *Environ.*

Sci. Eur. 31, 15. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0196-y>

Gudkov, S. V., Shafeev, G.A., Glinushkin, A.P., Shkirin, A. V., Barmina, E. V., Rakov, I.I., Simakin, A. V., Kislov, A. V., Astashev, M.E., Vodeneev, V.A., Kalinitchenko, V.P., 2020. Production and use of selenium nanoparticles as fertilizers. ACS Omega 5, 17767–17774. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02448>

Gunti, L., Dass, R.S., Kalagatur, N.K., 2019. Phytofabrication of selenium nanoparticles from *emblica officinalis* fruit extract and exploring its biopotential applications: Antioxidant, antimicrobial, and biocompatibility. Front. Microbiol. 10, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00931>

Guo, D., Xie, G., Luo, J., 2014. Mechanical properties of nanoparticles: basics and applications. J. Phys. D 47, 013001. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/47/1/013001>

Gupta, M., Gupta, S., 2017. An overview of selenium uptake, metabolism, and toxicity in plants. Front. Plant Sci. 7, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02074>

Han, P., Wang, X., Cai, L., Tong, M., Kim, H., 2014. Transport and retention behaviors of titanium dioxide nanoparticles in iron oxide-coated quartz sand: Effects of pH, ionic strength, and humic acid. Colloid Surf. A Physicochem. Eng. Asp. 454, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.04.020>

Hassellöv, M., Readman, J.W., Ranville, J.F., Tiede, K., 2008. Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles. Ecotoxicology 17, 344–361. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0225-x>

He, D., Garg, S., Wang, Z., Li, L., Rong, H., Ma, X., Li, G., An, T., Waite, T.D., 2019. Silver sulfide nanoparticles in aqueous environments: Formation, transformation and toxicity. Environ. Sci. Nano 6, 1674–1687. <https://doi.org/10.1039/c9en00138g>

Hetzer, B., Burcza, A., Gräf, V., Walz, E., Greiner, R., 2017. Online-coupling of AF4 and single particle-ICP-MS as an analytical approach for the selective detection of nanosilver release from model food packaging films into food simulants. Food Control 80, 113–124. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.040>

Howard, A.G., 2010. On the challenge of quantifying man-made nanoparticles in the aquatic environment. J. Environ. Monit. 12, 135–142. <https://doi.org/10.1039/b913681a>

Hu, J., Wang, J., Liu, S., Zhang, Z., Zhang, H., Cai, X., Pan, J., Liu, J., 2018. Effect of TiO₂ nanoparticle aggregation on marine microalgae *Isochrysis galbana*. *J. Environ. Sci. (China)* 66, 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.05.026>

Hu, T., Liu, L., Chen, S., Wu, W., Xiang, C., Guo, Y., 2018. Determination of selenium species in *cordyceps militaris* by high-performance liquid chromatography coupled to hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Anal. Lett.* 51, 2316–2330. <https://doi.org/10.1080/00032719.2017.1414827>

Huang, L., Tong, X., Li, Y., Teng, J., Bai, Y., 2015. Preparation of a novel supported selenium nanoparticles adsorbent and its application for copper removal from aqueous solution. *J. Chem. Eng. Data* 60, 151–160. <https://doi.org/10.1021/je500889k>

Huang, X., Li, Y., Chen, K., Chen, Haiyan, Wang, F., Han, X., Zhou, B., Chen, Huilun, Yuan, R., 2020. NOM mitigates the phytotoxicity of AgNPs by regulating rice physiology, root cell wall components and root morphology. *Environ. Pollut.* 260, 113942. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.113942>

Huang, Y., Keller, A.A., Cervantes-Avilés, P., Nelson, J., 2021. Fast Multielement Quantification of nanoparticles in wastewater and sludge using single-particle ICP-MS. *ACS EST Water* 1, 205–213. <https://doi.org/10.1021/acsestwater.0c00083>

Hulla, J.E., Sahu, S.C., Hayes, A.W., 2015. Nanotechnology: History and future. *Hum. Exp. Toxicol.* 34, 1318–1321. <https://doi.org/10.1177/0960327115603588>

Infante, H.G., Borrego, A.A., Peachey, E., Hearn, R., O'Connor, G., Barrera, T.G., Ariza, J.L.G., 2009. Study of the effect of sample preparation and cooking on the selenium speciation of selenized potatoes by HPLC with ICP-MS and electrospray ionization MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 57, 38–45. <https://doi.org/10.1021/jf802650q>

Infante, H.G., O'Connor, G., Rayman, M., Wahlen, R., Entwisle, J., Norris, P., Hearn, R., Catterick, T., 2004. Selenium speciation analysis of selenium-enriched supplements by HPLC with ultrasonic nebulisation ICP-MS and electrospray MS/MS detection. *J. Anal. At. Spectrom.* 19, 1529–1538. <https://doi.org/10.1039/b411270a>

Ingole, A.R., Thakare, S.R., Khati, N.T., Wankhade, A. V., Burghate, D.K., 2010. Green synthesis of selenium nanoparticles under ambient condition. *Chalcogenide Lett.* 7, 485–489.

Iranifam, M., Fathinia, M., Sadeghi Rad, T., Hanifehpour, Y., Khataee, A.R., Joo, S.W., 2013. A novel selenium nanoparticles-enhanced chemiluminescence system for determination of dinitrobutylphenol. *Talanta* 107, 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.12.043>

Jayalath, S., Wu, H., Larsen, S.C., Grassian, V.H., 2018. Surface adsorption of suwannee river humic acid on TiO₂ nanoparticles: A study of pH and particle size. *Langmuir* 34, 3136–3145. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00300>

Jia, J., Li, F., Zhai, S., Zhou, H., Liu, S., Jiang, G., Yan, B., 2017. Susceptibility of overweight mice to liver injury as a result of the ZnO nanoparticle-enhanced liver deposition of Pb²⁺. *Environ. Sci. Technol.* 51, 1775–1784. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05200>

Kápolna, E., Hillestrøm, P.R., Laursen, K.H., Husted, S., Larsen, E.H., 2009. Effect of foliar application of selenium on its uptake and speciation in carrot. *Food Chem.* 115, 1357–1363. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.054>

Ke, L., Yang, D., Gao, G., Wang, H., Yu, Z., Rao, P., Zhou, J., Wang, Q., 2020. Rapid separation and quantification of self-assembled nanoparticles from a liquid food system by capillary zone electrophoresis. *Food Chem.* 319, 126579. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126579>

Khan, I., Saeed, K., Khan, Idrees, 2019. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arab. J. Chem.* 12, 908–931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>

Khan, R., Inam, M.A., Khan, S., Park, D.R., Yeom, I.T., 2019. Interaction between persistent organic pollutants and ZnO NPs in synthetic and natural waters. *Nanomaterials* 9, 472. <https://doi.org/10.3390/nano9030472>

Khurana, A., Tekula, S., Saifi, M.A., Venkatesh, P., Godugu, C., 2019. Therapeutic applications of selenium nanoparticles. *Biomed. Pharmacother.* 111, 802–812. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.146>

Kim, Y.B., Yang, J.S., Moon, M.H., 2018. Investigation of steric transition with field programming in frit inlet asymmetrical flow field-flow fractionation. *J. Chromatogr. A* 1576, 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.09.036>

Kipp, A.P., Strohm, D., Brigelius-Flohé, R., Schomburg, L., Bechthold, A., Leschik-

Bonnet, E., Heseker, H., 2015. Revised reference values for selenium intake. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 32, 195–199. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2015.07.005>

Korde, P., Ghotekar, S., Pagar, T., Pansambal, S., Oza, R., Mane, D., 2020. Plant extract assisted eco-benevolent synthesis of selenium nanoparticles-A review on plant parts involved, characterization and their recent applications. *J. Chem. Rev.* 2, 157–168. <https://doi.org/10.33945/SAMI/JCR.2020.3.3>

Kousha, M., Yeganeh, S., Keramat Amirkolaie, A., 2017. Effect of sodium selenite on the bacteria growth, selenium accumulation, and selenium biotransformation in *Pediococcus acidilactici*. *Food Sci. Biotechnol.* 26, 1013–1018. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0142-y>

Krpeti, L.Z., Davidson, A.M., Volk, M., Lévy, R., Brust, M., Cooper, D.L., 2013. High-resolution sizing of monolayer-protected gold clusters by differential centrifugal sedimentation. *ACS Nano* 7, 8881–8890. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/nn403350v>

Kruszewska, J., Kulpińska, D., Grabowska-Jadach, I., Matczuk, M., 2020. Joint forces of direct, single particle, CE- and HPLC-inductively coupled plasma mass spectrometry techniques for the examination of gold nanoparticle accumulation, distribution and changes inside human cells. *Metallomics* 12, 408–415. <https://doi.org/10.1039/c9mt00309f>

Laborda, F., Bolea, E., 2018. Characterization of engineered nanomaterials, in: Worsfold, P., Poole, C., Townshend, A., Miró, M. (Eds.), *Encyclopedia of Analytical Science*, pp. 108–116. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12677-0>

Laborda, F., Bolea, E., Cepriá, G., Gómez, M.T., Jiménez, M.S., Pérez-Arantegui, J., Castillo, J.R., 2016a. Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples. *Anal. Chim. Acta* 904, 10–32. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.11.008>

Laborda, F., Bolea, E., Jime, J., 2014. Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: A powerful tool for nanoanalysis. *Anal. Chem.* 86, 2270–2278. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1021/ac402980q>

Laborda, F., Bolea, E., Jiménez-Lamana, J., 2016b. Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry for the analysis of inorganic engineered nanoparticles in environmental samples. *Trends Environ. Anal. Chem.* 9, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2016.02.001>

Laborda, F., Gimenez-Ingalaturre, A.C., Bolea, E., Castillo, J.R., 2020. About detectability and limits of detection in single particle inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 169, 105883. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2020.105883>

Laborda, F., Gimenez-Ingalaturre, A.C., Bolea, E., Castillo, J.R., 2019. Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry as screening tool for detection of particles. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 159, 105654. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2019.105654>

Laborda, F., Jiménez-Lamana, J., Bolea, E., Castillo, J.R., 2013. Critical considerations for the determination of nanoparticle number concentrations, size and number size distributions by single particle ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 28, 1220–1232. <https://doi.org/10.1039/c3ja50100k>

Laborda, F., Jiménez-Lamana, J., Bolea, E., Castillo, J.R., 2011. Selective identification, characterization and determination of dissolved silver(i) and silver nanoparticles based on single particle detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 26, 1362–1371. <https://doi.org/10.1039/c0ja00098a>

Laura Soriano, M., Zougagh, M., Valcárcel, M., Ríos, Á., 2018. Analytical nanoscience and nanotechnology: Where we are and where we are heading. *Talanta* 177, 104–121. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.012>

Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., Muller, R.N., 2010. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem. Rev.* 110, 2574. <https://doi.org/10.1021/cr900197g>

Lead, J.R., Batley, G.E., Alvarez, P.J.J., Croteau, M.N., Handy, R.D., McLaughlin, M.J., Judy, J.D., Schirmer, K., 2018. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects—An updated review. *Environ. Toxicol. Chem.* 37, 2029–2063.

<https://doi.org/10.1002/etc.4147>

Lee, S., Kim, Saeyeon, Kim, Sunghyun, Lee, I., 2012. Effects of soil-plant interactive system on response to exposure to ZnO nanoparticles. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 1264–1270. <https://doi.org/10.4014/jmb.1203.03004>

Lei, C., Sun, Y., Tsang, D.C.W., Lin, D., 2018. Environmental transformations and ecological effects of iron-based nanoparticles. *Environ. Pollut.* 232, 10–30. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.052>

Li, K., Chen, Y., 2012. Effect of natural organic matter on the aggregation kinetics of CeO₂ nanoparticles in KCl and CaCl₂ solutions: Measurements and modeling. *J. Hazard. Mater.* 209–210, 264–270. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.01.013>

Lien, H.L., Shih, Y. hsin, Yan, W., Ok, Y.S., 2017. Preface: Environmental nanotechnol. *J. Hazard. Mater.* 322, 1. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.08.017>

Liu, F.K., 2009. Analysis and applications of nanoparticles in the separation sciences: A case of gold nanoparticles. *J. Chromatogr. A* 1216, 9034–9047. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.07.026>

Liu, H., Wang, Xinxin, Wu, Y., Hou, J., Zhang, S., Zhou, N., Wang, Xiangke, 2019. Toxicity responses of different organs of zebrafish (*Danio rerio*) to silver nanoparticles with different particle sizes and surface coatings. *Environ. Pollut.* 246, 414–422. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.034>

Liu, J., Pennell, K.G., Hurt, R.H., 2011. Kinetics and mechanisms of nanosilver oxysulfidation. *Environ. Sci. Technol.* 45, 7345–7353. <https://doi.org/10.1021/es201539s>

Loosli, F., Yi, Z., Wang, J., Baalousha, M., 2019. Dispersion of natural nanomaterials in surface waters for better characterization of their physicochemical properties by AF4-ICP-MS-TEM. *Sci. Total Environ.* 682, 663–672. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.206>

López-Heras, I., Madrid, Y., Cámara, C., 2014. Prospects and difficulties in TiO₂ nanoparticles analysis in cosmetic and food products using asymmetrical flow field-flow fractionation hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta* 124, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.02.029>

López-Sanz, S., Fariñas, N.R., Vargas, R.S., Martín-Doimeadios, R. del C.R., Ríos, A., 2017. Methodology for monitoring gold nanoparticles and dissolved gold species in culture medium and cells used for nanotoxicity tests by liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Talanta* 164, 451–457. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.11.060>

López-Sanz, S., Guzmán Bernardo, F.J., Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C., Ríos, Á., 2019. Analytical metrology for nanomaterials: Present achievements and future challenges. *Anal. Chim. Acta* 1059, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.02.009>

Lowry, G. V., Espinasse, B.P., Badireddy, A.R., Richardson, C.J., Reinsch, B.C., Bryant, L.D., Bone, A.J., Deonaraine, A., Chae, S., Therezien, M., Colman, B.P., Hsu-Kim, H., Bernhardt, E.S., Matson, C.W., Wiesner, M.R., 2012a. Long-term transformation and fate of manufactured Ag nanoparticles in a simulated large scale freshwater emergent wetland. *Environ. Sci. Technol.* 46, 7027–7036. <https://doi.org/10.1021/es204608d>

Lowry, G. V., Gregory, K.B., Apte, S.C., Lead, J.R., 2012b. Transformations of nanomaterials in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 46, 6893–6899. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1021/es300839e>

Luo, P., Morrison, I., Dudkiewicz, A., Tiede, K., Boyes, E., O'Toole, P., Park, S., Boxall, A.B., 2013. Visualization and characterization of engineered nanoparticles in complex environmental and food matrices using atmospheric scanning electron microscopy. *J. Microsc.* 250, 32–41. <https://doi.org/10.1111/jmi.12014>

Lv, J., Zhang, S., Luo, L., Han, W., Zhang, J., Yang, K., Christie, P., 2012. Dissolution and microstructural transformation of ZnO nanoparticles under the influence of phosphate. *Environ. Sci. Technol.* 46, 7215–7221. <https://doi.org/10.1021/es301027a>

Ma, R., Stegemeier, J., Levard, C., Dale, J.G., Noack, C.W., Yang, T., Brown, G.E., Lowry, G. V., 2014. Sulfidation of copper oxide nanoparticles and properties of resulting copper sulfide. *Environ. Sci. Nano* 1, 347–357. <https://doi.org/10.1039/c4en00018h>

Majedi, S.M., Lee, H.K., Kelly, B.C., 2013. Role of water temperature in the fate and transport of zinc oxide nanoparticles in aquatic environment. *J. Phys. Conf. Ser.* 429, 012039. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/429/1/012039>

Makarov, A., Szpunar, J., 1999. Species-selective determination of cobalamin

analogues by reversedphase HPLG with ICP-MS detection. *J. Anal. At. Spectrom.* 14, 1323–1327. <https://doi.org/10.1039/a900633h>

Marcoux, M.A., Matias, M., Olivier, F., Keck, G., 2013. Review and prospect of emerging contaminants in waste - Key issues and challenges linked to their presence in waste treatment schemes: General aspects and focus on nanoparticles. *Waste Manage.* 33, 2147–2156. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.06.022>

Markus, A.A., Krystek, P., Tromp, P.C., Parsons, J.R., Roex, E.W.M., Voogt, P. de, Laane, R.W.P.M., 2018. Determination of metal-based nanoparticles in the river Dommel in the Netherlands via ultrafiltration, HR-ICP-MS and SEM. *Sci. Total Environ.* 631–632, 485–495. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.007>

Martínez, F.G., Moreno-Martin, G., Pescuma, M., Madrid-Albarrán, Y., Mozzi, F., 2020. Biotransformation of selenium by lactic acid bacteria: formation of seleno-nanoparticles and seleno-amino acids. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00506>

Meier, C., Voegelin, A., Pradas Del Real, A., Sarret, G., Mueller, C.R., Kaegi, R., 2016. Transformation of silver nanoparticles in sewage sludge during incineration. *Environ. Sci. Technol.* 50, 3503–3510. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04804>

Meija, J., Montes-Bayón, M., Le Duc, D.L., Terry, N., Caruso, J.A., 2002. Simultaneous monitoring of volatile selenium and sulfur species from se accumulating plants (wild type and genetically modified) by GC/MS and GC/ICPMS using solid-phase microextraction for sample introduction. *Anal. Chem.* 74, 5837–5844. <https://doi.org/10.1021/ac020285t>

Mermet, J.M., Otto, M., Valcárcel, M., 2004a, *Advances chemocetrics*, in: *Analytical chemistry a modern approach to analytical science*, 2° Ed, Wiley-VCH, pp 121-134

Mermet, J.M., Otto, M., Valcárcel, M., 2004b, *Optimization and experimental design*, in: *Analytical chemistry a modern approach to analytical science*, 2ª Ed, Wiley-VCH, pp 149-166

Mesbahi-Nowrouzi, M., Mollania, N., 2018. Purification of selenate reductase from *Alcaligenes* sp. CKCr-6A with the ability to biosynthesis of selenium nanoparticle: Enzymatic behavior study in imidazolium based ionic liquids and organic solvent. *J. Mol.*

Liq. 249, 1254–1262. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.10.117>

Mitrano, D.M., Nowack, B., 2017. The need for a life-cycle based aging paradigm for nanomaterials: Importance of real-world test systems to identify realistic particle transformations. *Nanotechnology* 28, 072001. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/28/7/072001>

Mitrano, D.M., Rimmelé, E., Wichser, A., Erni, R., Height, M., Nowack, B., 2014. Presence of nanoparticles in wash water from conventional silver and nano-silver textiles. *ACS Nano* 8, 7208–7219. <https://doi.org/10.1021/nn502228w>

Mittal, A.K., Chisti, Y., Banerjee, U.C., 2013. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnol. Adv.* 31, 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.003>

Modena, M.M., Rühle, B., Burg, T.P., Wuttke, S., 2019. Nanoparticle characterization: What to measure? *Adv. Mater.* 31, 1901556. <https://doi.org/10.1002/adma.201901556>

Mongay-Fernández, C, 2005a, Principios de quimiometría, in: *Quimiometría, Publicacions de la Universitat de València, España*, pp 19-34

Mongay-Fernández, C, 2005b, Análisis multivariante de la varianza, in: *Quimiometría, Publicacions de la Universitat de València, España*, pp 159-172

Mongay-Fernández, C, 2005c, Análisis de componentes principales, in: *Quimiometría, Publicacions de la Universitat de València, España*, pp 175-194

Montes-Bayón, M., Yanes, E.G., De León, C.P., Jayasimhulu, K., Stalcup, A., Shann, J., Caruso, J.A., 2002. Initial studies of selenium speciation in *Brassica juncea* by LC with ICPMS and ES-MS detection: An approach for phytoremediation studies. *Anal. Chem.* 74, 107–113. <https://doi.org/10.1021/ac0106804>

Morelli, E., Gabellieri, E., Bonomini, A., Tognotti, D., Grassi, G., Corsi, I., 2018. TiO₂ nanoparticles in seawater: Aggregation and interactions with the green alga *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 148, 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.024>

Moreno-Martin, G., Sanz-Landaluze, J., Madrid, Y., 2017. Nanospeciation analysis

using field flow fractionation, in: Meyers, R.A. (Ed.), *Encyclopedia Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9395>

Mourdikoudis, S., Pallares, R.M., Thanh, N.T.K., 2018. Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale* 10, 12871–12934. <https://doi.org/10.1039/c8nr02278j>

Mudalige, T.K., Qu, H., Van Haute, D., Ansar, S.M., Linder, S.W., 2018. Capillary electrophoresis and asymmetric flow field-flow fractionation for size-based separation of engineered metallic nanoparticles: A critical comparative review. *Trends Analyt. Chem.* 106, 202–212. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.07.008>

Narayanan, K.B., Sakthivel, N., 2010. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Adv. Colloid Interface Sci.* 156, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.02.001>

Nasser, F., Constantinou, J., Lynch, I., 2020. Nanomaterials in the environment acquire an “eco-corona” impacting their toxicity to *Daphnia magna*—A call for updating toxicity testing policies. *Proteomics* 20, e1800412. <https://doi.org/10.1002/pmic.201800412>

Natasha, Shahid, M., Niazi, N.K., Khalid, S., Murtaza, B., Bibi, I., Rashid, M.I., 2018. A critical review of selenium biogeochemical behavior in soil-plant system with an inference to human health. *Environ. Pollut.* 234, 915–934. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.019>

Navarro-Alarcon, M., Cabrera-Vique, C., 2008. Selenium in food and the human body: A review. *Sci. Total Environ.* 400, 115–141. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.06.024>

Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N.B., Filser, J., Miao, A.J., Quigg, A., Santschi, P.H., Sigg, L., 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* 17, 372–386. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0214-0>

Ni, Z., Liu, Y., Qu, M., 2014. Determination of 5 natural selenium species in selenium-enriched bamboo shoots using LC-ICP-MS. *Food Sci. Biotechnol.* 23, 1049–1053. <https://doi.org/10.1007/s10068-014-0143-z>

Nonsuwan, P., Puthong, S., Palaga, T., Muangsin, N., 2018. Novel organic/inorganic hybrid flower-like structure of selenium nanoparticles stabilized by pullulan derivatives. *Carbohydr. Polym.* 184, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.029>

Odzak, N., Kistler, D., Behra, R., Sigg, L., 2014. Dissolution of metal and metal oxide nanoparticles in aqueous media. *Environ. Pollut.* 191, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.04.010>

Ogra, Y., Kitaguchi, T., Ishiwata, K., Suzuki, N., Iwashita, Y., Suzuki, K.T., 2007. Identification of selenohomolanthionine in selenium-enriched Japanese pungent radish. *J. Anal. At. Spectrom.* 22, 1390–1396. <https://doi.org/10.1039/b707348h>

Oleszczuk, P., Czech, B., Kończak, M., Bogusz, A., Siatecka, A., Godlewska, P., Wiesner, M., 2019. Impact of ZnO and ZnS nanoparticles in sewage sludge-amended soil on bacteria, plant and invertebrates. *Chemosphere* 237, 124359. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124359>

Ouyang, G., Pawliszyn, J., 2008. A critical review in calibration methods for solid-phase microextraction. *Anal. Chim. Acta* 627, 184–197. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.08.015>

Oza, G., Reyes-Calderón, A., Mewada, A., Arriaga, L.G., Cabrera, G.B., Luna, D.E., Iqbal, H.M.N., Sharon, M., Sharma, A., 2020. Plant-based metal and metal alloy nanoparticle synthesis: a comprehensive mechanistic approach. *J. Mater. Sci.* 55, 1309–1330. <https://doi.org/10.1007/s10853-019-04121-3>

Pace, H.E., Rogers, N.J., Jarolimek, C., Coleman, V.A., Higgins, C.P., Ranville, J.F., 2011. Determining transport efficiency for the purpose of counting and sizing nanoparticles via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chem.* 83, 9361–9369. <https://doi.org/10.1021/ac201952t>

Palomo-Siguero, M., Gutiérrez, A.M., Pérez-Conde, C., Madrid, Y., 2016. Effect of selenite and selenium nanoparticles on lactic bacteria: A multi-analytical study. *Microchem. J.* 126, 488–495. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.01.010>

Palomo-Siguero, M., López-Heras, M.I., Cámara, C., Madrid, Y., 2015. Accumulation and biotransformation of chitosan-modified selenium nanoparticles in

exposed radish (*Raphanus sativus*). *J. Anal. At. Spectrom.* 30, 1237–1244.
<https://doi.org/10.1039/c4ja00407h>

Palomo-Siguero, M., Madrid, Y., 2017. Exploring the behavior and metabolic transformations of SeNPs in exposed lactic acid bacteria. Effect of nanoparticles coating agent. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1712. <https://doi.org/10.3390/ijms18081712>

Panahi-Kalamuei, M., Salavati-Niasari, M., Hosseinpour-Mashkani, S.M., 2014. Facile microwave synthesis, characterization, and solar cell application of selenium nanoparticles. *J. Alloys Compd.* 617, 627–632.
<https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2014.07.174>

Parlamento Europeo, Consejo de la Unión Europea, 2011. Reglamento (UE) N° 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) no 1924/2006 y (CE) no 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 90/496/CEE del Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE, y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) no 608/2004 de la Comisión. *Off. J. Eur. Union.* 2011, 304/18–304/63.

Peachey, E., Cook, K., Castles, A., Hopley, C., Goenaga-Infante, H., 2009. Capabilities of mixed-mode liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry for the simultaneous speciation analysis of inorganic and organically-bound selenium. *J. Chromatogr. A* 1216, 7001–7006.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.08.047>

Pedrero, Z., Elvira, D., Cámara, C., Madrid, Y., 2007a. Selenium transformation studies during Broccoli (*Brassica oleracea*) growing process by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (LC-ICP-MS). *Anal. Chim. Acta* 596, 251–256. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.05.067>

Pedrero, Z., Encinar, J.R., Madrid, Y., Cámara, C., 2007b. Identification of selenium species in selenium-enriched *Lens esculenta* plants by using two-dimensional liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and [⁷⁷Se]selenomethionine selenium oxide spikes. *J. Chromatogr. A* 1139, 247–253.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.031>

Pedrero, Z., Madrid, Y., 2009. Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: A review. *Anal. Chim. Acta* 634, 135–152. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.12.026>

Pedrero, Z., Madrid, Y., Hartikainen, H., Cámara, C., 2008. Protective effect of selenium in broccoli (*Brassica oleracea*) plants subjected to cadmium exposure. *J. Agric. Food Chem.* 56, 266–271. <https://doi.org/10.1021/jf072266w>

Pedrero, Z., Ruiz Encinar, J., Madrid, Y., Cámara, C., 2007c. Application of species-specific isotope dilution analysis to the correction for selenomethionine oxidation in Se-enriched yeast sample extracts during storage. *J. Anal. At. Spectrom.* 22, 1061–1066. <https://doi.org/10.1039/b704807f>

Peñas, E., Martínez-Villaluenga, C., Frias, J., Sánchez-Martínez, M.J., Pérez-Corona, M.T., Madrid, Y., Cámara, C., Vidal-Valverde, C., 2012. Se improves indole glucosinolate hydrolysis products content, Se-methylselenocysteine content, antioxidant capacity and potential anti-inflammatory properties of sauerkraut. *Food Chem.* 132, 907–914. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.064>

Pescuma, M., Gomez-Gomez, B., Perez-Corona, T., Font, G., Madrid, Y., Mozzi, F., 2017. Food prospects of selenium enriched-*Lactobacillus acidophilus* CRL 636 and *Lactobacillus reuteri* CRL 1101. *J. Funct. Foods* 35, 466–473. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.009>

Phenrat, T., Saleh, N., Sirk, K., Tilton, R.D., Lowry, G. V., 2007. Aggregation and sedimentation of aqueous nanoscale zerovalent iron dispersions. *Environ. Sci. Technol.* 41, 284–290. <https://doi.org/10.1021/es061349a>

Philippe, A., Campos, D.A., Guigner, J.M., Buchmann, C., Diehl, D., Schaumann, G.E., 2018. Characterization of the natural colloidal TiO₂ background in soil. *Separations* 5, 1–16. <https://doi.org/10.3390/separations5040050>

Picó, Y., 2016. Challenges in the determination of engineered nanomaterials in foods. *Trends Analyt. Chem.* 84, 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.06.004>

Prasad, A., Lead, J.R., Baalousha, M., 2015. An electron microscopy based method for the detection and quantification of nanomaterial number concentration in environmentally relevant media. *Sci. Total Environ.* 537, 479–486.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.117>

Pulido-Reyes, G., Leganes, F., Fernández-Piñas, F., Rosal, R., 2017. Bio-nano interface and environment: A critical review. *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 3181–3193. <https://doi.org/10.1002/etc.3924>

Pyrzynska, K., Sentkowska, A., 2019. Liquid chromatographic analysis of selenium species in plant materials. *Trends. Analyt. Chem.* 111, 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.011>

Qu, H., Linder, S.W., Mudalige, T.K., 2017. Surface coating and matrix effect on the electrophoretic mobility of gold nanoparticles: a capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry study. *Anal. Bioanal. Chem.* 409, 979–988. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0012-0>

Rabbani, F., Nezhad, M.R.H., Abdollahi, H., 2013. Useful multivariate kinetic analysis: Size determination based on cystein-induced aggregation of gold nanoparticles. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 115, 588–594. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.06.090>

Ramamurthy, C.H., Sampath, K.S., Arunkumar, P., Kumar, M.S., Sujatha, V., Premkumar, K., Thirunavukkarasu, C., 2013. Green synthesis and characterization of selenium nanoparticles and its augmented cytotoxicity with doxorubicin on cancer cells. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 36, 1131–1139. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0867-1>

Rayman, M.P., 2012. Selenium and human health. *Lancet* 379, 1256–1268. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61452-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61452-9)

Rodríguez, M.C., García, R.Á., González, E.B., Bettmer, J.M., Bayón, M., 2020. Análisis elemental en células individuales mediante ICP-MS: Posibilidades y retos actuales. *Actualidad Analítica* 70, 13–16.

Schiavon, M., Nardi, S., dalla Vecchia, F., Ertani, A., 2020. Selenium biofortification in the 21st century: status and challenges for healthy human nutrition. *Plant Soil* 453, 245–270. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04635-9>

Schultz, C., Powell, K., Crossley, A., Jurkschat, K., Kille, P., Morgan, A.J., Read, D., Tyne, W., Lahive, E., Svendsen, C., Spurgeon, D.J., 2015. Analytical approaches to support current understanding of exposure, uptake and distributions of engineered

nanoparticles by aquatic and terrestrial organisms. *Ecotoxicology* 24, 239–261. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1387-3>

Schwertfeger, D.M., Velicogna, J.R., Jesmer, A.H., Saatcioglu, S., McShane, H.A.O., Scroggins, R.P., Princz, J.I., 2017. Extracting metallic nanoparticles from soils for quantitative analysis: Method development using engineered silver nanoparticles and SP-ICP-MS. *Anal. Chem.* 89, 2505–2513. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04668>

Sele, V., Ørnsrud, R., Sloth, J.J., Berntssen, M.H.G., Amlund, H., 2018. Selenium and selenium species in feeds and muscle tissue of Atlantic salmon. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 47, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.02.005>

Seppänen, M.M., Kontturi, J., Heras, I.L., Madrid, Y., Cámara, C., Hartikainen, H., 2010. Agronomic biofortification of Brassica with selenium-enrichment of SeMet and its identification in Brassica seeds and meal. *Plant Soil* 337, 273–283. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0523-y>

Shahzad, A., Saeed, H., Iqtedar, M., Hussain, S.Z., Kaleem, A., Abdullah, R., Sharif, S., Naz, S., Saleem, F., Aihetasham, A., Chaudhary, A., 2019. Size-controlled production of silver nanoparticles by *Aspergillus fumigatus* BTCB10: Likely antibacterial and cytotoxic effects. *J. Nanomater.* 2019, 14. <https://doi.org/10.1155/2019/5168698>

Sharma, R., Bisen, D.P., Shukla, U., Sharma, B.G., 2012. X-ray diffraction: A powerful method of characterizing nanomaterials. *Recent Res. Sci. Technol.* 4, 77–79.

Shoeibi, S., Mashreghi, M., 2017. Biosynthesis of selenium nanoparticles using *Enterococcus faecalis* and evaluation of their antibacterial activities. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 39, 135–139. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.09.003>

Silva, B.F., Andreani, T., Gavina, A., Vieira, M.N., Pereira, C.M., Rocha-Santos, T., Pereira, R., 2016. Toxicological impact of cadmium-based quantum dots towards aquatic biota: Effect of natural sunlight exposure. *Aquat. Toxicol.* 176, 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.05.001>

Skalickova, S., Milosavljevic, V., Cihalova, K., Horky, P., Richtera, L., Adam, V., 2017. Selenium nanoparticles as a nutritional supplement. *Nutrition* 33, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.05.001>

Soler de la Vega, A.C., Cruz-Alcalde, A., Mazón, C.S., Martí, C.B., Diaz-Cruz, M.S.,

2021. Nano-TiO₂ phototoxicity in fresh and seawater: *Daphnia magna* and *artemia* sp. as proxies. *Water* 13, 1–13. <https://doi.org/10.3390/w13010055>

Sötebier, C.A., Weidner, S.M., Jakubowski, N., Panne, U., Bettmer, J., 2016. Separation and quantification of silver nanoparticles and silver ions using reversed phase high performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry in combination with isotope dilution analysis. *J. Chromatogr. A* 1468, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.09.028>

Souza-Silva, É.A., Jiang, R., Rodríguez-Lafuente, A., Gionfriddo, E., Pawliszyn, J., 2015. A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices I. Environmental analysis. *Trends Analyt. Chem.* 71, 224–235. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.016>

Srivastava, N., Mukhopadhyay, M., 2013. Biosynthesis and structural characterization of selenium nanoparticles mediated by *Zooglea ramigera*. *Powder Technol.* 244, 26–29. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2013.03.050>

Szpunar, J., 2000. Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques. *Analyst* 125, 963–988. <https://doi.org/10.1039/a909137h>

Tan, P., Yang, J., Nischwitz, V., 2020. A novel approach for determination of the dissolved and the particulate fractions in aqueous samples by flow field flow fractionation: Via online monitoring of both the cross flow and the detector flow using ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 35, 548–559. <https://doi.org/10.1039/c9ja00313d>

Tan, W., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., 2018. Interaction of titanium dioxide nanoparticles with soil components and plants: Current knowledge and future research needs-a critical review. *Environ. Sci. Nano* 5, 257–278. <https://doi.org/10.1039/c7en00985b>

Tejamaya, M., Römer, I., Merrifield, R.C., Lead, J.R., 2012. Stability of citrate, PVP, and PEG coated silver nanoparticles in ecotoxicology media. *Environ. Sci. Technol.* 46, 7011–7017. <https://doi.org/10.1021/es2038596>

Thiberge, S., Zik, O., Moses, E., 2004. An apparatus for imaging liquids, cells, and other wet samples in the scanning electron microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* 75, 2280–2289. <https://doi.org/10.1063/1.1763262>

Tie, M., Li, B., Zhuang, X., Han, J., Liu, L., Hu, Y., Li, H., 2015. Selenium speciation in soybean by high performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization-tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS). *Microchem. J.* 123, 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.05.017>

Tiede, K., Tear, S.P., David, H., Boxall, A.B.A., 2009. Imaging of engineered nanoparticles and their aggregates under fully liquid conditions in environmental matrices. *Water Res.* 43, 3335–3343. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.04.045>

Titus, D., James Jebaseelan Samuel, E., Roopan, S.M., 2019. Nanoparticle characterization techniques, in: Shukla, A.K., Iravani, S. (Eds.), *Micro and nano technologies, green synthesis, characterization and applications of nanoparticles*. Elsevier Inc., pp. 303–319. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102579-6.00012-5>

Torrent, L., Laborda, F., Marguí, E., Hidalgo, M., Iglesias, M., 2019. Combination of cloud point extraction with single particle inductively coupled plasma mass spectrometry to characterize silver nanoparticles in soil leachates. *Anal. Bioanal. Chem.* 411, 5317–5329. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01914-y>

Trapiella-Alfonso, L., D'Orlyé, F., Varenne, A., 2016. Recent advances in the development of capillary electrophoresis methodologies for optimizing, controlling, and characterizing the synthesis, functionalization, and physicochemical, properties of nanoparticles Young Investigators in Analytical and Bioanaly. *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 2669–2675. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9236-7>

Tripathi, D.K., Shweta, Singh, Shweta, Singh, Swati, Pandey, R., Singh, V.P., Sharma, N.C., Prasad, S.M., Dubey, N.K., Chauhan, D.K., 2017. An overview on manufactured nanoparticles in plants: Uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. *Plant Physiol. Biochem.* 110, 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.07.030>

Tripathi, R.M., Hameed, P., Rao, R.P., Shrivastava, N., Mittal, J., Mohapatra, S., 2020. Biosynthesis of highly stable fluorescent selenium nanoparticles and the evaluation of their photocatalytic degradation of dye. *Bionanoscience* 10, 389–396. <https://doi.org/10.1007/s12668-020-00718-0>

Tsao, T.M., Chen, Y.M., Wang, M.K., 2011. Origin, separation and identification of

environmental nanoparticles: A review. *J. Environ. Monit.* 13, 1156–1163.
<https://doi.org/10.1039/c1em10013k>

Tugarova, A. V., Mamchenkova, P. V., Dyatlova, Y.A., Kamnev, A.A., 2018. FTIR and Raman spectroscopic studies of selenium nanoparticles synthesised by the bacterium *Azospirillum thiophilum*. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 192, 458–463.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.11.050>

Unrine, J.M., Colman, B.P., Bone, A.J., Gondikas, A.P., Matson, C.W., 2012. Biotic and abiotic interactions in aquatic microcosms determine fate and toxicity of ag nanoparticles. Part 1. Aggregation and dissolution. *Environ. Sci. Technol.* 46, 6915–6924.
<https://doi.org/10.1021/es204682q>

Vicente-Zurdo, D., Gómez-Gómez, B., Pérez-Corona, M.T., Madrid, Y., 2019. Impact of fish growing conditions and cooking methods on selenium species in swordfish and salmon fillets. *J. Food Compos. Anal.* 83, 103275.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103275>

Vyas, J., Rana, S., Jay Vyas, C., 2018. Synthesis of selenium nanoparticles using *Allium sativum* extract and analysis of their antimicrobial property against gram positive bacteria. *Pharma Innov. J.* 7, 262–266.

Wadhwani, S.A., Shedbalkar, U.U., Singh, R., Chopade, B.A., 2016. Biogenic selenium nanoparticles: current status and future prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 2555–2566. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7300-7>

Wang, S., Zhao, M., Zhou, M., Li, Y.C., Wang, J., Gao, B., Sato, S., Feng, K., Yin, W., Igalavithana, A.D., Oleszczuk, P., Wang, X., Ok, Y.S., 2019. Biochar-supported nZVI (nZVI/BC) for contaminant removal from soil and water: A critical review. *J. Hazard. Mater.* 373, 820–834. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.03.080>

Wang, T., Yang, L., Zhang, B., Liu, J., 2010. Extracellular biosynthesis and transformation of selenium nanoparticles and application in H₂O₂ biosensor. *Colloids Surf B Biointerfaces* 80, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.05.041>

Wang, Y., O'Reilly, J., Chen, Y., Pawliszyn, J., 2005. Equilibrium in-fibre standardisation technique for solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A* 1072, 13–17.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.12.084>

Wei, G.T., 1999. Shape separation of nanometer gold particles by size-exclusion chromatography. *Anal. Chem.* 71, 2085–2091. <https://doi.org/10.1021/ac990044u>

Weinberg, H., Galyean, A., Leopold, M., 2011. Evaluating engineered nanoparticles in natural waters. *Trends. Analyt. Chem.* 30, 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.09.006>

Winkel, L.H.E., Vriens, B., Jones, G.D., Schneider, L.S., Pilon-Smits, E., Bañuelos, G.S., 2015. Selenium cycling across soil-plant-atmosphere interfaces: A critical review, *Nutrients* 7, 4199–4239. <https://doi.org/10.3390/nu7064199>

Wojcieszek, J., Jiménez-Lamana, J., Bierła, K., Ruzik, L., Asztemborska, M., Jarosz, M., Szpunar, J., 2019. Uptake, translocation, size characterization and localization of cerium oxide nanoparticles in radish (*Raphanus sativus* L.). *Sci. Total Environ.* 683, 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.265>

Xu, C., Guo, Y., Qiao, L., Ma, L., Cheng, Y., Roman, A., 2018. Biogenic synthesis of novel functionalized selenium nanoparticles by *Lactobacillus casei* ATCC 393 and its protective effects on intestinal barrier dysfunction caused by Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *Front. Microbiol.* 9, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01129>

Yang, Y., Luo, L., Li, H.P., Wang, Q., Yang, Z.G., Qu, Z.P., Ding, R., 2018. Analysis of metallic nanoparticles and their ionic counterparts in complex matrix by reversed-phase liquid chromatography coupled to ICP-MS. *Talanta* 182, 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.01.077>

Yates, M.D., Cusick, R.D., Logan, B.E., 2013. Extracellular palladium nanoparticle production using *Geobacter sulfurreducens*. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 1, 1165–1171. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1021/sc4000785>

Zembrzuska, J., Matusiewicz, H., Polkowska-Motrenko, H., Chajduk, E., 2014. Simultaneous quantitation and identification of organic and inorganic selenium in diet supplements by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 142, 178–187. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.004>

Zhang, C., Hu, Z., Deng, B., 2016. Silver nanoparticles in aquatic environments: Physiochemical behavior and antimicrobial mechanisms. *Water Res.* 88, 403–427. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.10.025>

Zhang, G., Zhou, L., Cai, D., Wu, Z., 2018. Anion-responsive carbon nanosystem for controlling selenium fertilizer release and improving selenium utilization efficiency in vegetables. *Carbon* 129, 711–719. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2017.12.062>

Zhang, Wenjie, Chen, Z., Liu, H., Zhang, L., Gao, P., Li, D., 2011. Biosynthesis and structural characteristics of selenium nanoparticles by *Pseudomonas alcaliphila*. *Colloids Surf B Biointerfaces* 88, 196–201. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.06.031>

Zhang, Wen, Yao, Y., Li, K., Huang, Y., Chen, Y., 2011. Influence of dissolved oxygen on aggregation kinetics of citrate-coated silver nanoparticles. *Environ. Pollut.* 159, 3757–3762. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.07.013>

Zhao, W., Ouyang, G., Pawliszyn, J., 2007. Preparation and application of in-fibre internal standardization solid-phase microextraction. *Analyst* 132, 256–261. <https://doi.org/10.1039/b612604a>

Zhao, Y., Zheng, J., Yang, M., Yang, G., Wu, Y., Fu, F., 2011. Speciation analysis of selenium in rice samples by using capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta* 84, 983–988. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.03.004>

Zhou, D., Abdel-Fattah, A.I., Keller, A.A., 2012. Clay particles destabilize engineered nanoparticles in aqueous environments. *Environ. Sci. Technol.* 46, 7520–7526. <https://doi.org/10.1021/es3004427>

Zhou, X., Huang, B., Zhou, T., Liu, Y., Shi, H., 2015. Aggregation behavior of engineered nanoparticles and their impact on activated sludge in wastewater treatment. *Chemosphere* 119, 568–576. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.07.037>

Zhou, X.X., Liu, J.F., Geng, F.L., 2016. Determination of metal oxide nanoparticles and their ionic counterparts in environmental waters by size exclusion chromatography coupled to ICP-MS. *NanoImpact* 1, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2016.02.002>

V.OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral tiene como principal objetivo el desarrollo de métodos analíticos para la caracterización y cuantificación de nanopartículas metálicas (AgNPs y AuNPs) y metaloides (SeNPs) en muestras medioambientales, y la evaluación de las transformaciones de las SeNPs al interaccionar con diferentes sistemas biológicos. Para ello, se han seleccionado muestras de relevancia medioambiental (aguas de río, aguas de grifo y lodos de depuradora), que pueden constituir el destino final de las nanopartículas de amplia aplicación (AgNPs, AuNPs), y sistemas biológicos como plantas y bacterias para el estudio de las transformaciones de las SeNPs.

Para alcanzar este objetivo se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Síntesis y caracterización de las nanopartículas objeto de estudio (AgNPs, AuNPs y SeNPs). Mientras que las AgNPs y AuNPs utilizadas en esta Tesis Doctoral se adquirirán comercialmente, las SeNPs se obtendrán empleando dos metodologías de síntesis: una química, a través de un proceso de oxidación-reducción del selenito empleando ácido ascórbico como reductor y quitosano como agente estabilizante, y otra biogénica, utilizando diferentes bacterias ácido-lácticas suplementadas con distintos niveles de selenio, en forma de selenito. En cualquiera de los casos resulta imprescindible llevar a cabo su caracterización fisicoquímica (tamaño, morfología, estado de agregación, carga superficial y concentración) tanto en el medio de síntesis como en las matrices medioambientales y biológicas donde van a ser expuestas, ya que estas pueden modificar sus propiedades fisicoquímicas originales. Además, los procesos de tratamiento de muestra para aislar las nanopartículas de la matriz para su caracterización pueden alterar dichas propiedades iniciales. Para todos estos escenarios (medios de cultivo, aguas de río, aguas de grifo, lodos de depuradora, extractos de tratamiento de muestra) se aplicará una plataforma multitécnica, que abarca una gran variedad de técnicas complementarias entre sí como son las técnicas de microscopía electrónica (TEM), las técnicas de dispersión de luz (DLS y NTA), la técnica de difracción de rayos X, las técnicas de separación (filtración, ultrafiltración, diálisis y AF⁴), técnicas de espectrofotometría UV-Vis así como la técnica ICP-MS tanto en modo convencional como en modo de detección de partículas individuales (spICP-MS). Esta última constituye una herramienta muy útil para la detección

de nanopartículas a bajos niveles de concentración, para la diferenciación del metal en forma nanoparticulada y disuelta, y para la caracterización en tamaño y número de nanopartículas.

2. Evaluación de las transformaciones metabólicas que experimentan las SeNPs y selenito (este último con fines comparativos) en su interacción con sistemas biológicos (plantas y bacterias). Las plantas seleccionadas fueron *Raphanus sativus* y *Brassica juncea*, la primera es de fácil cultivo y rápido crecimiento, mientras la segunda es considerada una planta hiperacumuladora capaz de acumular elevada cantidad de selenio sin exhibir síntomas de toxicidad. En relación con las bacterias, se seleccionaron bacterias ácido-lácticas (ampliamente utilizadas en la industria alimentaria en procesos fermentativos), y *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, especies bacterianas Gramnegativas y Grampositivas, respectivamente, de interés clínico y medioambiental. Para ello se abordarán aspectos como la viabilidad bacteriana y la tolerancia de las plantas a la presencia de SeNPs y las transformaciones metabólicas de dichas nanopartículas a compuestos orgánicos volátiles y no volátiles (selenoaminoácidos). En este sentido se desarrollarán metodologías analíticas basadas en la SPME-GC-MS (para la detección y cuantificación *in vivo* de especies volátiles de selenio), y HPLC-ICP-MS y HPLC-ESI-MS/MS (para la detección, confirmación y cuantificación de compuestos de selenio no volátiles como los selenoaminoácidos).
3. Análisis y tratamiento de los datos obtenidos mediante el empleo de diversas herramientas estadísticas y quimiométricas, tales como el diseño experimental y las metodologías de análisis de superficie de respuesta. Estas herramientas permiten la optimización simultánea y el estudio de cómo afecta la variación de los factores seleccionados sobre la respuesta analítica a evaluar. Asimismo, emplear la calibración multivariante para la cuantificación de mezclas de nanopartículas por espectrofotometría UV-Vis. Finalmente se aplicará ANOVA y PCA para la evaluación y comparación de datos con el fin de establecer relaciones entre los diferentes factores evaluados (tipo de bacteria o planta, forma de selenio suplementada, especies de selenio formadas, etc.).

VI.OBJECTIVES

The main objective of this Doctoral Thesis is the development of analytical methods for the characterization and quantification of metallic nanoparticles (AgNPs and AuNPs) and metalloid nanoparticles (SeNPs) in environmental samples, as well as the evaluation of the transformations of SeNPs when interacting with different biological systems. For this purpose, environmentally relevant samples (to be river water, tap water and sewage sludge), which may constitute the final fate of widely applied nanoparticles (AgNPs, AuNPs), and biological systems such as plants and bacteria have been selected for the study of SeNPs transformations.

To achieve this objective, the following specific objectives have been established:

1. Synthesis and characterization of the nanoparticles under study (AgNPs, AuNPs and SeNPs). While the AgNPs and AuNPs used in this Doctoral Thesis will be commercially acquired, the SeNPs will be synthesized using two methodologies: a chemical one, through a selenite oxidation-reduction process using ascorbic acid as reductant and chitosan as stabilizing agent, and a biogenic one, using different lactic acid bacteria supplemented with different levels of selenium, in the form of selenite. In either case, it is essential to carry out their physicochemical characterization (size, morphology, state of aggregation, surface charge and concentration) both in the synthesis medium and in the environmental and biological matrices where they will be exposed, since these can modify their original physicochemical properties. In addition, the sample treatment processes employed to isolate the nanoparticles from the matrix aiming characterization can alter these initial properties. For all these scenarios (culture media, river water, tap water, sewage sludge, sample treatment extracts) a multi-technique platform will be applied, covering a wide range of complementary techniques such as electron microscopy techniques (TEM), light scattering techniques (DLS and NTA), X-ray diffraction technique, separation techniques (filtration, ultrafiltration, dialysis and AF⁴), UV-Vis spectrophotometry techniques as well as ICP-MS technique both in conventional and single particle detection mode (spICP-MS). The former is very useful technique for the detection of nanoparticles at low concentration levels, for the differentiation of the metal in nanoparticulate and dissolved form, and for the characterization in size and number of nanoparticles.

2. Evaluation of the metabolic transformations undergone by SeNPs and selenite (the latter one for comparative purposes) in their interaction with biological systems (plants and bacteria). The plants selected were *Raphanus sativus* and *Brassica juncea*, the former can be grown easily and rapidly, while the second one is considered a hyperaccumulator plant capable of accumulating high amounts of selenium without showing symptoms of toxicity. In relation to bacteria, lactic acid bacteria (widely used in the food industry in fermentation processes), along with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, Gram-negative and Gram-positive bacterial species, respectively, of clinical and environmental interest, were selected. To this end, aspects such as bacterial viability and plant tolerance to the presence of SeNPs and the metabolic transformations of these nanoparticles to volatile and non-volatile organic selenium compounds (selenoamino acids) will be addressed. In this sense, analytical methodologies based on SPME-GC-MS (for *in vivo* detection and quantification of volatile selenium species) and HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS/MS (for detection, confirmation, and quantification of non-volatile selenium compounds such as selenoamino acids) will be developed.
3. Analysis and treatment of the data obtained using diverse statistical and chemometric tools, such as experimental design and response surface analysis methodologies, which allowing simultaneous optimization and the study of how the variation of the selected factors affects the analytical response to be evaluated. Likewise, multivariate calibration for the quantification of nanoparticle mixtures by UV-Vis spectrophotometry was employed. And finally, ANOVA and PCA were applied for the evaluation and comparison of data to establish relationships between the different factors evaluated (type of bacteria or plant, form of selenium supplemented, selenium species formed, etc.).

VII. PARTE EXPERIMENTAL

1. DESARROLLO DE PLATAFORMAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS EN MATRICES MEDIOAMBIENTALES

Las nanopartículas son un tipo de nanomateriales que han suscitado un notable interés en la comunidad científica al exhibir unas propiedades únicas, que surgen en la escala nanométrica como consecuencia de la reducción del tamaño. Esto ha supuesto un incremento de su aplicación en una gran variedad de áreas: medicina, medioambiente, alimentación, tecnologías aplicadas a las comunicaciones, energía (como fuente y como medio de distribución, transporte y almacenamiento de ésta), productos de consumo y construcción.

La rápida expansión de la nanotecnología puede ocasionar la llegada de nanopartículas al medioambiente con el consiguiente riesgo para la salud y los ecosistemas. El impacto medioambiental de las nanopartículas viene determinado por sus propiedades fisicoquímicas: composición, tamaño, forma, estado de agregación, o la concentración en número y en masa, entre otras. La correcta caracterización de las nanopartículas no es una tarea fácil, ya que una vez que entran al medioambiente experimentan diversas transformaciones que modifican sus propiedades originales. Además, los niveles de concentración esperados, aunque dependen del tipo de nanopartículas, no son muy elevados.

De entre las nanopartículas más empleadas destacan las AgNPs, que debido a sus excelentes propiedades antimicrobianas están presentes en una amplia variedad de productos médicos, cosméticos, textiles, etc. El tamaño nanométrico de estas partículas hace que presenten propiedades ópticas, como la banda de resonancia de plasmón superficial (SPRB, *Surface Plasmon Resonance Band*). Esta SPRB es función tanto del tamaño como de la concentración de AgNPs, con lo que esta propiedad puede emplearse para estimar de manera simultánea el tamaño y la concentración de AgNPs en muestras de agua. Debido a que la diferencia espectral entre AgNPs de tamaños consecutivos no es significativamente diferente, la aplicación de un método analítico multivariante puede ser necesaria para llevar a cabo dicha estimación. Esta metodología se recoge en el primer trabajo titulado *Simultaneous determination of the size and concentration of AgNPs in water samples by UV-Vis spectrophotometry and chemometrics tools* (*Talanta* 188 (2018) 393–403), y se basa en los cambios que experimenta la SPRB de AgNPs de diferente

tamaño (20, 40, 60 y 80 nm) estabilizadas con citrato, cuando forman estructuras agregadas con el aminoácido L-cisteína. La optimización previa de las condiciones experimentales que afectan a la agregación (tiempo, temperatura, pH y concentración de L-cisteína) se realizó a través de un diseño experimental y la metodología de superficie de respuesta. Las variaciones en el espectro UV-Vis se estudiaron a través de un método cinético de tiempo fijo, donde se evaluó la evolución del espectro resultante de la diferencia de absorbancia entre los espectros completos registrados por espectrofotometría de UV-Vis a tiempo inicial y transcurridos 30 minutos. Bajo las condiciones óptimas establecidas con el diseño experimental y haciendo uso de un diseño de mezclas para la calibración por PLS, se construyó el modelo de calibración multivariante que permitió estimar de manera simultánea el tamaño y la concentración de AgNPs en agua de grifo y aguas de río de diferente naturaleza, y enriquecidas con mezclas individuales, binarias y ternarias de estas nanopartículas estabilizadas tanto con citrato como con PVP. Finalmente, el análisis por TEM de las muestras que mostraron discrepancias entre el valor esperado, y el valor obtenido por el modelo de calibración evidenció la formación de agregados y aglomerados de AgNPs, lo que permitió explicar las diferencias observadas.

Uno de los destinos finales de las nanopartículas son las plantas de tratamiento de aguas residuales. En ellas, los procesos de sedimentación y floculación, tal y como indican diferentes estudios, son los responsables de la sedimentación de las nanopartículas, que mayoritariamente se acaban depositando en los lodos de depuradora. Esto supone un riesgo medioambiental, al convertirse estos lodos en una vía de acceso de las nanopartículas a los ecosistemas naturales, con el consiguiente riesgo para los mismos. Con el fin de llevar a cabo una correcta evaluación de este riesgo, se requiere el desarrollo de métodos analíticos que permitan detectar y cuantificar las nanopartículas presentes en este tipo de matrices. En el segundo trabajo que lleva por título *Characterization of AgNPs and AuNPs in sewage sludge by single particle inductively coupled plasma mass spectrometry* (*Talanta* 238 (2022) 123033), se desarrolló una metodología analítica basada en la extracción de las nanopartículas de los lodos de depuradora, y posterior análisis de los extractos por spICP-MS. En este trabajo además de las AgNPs se seleccionaron las AuNPs, al ser de gran interés en aplicaciones biomédicas. Previamente se realizó una optimización de diferentes factores que afectan al proceso de extracción (agente de extracción, y tiempo y velocidad de centrifugación). La

aplicación de un ANOVA multivariante permitió evaluar el efecto de estos factores sobre la recuperación de las nanopartículas, y seleccionar por tanto las mejores condiciones de trabajo. Bajo las condiciones óptimas, y empleando pirofosfato de sodio (TSPP) como agente extractante, se aislaron las AgNPs y AuNPs con las que se habían enriquecido los lodos de depuradora, obteniendo buenos resultados de recuperación. El método utilizado no modificó ni el tamaño ni la forma original de las nanopartículas tal y como quedó demostrado después de analizar los extractos por TEM y splCP-MS. Con el fin de establecer la estabilidad de las nanopartículas en los lodos de depuradora, se evaluó su posible oxidación a través de su presencia como forma iónica y/o nanoparticulada a lo largo de doce meses y empleando la técnica splCP-MS. Los resultados mostraron que la estabilidad de ambas nanopartículas con el tiempo fue significativamente diferente, siendo más inestables las AgNPs al incrementarse el contenido de su forma iónica a partir de los 6 meses.

A pesar de que los lodos de depuradora constituyen el principal punto donde se acumula la mayor cantidad de las nanopartículas que entran a las plantas de tratamiento de aguas residuales, existen estudios que indican que dependiendo de los tratamientos que estas plantas incorporen, las nanopartículas pueden que no se eliminen y pueden verse al caudal receptor del efluente de la depuradora.

1.1. Determinación simultánea del tamaño y la concentración de AgNPs en muestras de agua por espectrofotometría UV-Vis y herramientas quimiométricas

Simultaneous determination of the size and concentration of AgNPs in water samples by UV-Vis spectrophotometry and chemometrics tools

Gustavo Moreno-Martín, María Eugenia León-González, Yolanda Madrid

Talanta 188 (2018) 393-403

Parte de los resultados de esta investigación se presentaron en:

XXI REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA ANALÍTICA. *Spectroscopic multivariate kinetic analysis of size and concentration of silver nanoparticles. Application to water samples*. Valencia, España, septiembre de 2017. Tipo de comunicación: póster.

9TH FRANCO-SPANISH WORKSHOP ON BIO-INORGANIC ANALYTICAL CHEMISTRY. *Partial least squares a chemometric tool to determine size and concentration of silver nanoparticles in environmental samples*. Huelva, España, septiembre de 2017. Tipo de comunicación: oral.



Simultaneous determination of the size and concentration of AgNPs in water samples by UV–vis spectrophotometry and chemometrics tools

Gustavo Moreno-Martin, María Eugenia León-González, Yolanda Madrid*

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

AgNPs, UV–vis spectrophotometry
Water
Experimental design
Multivariate calibration
PLS

ABSTRACT

The combination of UV–vis spectrophotometry with a chemometric calibration tool based on partial least squares (PLS) has allowed us the development of a multivariate analytical method that simultaneously estimates the concentration and size of mixtures of silver nanoparticles (AgNPs) in environmental water samples. The method is based on changes in the surface plasmon resonance band (SPRB) of AgNPs when they form aggregated/assembled structures with L-cysteine (L-cys). Measurements were performed by employing a fixed-time kinetics method that implies that the final spectra (response) are obtained by subtracting the solutions spectra at fixed times. Optimization of experimental conditions affecting aggregation such as time, temperature, pH and concentration of aggregating substance was performed by experimental design and response surface methodologies (RSM). A multivariate calibration model using AgNPs of known diameter size ((20 ± 3) , (41 ± 3) , (59 ± 5) and (79 ± 7) nm) within a concentration range between 0.62 and 2.5 mg L^{-1} was constructed by using a mixture experimental design and PLS. The method was finally applied to estimate size and concentration of AgNPs in AgNPs-spiked river and tap water samples. Water samples were spiked with individual, binary and ternary mixtures of AgNPs of different sizes and by using two types of AgNPs: citrate-coated AgNPs (cit-AgNPs) and polyvinylpyrrolidone-coated AgNPs (PVP-AgNPs). A good correspondence was obtained between predicted values and the total amount of AgNPs added with recovery values ranged within 80–160% for the individual mixtures, 68–108% for the binary mixtures and 60–64% for the ternary mixtures of AgNPs. Finally, transmission electron microscopy (TEM) measurements were performed for those cases where discrepancies between the expected and the obtained values were observed. TEM micrographs evidenced the presence of agglomerates or aggregates of AgNPs in some of the mixtures or water tested.

1. Introduction

AgNPs have attracted special attention because of their antibacterial properties [1,2] that justify their presence in a wide variety of medical products, gels, textiles, deodorants, air and water filters [3,4]. Their high applicability favors their presence in the environment where they can suffer different processes of transformation (surface modification, aggregation or dissolution) which it may affect to living organisms [5].

The worldwide production of AgNPs has been estimated to be 500 t per year and their widespread applications have resulted in increased silver content of environmental water samples up to levels reported within the ranges of $0.13\text{--}0.16 \text{ mg L}^{-1}$ and $0.13\text{--}20.02 \text{ mg L}^{-1}$ in river and in sewage treatment plants, respectively [6].

The toxicity of AgNPs depends on factors such as size [7], shape [8], coating agent [7,9], surface chemistry, crystallinity [10] as well as the number of particles and the mass concentration in which they are present [11,12]. AgNPs toxicity has been evaluated by means of

performing in vitro and in vivo studies. While most in vitro studies indicate that these nanoparticles are cytotoxics, genotoxics, anti-proliferatives and possibly carcinogenics [11,13], in vivo studies reach frequently contradictory conclusions related to their effects [14,15]. However, both types of studies agree that AgNPs toxicity is due both to the nanoparticle itself and to the ionic silver released from its surface [15,16]. Despite these advances, there is still a lack of studies where factors affecting AgNPs in the environment such as pH, ionic strength and composition, presence of complexing agents and organic matter [17–20] are considered.

Transformation processes of AgNPs in aquatic environment include aggregation, oxidation, dissolution, sulfidation and chlorination. Data based on the exposure of AgNPs to environmental conditions [5,21–26] evidence that the presence of divalent cations principally Ca^{2+} and Mg^{2+} favors NPs aggregation. The exposure of these NPs to light increases their dissolution and oxidation. The presence of dissolved organic matter increases their stability. Additionally, the occurrence of

* Corresponding author.

E-mail address: ymadrid@quim.ucm.es (Y. Madrid).

(in)organic sulfur-containing ligands results in sulfidation of AgNPs and consequently, the formation of silver sulfide nanoparticles (Ag_2S -NPs) or Ag_2S -nanobridges between AgNPs. Finally, the Cl^-/Ag^+ relationship is a determinant factor during chlorination process in water treatment since as the Cl^-/Ag^+ ratio increases, the stability of AgNPs decreases due to the formation of soluble Ag-Cl complexes.

AgNPs characterization (size, morphology and quantification) is usually performed by applying multi-techniques approaches. The most used techniques are electron microscopy techniques such as transmission and scanning electron microscopy (TEM and SEM) that provides information on the shape, size and state of aggregation of the NPs. Single particle ICP-MS enables size and concentration (particles mL^{-1}) determination and also discriminates between the amount of NPs and ionic metal. In spite of these advantages, the technique is dependent on the morphology of NPs and a high dilution of samples is required for performing reliable measurements [22]. Among separation techniques, asymmetrical field flow fractionation (AF^4) and hydrodynamic chromatography (HDC) are the most widely applied for NPs fractionation. Finally, optical techniques based on light scattering such as dynamic light scattering (DLS) and nanoparticle tracking analysis (NTA) provide accurate information on hydrodynamic size. Moreover, NTA not only manages to solve the disadvantages of DLS but also provides NPs concentration, expressed as number of particles. Other optical techniques, such as UV-vis spectrophotometry, RAMAN spectroscopy or fluorescence spectroscopy [27] are employed for NPs characterization. These techniques use an optical characteristic of NPs known as surface plasmon resonance band (SPRB). This SPRB depends on the size, shape and composition of the nanoparticles, and on the characteristics of the surrounding medium (dielectric constant, and pH, mainly) [28,29]. To date, UV-vis spectrophotometry has been mostly used for the qualitative and quantitative determination of analytes that have the ability to cause a change in the SPRB of NPs [30–37]. However, Rabbani et al. [38] developed a spectrometric kinetic method to determine the size of the AuNPs based on the changes observed in their SPBR as consequence of the NPs aggregation when adding L-cys to the NPs-containing medium.

In this work, the variation of optical properties of the AgNPs when they form aggregate/assembled structures with a thiolated compound such as L-cysteine was used for developing a multivariate analytical method using PLS calibration to simultaneously determine the size and the concentration of AgNPs with different coating agent (PVP-AgNPs and citrate-AgNPs). The method was applied to determine concentration and size of AgNPs in different water samples (river waters and tap water) spiked with mixtures of AgNPs of different sizes and at different levels of concentration. The results obtained were compared with those provided by other techniques such as transmission electron microscopy.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and materials

All reagents and solvents were of analytical grade, and purified water ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) from a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA) was used in all procedures unless otherwise was indicated. Hydrochloric acid (HCl, 36.5–38%), nitric acid (HNO_3 , 66% w/w) and formic acid (98–100%) were provided by Scharlau (Barcelona, Spain). Acetic glacial acid of HPLC grade, orto-phosphoric acid (H_3PO_4 , 85%) and trichloroacetic acid were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). L-cys from non-animal source, sodium hydroxide (NaOH) and ammonium formate (97%) were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Trifluoroacetic acid of HPLC grade (TFA, $\geq 99.0\%$) was purchased from Merck (Madrid, Spain).

Both H_3PO_4 (adjusted at pH 3.00, with NaOH) and L-cys solutions were daily prepared and stored at 4°C .

Two types of AgNPs were employed in the current study with the aim of evaluating the effect of the stabilizing agent. Monodispersed

citrate-coated silver nanoparticles standards (cit-AgNPs) with nominal diameter sizes of 20 nm (20 ± 3), 40 nm (41 ± 3), 60 nm (59 ± 5) and 80 nm (79 ± 7) at a nominal concentration of 20 mg L^{-1} were acquired from nano-Composix (Sand Diego, CA). From the same supplier, monodispersed polyvinylpyrrolidone (40 kDa)-coated silver nanoparticles (PVP-AgNPs) with a nominal diameter size of 40 nm (41 ± 3) and a nominal concentration of 20 mg L^{-1} were also acquired. The stock solutions of both AgNPs were stored at 4°C in amber tubes to protect nanoparticles from light exposure.

Nylon membrane filters from Scharlau (Barcelona, Spain) with $0.45 \mu\text{m}$ diameter pore size and 47 mm diameter were used to filter L-cys and H_3PO_4 solutions. Nylon membrane filters purchased from Scharlau (Barcelona, Spain) with $0.22 \mu\text{m}$ diameter pore size and 25 mm of diameter were also employed for water samples filtration.

All lab-ware for experiments were cleaned in 10% v/v HNO_3 and rinsed in Milli-Q water.

2.2. Instrumentation

Variations in SPRBs were measured with a diode array HP8543 UV-Vis spectrophotometer (Agilent Technologies) by means of the HP Chemstation software and by using a suprasil quartz cuvette model 110-QS with an optical path of 10 mm. The cuvette was cleaned with 10% v/v HNO_3 and H_3PO_4 at pH 3.00 and finally rinsed with Milli-Q water between measurements to avoid memory effect.

The electron micrographs of the different AgNPs mixtures were obtained using a high resolution transmission electron microscope (JEOL JEM 2100, USA) operated at 200 kV and equipped with an X-ray energy dispersive spectroscopy (XEDS) microanalysis composition system (Oxford Inca, city).

The pH of the phosphoric acid solutions and the water samples was measured using a Crison pH-meter model Basic 20, equipped with a Crison 50–10 glass combination electrode (Barcelona, Spain).

The conductivity of water samples was measured using an Aqualityc conductivity meter, model CD-22, equipped with a glass electrode that includes a temperature sensor (Dortmund, Germany).

2.3. Experimental procedures

2.3.1. Multivariate determination by using a fixed-time kinetics method

Solutions for performing UV-vis measurements were prepared in polypropylene tubes previously wrapped with aluminum foil to prevent AgNPs oxidation. Protecting AgNPs against light exposure is recommended when analysing AgNPs in water samples since AgNPs transformation in the laboratory during storage and measurement steps could lead to erroneous conclusions of the impact of AgNPs in the environment. Both phosphoric acid at pH 3.00 and L-cys solutions at a concentration levels of 17.6 mM and 51.6 mg L^{-1} , respectively were kept in a thermostatic bath at 25°C during measurements and they were always added in that order to the tubes. AgNPs were first dispersed in water under vortexing for 30 s following the manufacturer's instructions and subsequently incorporated to the L-cys + H_3PO_4 mixture to get a concentration range between 0.62 and 2.5 mg L^{-1} . Then Milli-Q water was added until the final volume is 5 mL.

The method applied is based on changes in the surface plasmon resonance band (SPRB) of AgNPs when they form aggregated/ assembled structures with L-cysteine (L-cys). For this purpose, once mixtures containing L-cys + H_3PO_4 and AgNPs were prepared, UV-vis spectra of the resulting aggregation products were recorded between 260 and 800 nm by employing a fixed-time kinetics method. Based on that, spectra were recorded immediately after preparation of mixture preparation (t_0) and after thirty minutes (t_{30}). The choice of 0 and 30 min is based on the fact that beyond 30 min changes in the spectra were negligible. Afterwards, UV-VIS spectra at (t_0) and (t_{30}) were subtracted and the resulting data; $\Delta[P]$, can be linearly related to the concentration AgNPs according to the Eq. (1) and by keeping constant

Δt .

$$v = \frac{\Delta[P]}{\Delta t} = k [\text{AgNPs}] \quad (1)$$

Since the spectroscopic behavior of AgNPs in presence of L-cys is dependent not only on AgNPs concentration but also on their size, these differences can be used to make a multivariate determination by using the full spectra through a PLS approach (Eq. (2)).

$$C = AB \quad (2)$$

where C is the concentration matrix, A is the matrix of the subtracted spectra and B is the regressor matrix of B-coefficients.

Correction of baseline shift was applied when needed by using a wavelength at where absorbance attributed to sample, L-cys or H_3PO_4 is negligible.

Statgraphics Centurion XVII version 17.01.0012, running under Windows10 was employed for data treatment.

2.3.2. Factorial experimental designs conditions

In this study, a three-level factorial design was developed to optimize the concentration of acid (H_3PO_4 solution) and aggregating compound (L-cys). Both parameters will affect the aggregation of AgNPs and consequently their optical properties. For this purpose, two sets of nine experiments were performed by using 20 nm cit-AgNPs and 80 nm cit-AgNPs, both at a fixed concentration of 1.0 mg L^{-1} cit-AgNPs, to maintain a linear relationship between concentration and signal. The signals obtained at 390, 460, 660 and 700 nm after subtracting the spectra collected at t_0 and t_{30} were selected as responses. The optimization criteria were based on selecting those conditions providing the maximum differences on experimental response for each AgNPs size. The experimental ranges and levels of the independent variables selected are given in Table 1.

2.3.3. Multivariate calibration. Analytical characteristics

A multivariate calibration model based on PLS was developed under the conditions optimized in Section 2.3.2. Firstly, a lattice design based on a Simplex-centroid plus three replicate center points was chosen to select the calibration mixtures. A set of 18 calibration mixtures to which three more were added containing cit-AgNPs of different diameters size (20, 40, 60 and 80 nm) were prepared at concentration values ranged between 0.62 and 2.5 mg L^{-1} . The spectra between 260 and 800 nm at t_0 and t_{30} were recorded and subtracted. A principal component analysis was then performed by using the t_0 and t_{30} subtracted spectra from each of the calibration points in order to determine whether the use of full spectra is required for calibration as well as to select the number of components explaining the model. Finally, the prediction error sum of squares (PRESS) of calibration model was calculated to select the appropriate number of factors. The experimental range and levels of the dependent variables for the calibration model are showed in Table 2.

Validation of the calibration model was performed under optimal experimental conditions obtained in the calibration and in Section 2.3.2. The validation set consists of nine mixtures including individual, binary and ternary combinations of the four sizes of AgNPs at a total

Table 1
Modelling set for the factorial experimental design.

	Phosphoric acid (mM)	L-cys (mg L^{-1})
1	12.9 (0)	37 (− 1)
2	8.3 (− 1)	77 (1)
3	17.6 (1)	77 (1)
4	12.9 (0)	57 (0)
5	12.9 (0)	77 (1)
6	17.6 (1)	57 (0)
7	8.3 (− 1)	37 (− 1)
8	8.3 (− 1)	57 (0)
9	17.6 (1)	37 (− 1)

Table 2

Calibration mixtures composition.

	20 nm AgNPs (mg L^{-1})	40 nm AgNPs (mg L^{-1})	60 nm AgNPs (mg L^{-1})	80 nm AgNPs (mg L^{-1})
1	0 (0)	2.5 (1)	0 (0)	0 (0)
2	0 (0)	1.25 (0.5)	0 (0)	1.25 (0.5)
3	1.25 (0.5)	0 (0)	1.25 (0.5)	0 (0)
4	0 (0)	0 (0)	2.5 (1)	0 (0)
5	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2.5 (1)
6	2.5 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
7	0.83 (0.33)	0.83 (0.33)	0 (0)	0.83 (0.33)
8	0.62 (0.25)	0.62 (0.25)	0.62 (0.25)	0.62 (0.25)
9	0 (0)	0.83 (0.33)	0.83 (0.33)	0.83 (0.33)
10	0.83 (0.33)	0.83 (0.33)	0.83 (0.33)	0 (0)
11	1.25 (0.5)	1.25 (0.5)	0 (0)	0 (0)
12	0 (0)	0 (0)	1.25 (0.5)	1.25 (0.5)
13	0.83 (0.33)	0 (0)	0.83 (0.33)	0.83 (0.33)
14	1.25 (0.5)	0 (0)	0 (0)	1.25 (0.5)
15	0 (0)	1.25 (0.5)	1.25 (0.5)	0 (0)
16	2.5 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
17	0 (0)	2.5 (1)	0 (0)	0 (0)
18	0 (0)	0 (0)	2.5 (1)	0 (0)
19	0 (0)	0 (0)	1.25 (0.5)	0 (0)
20	0.83 (0.33)	0.83 (0.33)	0 (0)	0.83 (0.33)
21	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1.25 (0.5)

concentration within the calibration range. The results were analyzed by comparing the percentage of error obtained between the total amount of AgNPs added and the total amount of AgNPs predicted by the calibration model with the PRESS value.

Method performance was evaluated in terms of reproducibility, detection limit (LOD), precision, selectivity and recovery. Reproducibility was evaluated by a set of 12 binary mixtures (containing AgNPs of two diameter sizes) in which all possible combinations between 20, 40, 60 and 80 nm cit-AgNPs were included. The evaluation of the results was carried out under the same conditions as the validation set.

LODs were calculated to full spectrum using the validation and reproducibility mixtures where the size of AgNP of interest was not present and by applying the criteria of 2 SD where the standard deviation (SD) was estimated from the mean values of the mixtures.

The precision was evaluated for each size of nanoparticle by using ternary mixtures containing AgNPs of three different sizes at a concentration range of 0.83 mg L^{-1} . The intra-day precision was estimated by recording the full spectrum of three samples on the same day. Inter-day variation was similarly performed for two successive days (three samples with ternary mixtures per day, $N = 6$).

To evaluate the selectivity of the method, ionic silver and titanium dioxide nanoparticles (TiO_2NPs) were selected as interferents. For this purpose, water samples were spiked with each of these analytes, both in the absence and in the presence of cit-AgNPs and at the same concentration range. The evaluation of the results was carried out following the protocol previously described in the validation set.

To calculate the recovery based on the total and individual amount of AgNPs, the amount added and the amount found by the model in each of the samples that constitute the validation set were taken into account.

2.3.4. Collection of water samples and characterization

The applicability of the optimized method was evaluated with water samples of different nature, river and tap waters. River water samples were collected in Valdemoro del Rey located in Cuenca (Spain) ($40^\circ 14' 95'' \text{ N } 02^\circ 37' 31'' \text{ W}$) (named as river water 1 throughout the manuscript) and in Robledo de Chavela located in Madrid (Spain) (named as river water 2 throughout the manuscript). Tap water samples from the Faculty of Chemical Sciences of Complutense University of Madrid ($40^\circ 27' 01'' \text{ N } 03^\circ 43' 31'' \text{ W}$) were sampled from the tap and letting the water run for approximately 30 s. All samples were collected in low-

density polyethylene bottles and stored at 4 °C until use.

The samples were characterized based on the pH and conductivity parameters measured according to UNE 77305: 1999 and UNE 77308: 2001, methods respectively. Determinations were performed in triplicate.

2.3.5. Preparation of AgNPs-spiked water samples. UV-vis measurements

About 100 mL of each type of water were filtered through 0.22 µm nylon filters. Once filtered, water samples were adjusted to pH 3.00 with HCl and measured as described in Section 2.3.1 but employing water samples instead of Milli-Q water to make up to the final volume. Samples were kept at 25 °C into a thermostatic bath during measuring process. Blank water samples containing all components except nanoparticles were also analyzed.

The precision was evaluated for each size of nanoparticle in the different water samples spiked with individual, binary and ternary mixtures of cit-AgNPs at a concentration range covering 0.83–2.0 mg L⁻¹, depending on the size of each nanoparticle. The intra-day precision was estimated by recording the full spectrum of three samples containing individual, binary or ternary mixtures of the nanoparticles (N = 3) on the same day. Inter-day variation was similarly performed for two successive days (three samples with mixtures per day, N = 6).

The recovery based on the total and individual amount of AgNPs was evaluated taking into account the amount added to each of the samples and the amount found by the calibration model in each case.

2.3.6. Effect of capping agent of silver nanoparticles

Water samples enriched with 1.25 mg L⁻¹ of PVP-AgNPs were measured following the procedure described in Section 2.3.1.

3. Results and discussion

3.1. pH-induced aggregation AgNPs and UV-vis absorbance characterization

Changes in the optical properties of AgNPs and, specifically, in the SPRB can be associated with the size and concentration of NPs and the characteristics of surrounding medium (pH, organic matter concentration, conductivity) [39]. In this study, preliminary results from UV-vis spectra of commercial cit-AgNPs of 20, 40, 60 and 80 nm evidenced that SPRB shows special features depending on diameter size of AgNPs. Based on that, the effect of pH and the nature of the acid on SPRBs of AgNPs were evaluated. In a first assay, AgNPs were exposed to a solution of 0.1% TFA at pH 2.32 and a solution of 11 mM ammonium formate at pH 6.10. No changes in SPRB wavelength of AgNPs was detected when using ammonium formate. However, in presence of TFA a wavelength shift towards longer wavelengths of the SPRB that was associated with NPs aggregation was observed. The results obtained led us to perform a more complete study including acids of organic nature (trichloroacetic acid, formic acid and glacial acetic acid, all of them at a concentration of 0.1% and at pH 2.32) and mineral acids (HCl and H₃PO₄ at a concentration level of 4.80 and 8.30 mM leading to pH values of 2.32 and 3.00, respectively). Moreover, as nanoparticles aggregation is a kinetic process that depends on time and temperature, UV-vis spectra of the nanoparticles exposed to each of the acids was registered at 0, 30 and 60 min and solutions were kept at 25 °C in a thermostatic bath during measurements. Globally, the spectra showed a wavelength displacement of the SPRB towards longer wavelengths that kept constant after 30 min. Among acids tested, the phosphoric acid at pH 3.00 was selected because it provided the best results related to displacement of SPRB of the different sized AgNPs.

3.2. L-cysteine-induced aggregation of AgNPs. Characterization and selection of analytical wavelengths. Experimental design

Several papers appeared in the literature have evidenced that the presence of L-cys induced also NPs aggregation [40,41]. This behavior has been observed with citrate-AuNPs solution and it was attributed to a displacement of the citrate from nanoparticles surface by the L-cys molecules, resulting in NPs aggregation through hydrogen bonds or through electrostatic interactions between the thiol-containing molecules not covalently adsorbed [38]. This effect was applied by Vaishnav et al. to determine thiol compounds of clinical significance by using cit-AgNPs [37].

In the current work, it was found that AgNPs aggregation even after adding L-cys was not an irreversible process since after incubating the sample for 30 min and subsequent vortexing for 30 s at 3000 rpm the resulting UV-vis spectrum evidenced a lower SPRB shift towards longer wavelengths than in absence of agitation. The partial reversibility of the process may indicate that the interaction between AgNPs and L-cys is through electrostatic forces rather than hydrogen bonds formation. This observation is in agreement with previous studies by S. Mandal et al. [41] that showed a reversible aggregation of AgNPs stabilized with cysteine at temperatures above 60 °C.

Subsequently, UV-vis spectra obtained from 20, 60 and 80 nm AgNPs at three concentration levels (0.5, 1.0 and 2.5 mg L⁻¹), at 8.30 mM phosphoric acid at pH 3.00 and 57.11 mg L⁻¹ of L-cys were recorded in the range of 260–800 nm. As example, the UV-vis spectra from 20, 60 and 80 nm AgNPs at 2.5 mg L⁻¹ recorded at t₀ and t₃₀ is depicted in Fig. 1(a.1–a.3). As it is shown the UV-vis spectra profile is dependent on AgNPs size. Moreover, adding L-cys notably improved the reproducibility of measurements with time as no significant differences were observed between the spectra profile collected at t₀ and t₃₀, except an increases in signal intensity after 30 min. Measurements were performed by applying a fixed-time kinetics method. Consequently, the response was obtained by subtracting the solutions spectra recorded immediately after preparation of mixture preparation (t₀) and after thirty minutes (t₃₀) (fixed Δt). Fig. 1(a.4) shows the overlaid difference UV-vis spectra for the AgNPs tested. Multivariate calibration methods imply working with full spectrum or at selected wavelengths depending on the features of the optical behavior of the analytes under study. As a first attempt working at selected wavelength was the method of choice. For this purpose, wavelengths were selected according to the optical differences or similarities observed between AgNPs of different size. As it was observed in Fig. 1(a.4), the signal intensity at 390 nm always decreased independently of the size of AgNPs, whereas at 460 and 660 nm a decrease in signal only occurred for AgNPs of 60 and 80 nm. Finally, at 700 nm only a signal decrease was detected in presence of 20 nm AgNPs. This trend was independent on AgNPs concentration but dependent on their size. As it has been above-mentioned, the method applied is based on changes in the surface plasmon resonance band (SPRB) of AgNPs when they form aggregated/assembled structures with L-cys. AgNPs aggregation and consequently, SPRB, is dependent on the size of AgNPs explaining therefore the differences detected. Consequently, these wavelengths were selected for further experiments with the aim of distinguish between the three sizes of nanoparticles tested.

Among factors affecting AgNPs aggregation, phosphoric acid and L-cys concentration are the most influential ones, therefore an experimental design of two factors and three levels was independently applied to AgNPs of extreme sizes (20 and 80 nm) since it was assumed that AgNPs of 40 and 60 nm may exhibit an intermediate behavior. Based on the design, two sets of nine experiments were carried out in which the concentration of nanoparticles was fixed at 1.0 mg L⁻¹, while the concentrations of the acid and the amino acid were varied in order to find their optimal values (Table 1). The responses evaluated in all the experiments were the intensity of the absorption bands at 390, 460, 660 and 700 nm from the UV-vis spectra resulting from the subtraction of the spectra recorded at t₀ and t₃₀. The optimization criteria were based

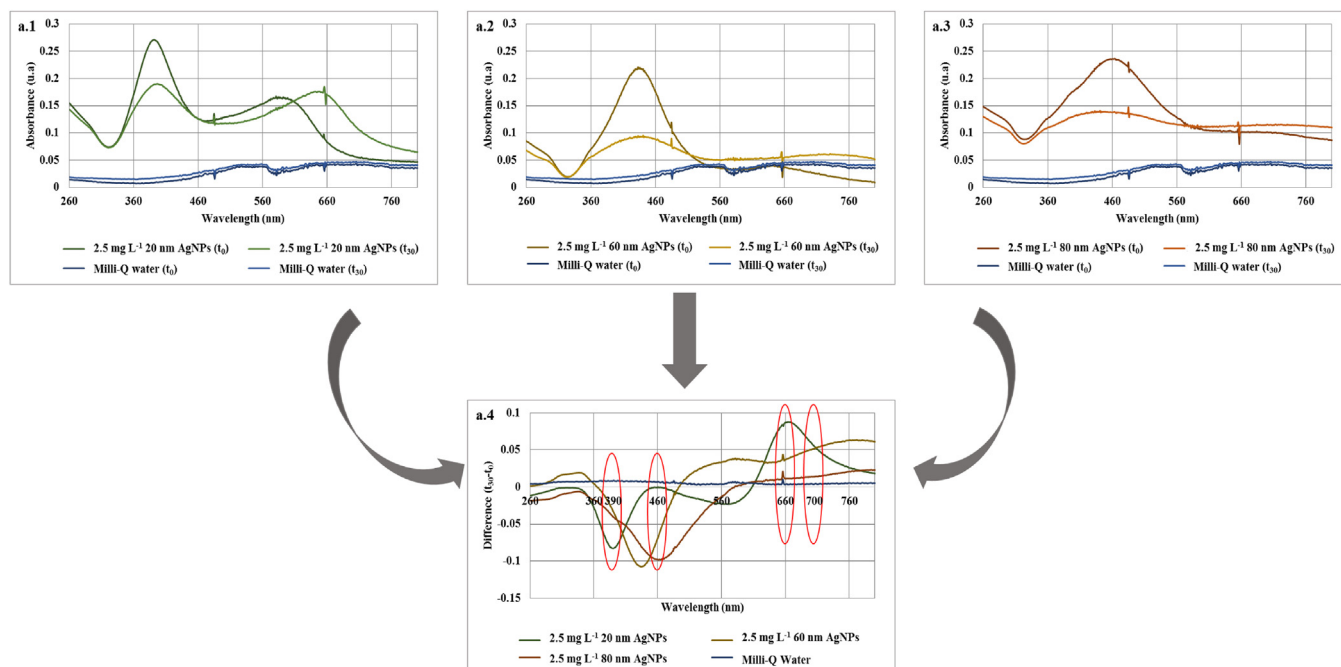


Fig. 1. Overlaid UV-vis spectra recorded at t_0 and t_{30} corresponding to a blank of Milli-Q water (blues lines in all images) and an individual mixture of 2.5 mg L^{-1} AgNPs of 20 (green line, a.1), 60 (yellow line, a.2) and 80 nm (brown line, a.3). (a.4) Difference UV-vis spectra obtained by subtracting t_0 and t_{30} spectra from a blank of Milli-Q water (blues lines) and an individual mixture of 2.5 mg L^{-1} AgNPs of 20 (green line), 60 (yellow line) and 80 nm (brown line). The blank of Milli-Q water contains L-cys and H_3PO_4 at pH 3.00 at a final concentration of 57.11 mg L^{-1} and 8.30 mM , respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

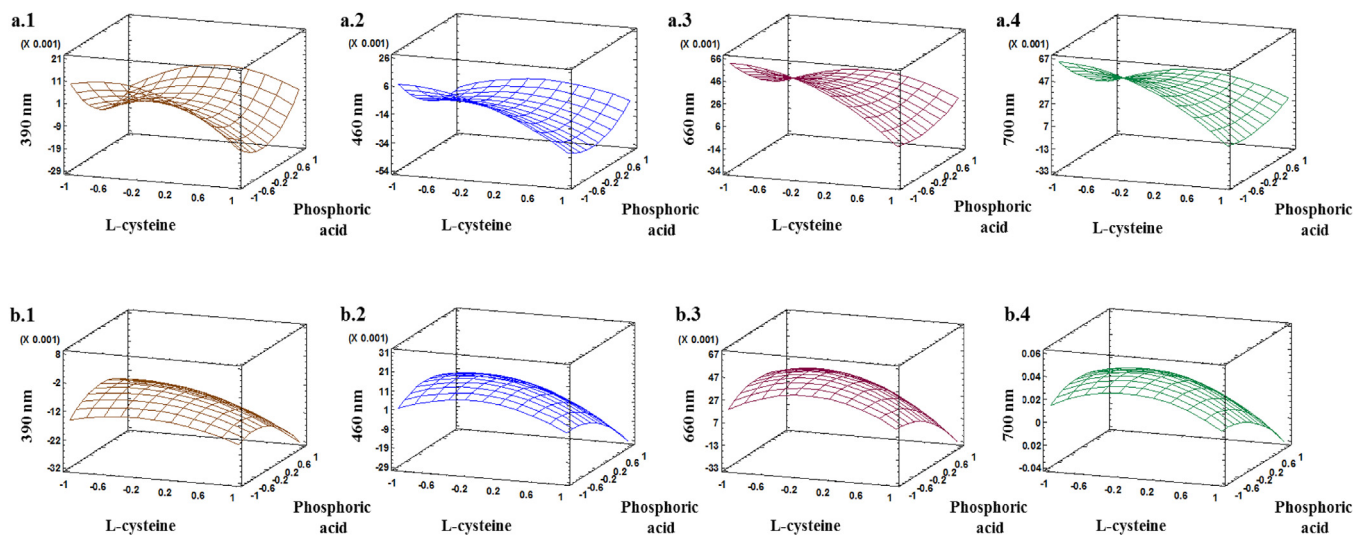


Fig. 2. Surface response plots showing the influence of H_3PO_4 and L-cysteine concentration for 80 nm AgNPs (a.1–a.4) and 20 nm AgNPs (b.1–b.4) on the signal at 390 (brown line), 460 (blue line), 660 (purple line) and 700 (green line) nm, respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

on selecting those conditions providing the maximum differences on experimental response for each AgNPs size at those wavelengths. The response surfaces obtained for the 20 nm and 80 nm AgNPs are displayed in Fig. 2 and clearly shown a different profile dependent on AgNPs size. In general, a decrease in response was observed as the concentration of L-cys increases for both types of nanoparticles. This decrease was more accused at 660 and 700 nm than 390 and 460 nm for 80 nm AgNPs (Fig. 2(a.1–a.4)). Concerning to acid concentration, a decreases in response at low acid concentration was observed at 660 and 700 nm for nanoparticles of 80 nm whereas an increases in response for 20 nm AgNPs was detected (Fig. 2). The results obtained from surface plots evidenced different optimal conditions for each type

of nanoparticles. The optimal concentrations of phosphoric acid and L-cys for 20 nm AgNPs were 17.6 mM and 51.6 mg L^{-1} respectively while 13.4 mM for the acid and 37.0 mg L^{-1} for the amino acid were found for 80 nm AgNPs.

With the aim of selecting a compromise conditions, it was decided to test both optimal conditions for the two types of nanoparticles. That is, the optimal conditions obtained for the 20 nm AgNPs were also tested on the 80 nm AgNPs and vice versa. Finally, the conditions that provided higher differences in spectroscopical response as consequence of size dependent- aggregation process in both types of nanoparticles were the optimal conditions for the 20 nm AgNPs since under these conditions the spectroscopic trend observed in Fig. 1(a.4) was

maintained for both types of nanoparticles 20 and 80 nm AgNPs.

3.3. Determination of AgNPs sizes and concentration based on L-cys-induced aggregation. Selection of calibration mixtures and validation of the calibration set

Once the experimental conditions that induce NPs aggregation process were established and taking into account that the signal intensity of the absorbance bands is affected with the quantity and size of AgNPs, a multivariate analytical method using PLS calibration was subsequently developed with the aim of determining simultaneously the size and the concentration of cit-AgNPs present in a synthetic mixture.

For this purpose, a lattice design based on a simplex-centroid plus three replicate center points was applied to provide a calibration set of individual, binary, ternary and quaternary mixtures of AgNPs of different sizes to maximize statistically the information obtained from the spectra. A total of 21 samples were selected within a concentration range between 0.62 and 2.5 mg L⁻¹, 18 samples were given by the design and the three remaining were one ternary mixture to evaluate the reproducibility and two individual mixtures of 60 and 80 nm for improving precision. The composition of the mixtures in each of the calibration points is summarized in Table 2. A principal component analysis (PCA) was carried out with the signals of the spectrum obtained for each of the mixtures of the calibration set. The results of PCA evidenced, on the one hand, that a number of 5 factors is needed to explain the multivariate calibration model and on the other hand, the impossibility of using only the signal at 390, 460, 660 and 700 nm as responses for building the calibration model with PRESS values lower than 25%. Consequently, the use of full spectrum and specifically the spectral region between 260 and 800 nm were required to simultaneously explain the behavior of the four sizes of AgNPs. Once the calibration model was simultaneously constructed for the four sizes of AgNPs by PLS according to the results obtained from the PCA, the number of latent variables was increased from 5 to 9 taking into account PRESS values provided by the PLS. This increase implied having a PRESS values around 20–25%, however it was required to improve the predictive capacity of the model.

To evaluate the performance of the proposed chemometric model, a set of nine synthetic validation mixtures (individual, binary and ternary) of 20, 40, 60 and 80 nm AgNPs (0.83–2.5 mg L⁻¹) was used.

Table 3 shows the added concentration of each of the nanoparticles of different size to the mixtures of the validation set as well as the concentration predicted by the model for each size in each of the mixtures. The performance of the model was evaluated by comparing the total AgNPs concentration added and the total concentration predicted by the model for the nine mixtures. Outliers (extreme samples) in the analysis were detected and removed from the regression model. The error between the total amount added and that found was calculated and compared to the PRESS values established for calibration. Consequently, any mixtures not meeting the criterion of error lower than 25% were rejected. Only one of the nine mixtures was rejected as it exceeded the limit set by the PRESS. This indicated the good ability of the model to predict the total amount added to the mixture regardless of whether AgNPs were included in an individual, binary or ternary mixture. The model provided good results when applied to individual and binary mixtures whereas in ternary mixtures, the predicted values were generally by excess for 40 nm AgNPs and by default for 20 and 60 nm AgNPs. With respect to 80 nm AgNPs, although the concentration added in the ternary mixtures coincided with its limit of detection, the model was able to detect them.

The analytical performance of the calibration model was evaluated in terms of reproducibility, limit of detection, precision and selectivity.

Reproducibility was evaluated by using 12 binary mixtures containing all the possible combinations between the different sizes of AgNPs with a total concentration of 2.5 mg L⁻¹ at an individual concentration of 1.25 mg L⁻¹ AgNPs each. Mixtures were repeated twice. Reproducibility was assessed based on the total amount of AgNPs in the mixture by calculating the error between the total amount added and the total amount found by the model as shown in Table 3. An error between 4% and 20% was estimated for this set, having previously rejected three mixtures whose error was higher than the 25% established by the PRESS. Results in Table 3 evidenced the good capacity of the model for predicting the total amount of AgNPs in the synthetic mixture. Although the results obtained suggest that the model could predict the amount added of each nanoparticle size, the analysis of the data in Table 3 shows that for those mixtures containing consecutive diameter sizes of AgNPs (20 and 40, 40 and 60 or 60 and 80 nm) the model predicts by default the nanoparticle of smaller size and by excess the ones of greater size or even detects the presence of the nanoparticle of consecutive size that has not been incorporated into the mixture. In principle, this could suggest a low capacity of the model in

Table 3
Evaluation of the prediction ability of the model.

	AgNPs Added (mg L ⁻¹)				AgNPs Predicted (mg L ⁻¹) (Recovery, %) %				Total Added (mg L ⁻¹)	Total Predicted (mg L ⁻¹) (Total Recovery, %)	Error (%)
	20 nm	40 nm	60 nm	80 nm	20 nm	40 nm	60 nm	80 nm			
Validation set											
1				1.25				1.4 (112)	1.25	1.4 (112)	12
2	1.25	1.25			1.2 (96)	1.1(88)			2.5	2.3 (92)	8
3	1.25	1.25			1.0 (80)	1.0 (80)			2.5	2.0 (80)	20
4	0.83		0.83	0.83	0.7 (84)		0.6 (72)	LOD	2.5	2.1 (84) ^a	16 ^a
5	0.83	0.83		0.83	0.7 (84)	0.9 (108)		LOD	2.5	2.4 (96) ^a	4 ^a
6	0.83	0.83		0.83	0.5 (66)	1.1 (132)		LOD	2.5	2.4 (96) ^a	4 ^a
7	0.83	0.83	0.83		0.5 (60)	1.1 (132)	0.4 (48)		2.5	2.0 (80)	20
8		0.83	0.83	0.83		0.8 (96)	0.7 (84)	LOD	2.5	2.3 (92) ^a	8 ^a
Reproducibility set											
1	1.25			1.25	1.0 (80)	LOD		LOD	2.5	2.4 (96) ^a	4 ^a
2	1.25			1.25	1.0 (80)	0.7(56)		1.1	2.5	2.8 (112)	12
3	1.25	1.25			1.0 (80)	1.3 (104)			2.5	2.3 (92)	8
4	1.25		1.25		0.9 (72)	0.7 (56)	0.6		2.5	2.2 (88)	12
5		1.25	1.25			1.7 (136)	0.9 (72)		2.5	2.6 (104)	4
6		1.25	1.25			0.8 (64)	2.2 (176)		2.5	3.0 (120)	20
7		1.25		1.25		1.1 (88)	LOD	LOD	2.5	2.2 (88) ^a	12 ^a
8			1.25	1.25			1.1 (88)	1.0 (80)	2.5	2.1 (84)	16
9			1.25	1.25		0.7 (56)	LOD	1.3 (104)	2.5	2.3 (92) ^a	8 ^a

^a AgNPs LODs have been taken into account to calculate both the total amount predicted and the total recovery.

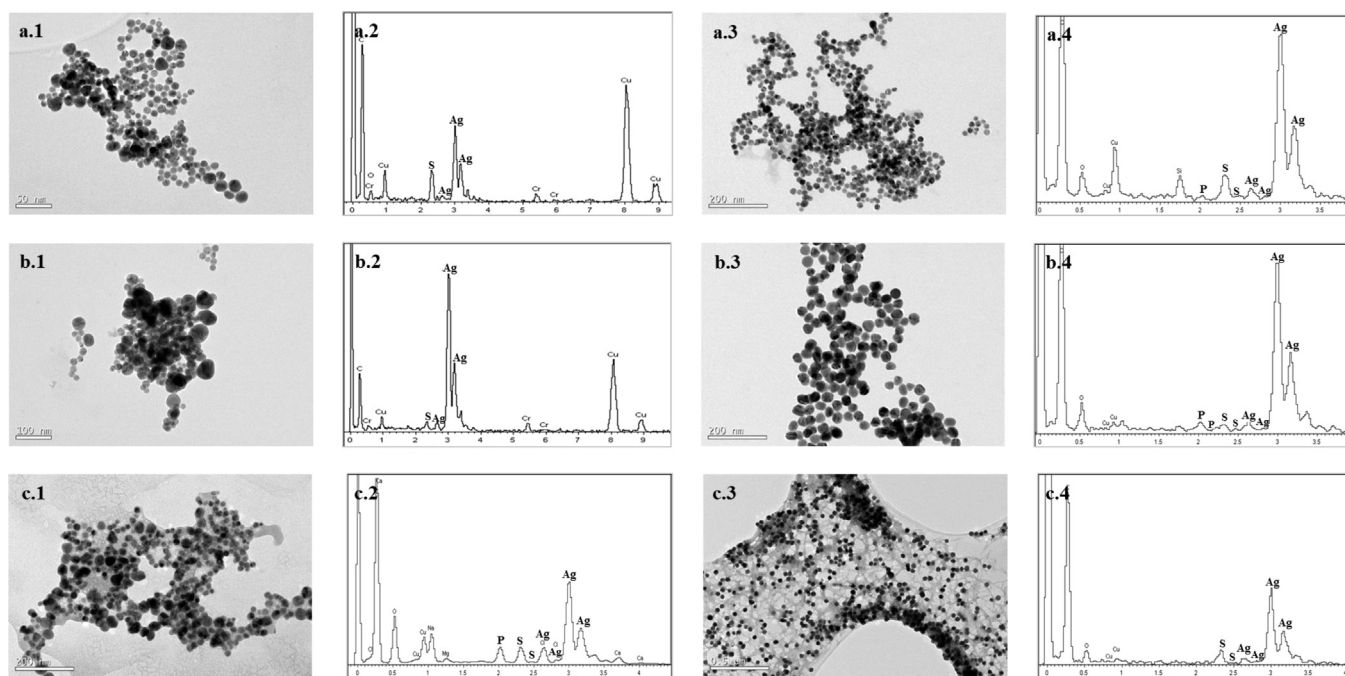


Fig. 3. TEM images and XDS spectra of (a.1–a.2) binary mixture of AgNPs of 20 and 40 nm at a concentration level of 1.25 mg L^{-1} each, (b.1–b.2) ternary mixture of AgNPs of 20, 40 and 60 nm with an individual concentration of 0.83 mg L^{-1} , (a.3–a.4) river water 1 spiked with 2.50 mg L^{-1} of 20 nm cit-AgNPs, (b.3–b.4) river water 1 spiked with 2.50 mg L^{-1} 40 nm cit-AgNPs, (c.1–c.2) river water 1 spiked with a binary mixture of cit-AgNPs of 20 and 40 nm with a concentration of 1.25 mg L^{-1} each and (c.3–c.4) river water 1 spiked with 2.50 mg L^{-1} individual mixture of 40 nm PVP-AgNPs. H_3PO_4 and L-cys were added to all mixtures at the concentration previously optimized (17.6 mM and 51.6 mg L^{-1} , respectively).

discriminating between sizes of NPs limiting, therefore, their applicability to determine only the total amount of nanoparticles. However, it should be kept in mind that calibration model was built with commercial AgNPs characterized by a diameter size distribution rather than a single diameter size. Despite of this, TEM measurements were applied to mixtures containing nanoparticles of consecutive sizes to try to explain the predictions failures of the model. TEM micrographs from a binary mixture of 20 and 40 nm AgNPs at a concentration level of 1.25 mg L^{-1} each (Fig. 3(a.1–a.2)) and a ternary mixture of AgNPs of 20, 40 and 60 nm with an individual concentration of 0.83 mg L^{-1} each (Fig. 3(b.1–b.2)) evidenced the formation of aggregates or agglomerates of AgNPs that may justify the variations between the amount added and the amount predicted by the model. Therefore, the developed model is also able to predict the AgNPs aggregation observed by TEM measurements.

The LODs obtained for the AgNPs of 20, 40, 60 and 80 nm were 0.3, 0.6, 0.3 and 0.8 mg L^{-1} , respectively. As in the environment these nanoparticles are going to be in contact with each other, regardless of their size, the LODs were calculated in the mixtures of validation and reproducibility sets where the size of AgNP of interest was not present and by using two times the standard deviation as criterion.

The precision was evaluated for each nanoparticle size by using as samples the ternary mixtures of the validation set and by calculating its relative standard deviation (CV, %). Intra-day precision was estimated by recording the full spectrum of the three samples on the same day ($N = 3$), and inter-day variation from two successive days (three samples per day, $N = 6$). The samples were spiked with three sizes of AgNPs in order to the final concentration for each nanoparticle was 0.83 mg L^{-1} . From the amount found by the model in each of samples for each nanoparticle size, CV values of 15%, 20% and 26% for intra-day precision were estimated for the nanoparticles of 20, 40 and 60 nm respectively, while for inter-day variation the estimated CV values were 14% and 18% for the nanoparticles of 20 and 40 nm, respectively. In the case of the 80 nm nanoparticles, its intra-day precision and inter-day variation could not be estimated since the concentration used to

spike the samples coincided with its LOD. Despite this, the model was able to detect the presence of 80 nm AgNPs at 0.83 mg L^{-1} level in all the mixtures of the validation set where 80 nm AgNPs were present.

The selectivity of the method has been proven in real environmental water samples with the aim of taking into account parameters related to the characteristics of the environment water samples such as organic matter, hardness, conductivity that, as the referee mention, may affect AgNPs integrity. Ionic silver and titanium dioxide nanoparticles (TiO_2NPs) were selected as interferents and added to the environmental water samples either in presence or absence of AgNPs. Ionic silver was selected due to its coexistence with AgNPs and its reaction with L-cys, and TiO_2NPs because of its widely application that favors its presence in the environment [42]. To evaluate the possible effect of ionic silver and TiO_2NPs their complete spectra were recorded both individually and in contact with AgNPs and by using the same concentration ranges as used for calibration. In both cases, the method showed to be selective for silver nanoparticles since the presence of ionic silver or TiO_2NPs did not modified the results predicted by the model with respect to those obtained when AgNPs were alone in the water samples.

3.4. Determination of AgNPs in water samples

The method was finally applied to estimate size and concentration of AgNPs in AgNPs-spiked river and tap water samples that are characterized by different metal and metalloid contents, hardness and organic loading. The samples were first characterized in terms of pH and conductivity as indicated in Section 2.3.4. The values obtained for each parameter in the water samples are presented in Table 4. All the samples provide basic pH values with the highest value of conductivity for the river water collected at Valdemoro del Rey (river water 1).

Water samples were prepared before analysis following the procedure described in Section 2.3.5. Water samples were spiked with different individual, binary or ternary mixtures of AgNPs (Table 4) to verify the applicability of the method. Fig. 4(a.1–a.2) shows as example the overlaid spectra recorded at t_0 and t_{30} and the UV–vis signal

Table 4
Determination of AgNPs in AgNPs-spiked water samples.

Type of Water	pH	Conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	AgNPs Added (mg L^{-1})				AgNPs Predicted (mg L^{-1}) (Recovery, %)				Total Added (mg L^{-1})	Total Predicted (mg L^{-1}) (Total Recovery, %)	Error (%)
			20 nm	40 nm	60 nm	80 nm	20 nm	40 nm	60 nm	80 nm			
Tap Water	6.3 $\pm$ 0.1	138 $\pm$ 1		1.25			LOD	1.6 (128)			1.25	1.9 (152) ^a	52 ^a
				1.25			LOD	1.7 (136)			1.25	2.0 (160) ^a	60 ^a
				1.25			0.5	1.3 (104)			1.25	1.8 (144)	44
				1.25			LOD	1.5 (120)			1.25	1.8 (144) ^a	44 ^a
				1.25			0.6	0.7 (56)	0.5		1.25	1.8 (144)	44
				1.25			0.4	1.0 (80)	0.5		1.25	1.9 (152)	52
					2.00				1.8 (90)		2.00	1.8 (90)	10
					2.00				1.7 (85)		2.00	1.7 (85)	15
					2.00				1.6 (80)		2.00	1.6 (80)	20
						1.00				1.0 (100)	1.00	1.0 (100)	0
						1.00		0.4		0.9 (90)	1.00	1.3 (130)	30
						1.00				1.1 (110)	1.00	1.1 (110)	10
				1.25		1.25		1.2 (96)		LOD	2.50	2.0 (80) ^a	20 ^a
				1.25		1.25		1.0 (80)		LOD	2.50	1.8 (72) ^a	28 ^a
				1.25		1.25		1.3 (104)		LOD	2.50	2.1 (84) ^a	16 ^a
River 1 ^b	7.7 $\pm$ 0.1	3072 $\pm$ 2			1.50				1.1 (73)		2.75	2.0 (73)	27
					1.50				1.3 (87)		2.75	2.1 (76) ^a	24 ^a
					1.50				1.3 (87)		2.75	2.1 (76) ^a	24 ^a
				1.25		1.25		1.2 (96)		LOD	1.25	1.7 (136)	36
				1.25		1.25		1.3 (104)			1.25	1.8 (144)	44
				1.25		1.25		1.5 (120)			1.25	1.9 (152)	52
				1.25		1.25		1.2 (96)			1.25	1.6 (128)	28
							0.5				1.25		
							0.5				1.25		
							0.4				1.25		
				1.25		1.25		1.5 (120)			1.25	1.8 (144) ^a	44 ^a
				1.25		1.25		1.6 (128)			1.25	1.9 (152) ^a	52 ^a
				1.25		1.25		1.9 (152)			2.50	2.5 (100)	0
				1.25		1.25		2.1 (168)			2.50	2.7 (108)	8
				1.25		1.25		1.7 (136)			2.50	2.4 (96)	4
River 2 ^c	6.7 $\pm$ 0.3	127 $\pm$ 1			1.25			1.9 (152)			2.50	2.7 (108)	8
					1.25			1.1 (88)	1.7 (136)		2.50	2.7 (108)	8
					1.25			1.0 (80)	1.7 (136)		2.50	2.7 (108)	8
					1.25				1.1 (88)	1.1 (88)	2.50	2.2 (88)	12
					1.25				1.1 (88)	1.1 (88)	2.50	2.2 (88)	12
					1.25				0.9 (72)	0.9 (72)	2.50	1.8 (72)	28
					1.25				1.1 (88)	1.0 (80)	2.50	2.1 (84)	16
							0.6 (40)	1.6			1.50	2.2 (147)	47
				1.50			0.8 (53)	1.1			1.50	1.9 (127)	27
				1.50			0.9 (60)	1.1			1.50	2.0 (160)	33
				1.25			0.6	0.8 (64)	0.4		1.25	1.8 (144)	44
				1.25			0.6	0.7 (56)	0.4		1.25	1.7 (136)	36
				1.50			LOD	1.3 (87)			1.50	1.6 (107) ^a	7 ^a
				1.50			LOD	1.3 (87)			1.50	1.6 (107) ^a	7 ^a
				1.50			LOD	1.3 (87)			1.50	1.6 (107) ^a	7 ^a
				1.50				1.6 (107)			1.50	1.6 (107)	7
				1.50			0.4	1.5 (100)			1.50	1.9 (127)	27
				1.25				1.5 (120)			1.25	1.5 (120)	20
River 1 ^b	7.7 $\pm$ 0.1	3072 $\pm$ 2		1.25				1.1 (88)			1.25	1.5 (120)	20
				1.25				1.3 (104)			1.25	1.3 (104)	4
				1.25		1.25			1.1		2.50	1.7 (68)	32
				1.25		1.25			1.2		2.50	1.9 (76)	

Table 4 (continued)

Type of Water	pH	Conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	AgNPs Added (mg L^{-1})				AgNPs Predicted (mg L^{-1}) (Recovery, %)				Total Added (mg L^{-1})	Total Predicted (mg L^{-1}) (Total Recovery, %)	Error (%)
			20 nm	40 nm	60 nm	80 nm	20 nm	40 nm	60 nm	80 nm			
			0.83	1.25	0.83	1.25	0.6	0.7 (84)	1.1		2.50	1.7 (68)	32
			0.83	0.83	0.83		LOD	0.7 (84)	0.6 (72)		2.50	1.6 (64) ^a	36 ^a
			0.83	0.83	0.83		LOD	0.7 (84)	0.5 (60)		2.50	1.5 (60) ^a	38 ^a

^a AgNPs LODs have been taken into account to calculate both the total amount predicted and the total recovery.

^b River 1: River water of Valdemoro del Rey.

^c River 2: River water of Robledo de Chavela.

obtained from the difference between the two spectra for the river water 1 sample spiked with a binary mixture of 20 and 40 nm AgNPs at 1.25 mg L^{-1} each, and without adding AgNPs as control. As it expected, the characteristic SPRB of AgNPs only was observed when AgNPs were added to the sample.

Detection limits for each size of AgNPs were determined in the water samples. The LOD values were similar to those previously obtained when using mixtures of validation and reproducibility sets. However, for 40 nm AgNPs a LOD of 0.9 mg L^{-1} instead of 0.6 mg L^{-1} was achieved in the river and tap water samples.

Intra-day precision was estimated by recording the full spectrum from three samples measured on the same day ($N = 3$), and inter-day variation from spectra collected in two successive days (three samples per day, $N = 6$). In river waters, CV values between 2% and 10% and 7% and 27% were estimated for intra-day precision and inter-day precision, respectively for different sizes of AgNPs at an individual concentration of 1.25 mg L^{-1} . The precision associated to 80 nm AgNPs determination could not be estimated since the concentration found was near the LOD. Finally, in the tap water, CV values ranged between 6% and 13%, and 23% were estimated for intra-day and inter-day precision, respectively. Again, precision for the determination of 80 nm AgNPs was not calculated since the concentration found was near the LOD.

The applicability of the method was evaluated according to the amounts added and the amounts predicted by the model. The recoveries achieved in the mixtures used for each type of sample and the errors are presented in Table 4. In general, the method shows good performance to simultaneously estimate the concentration and size of mixtures of AgNPs. The ability of the model to predict the total amount of AgNPs added to the sample was good (recovery percentages higher than 70% were achieved in most of the mixtures tested). The greatest errors were detected in the individual mixtures of 40 nm AgNPs in tap and river water 1 where the model predicted higher amounts than those added due to the detection of 20 and 60 nm AgNPs that has not been initially added. In contrast, low recovery values between 40% and 65% were obtained when the model was applied to 20 nm AgNPs both in individual and in binary mixtures with the 40 nm AgNPs in river water 1. In all these cases, the model predicted by default the 20 nm AgNPs and the presence of 40 nm AgNPs which it have not been initially added. In binary mixtures, the model predicted in excess the presence of 40 nm AgNPs.

TEM measurements were carried out in AgNPs- spiked river and tap water samples with the aim of gaining a deeper insight in explaining the discrepancies detected between the expected and the obtained values. Fig. 3 shows the micrographs and EXD spectra of river water 1 spiked with 2.50 mg L^{-1} of 20 nm cit-AgNPs (Fig. 3(a.3–a.4)), with 2.50 mg L^{-1} of 40 nm cit-AgNPs (Fig. 3(b.3–b.4)) and with a binary mixture of 20 and 40 nm cit-AgNPs with a concentration of 1.25 mg L^{-1} each (Fig. 3(c.1–c.2)). As it is observed, nanoparticles underwent a process of aggregation and agglomeration in both types of mixtures that allow to justify the percentages of recovery and the predictions made by the model in terms of the AgNPs size. Additionally, Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) analysis evidenced both the presence of Ag in the nanoparticles ($\text{L}\alpha$ (2.98 keV) and $\text{L}\beta$ (3.93 and 3.15 keV)) and the L-cys and phosphoric acid by the presence of S and P in the collected spectrum. The developed model was able again to predict the AgNPs aggregation observed by TEM measurements in the water tested.

To evaluate the transformation of AgNPs once discharged in the water tested, the above mixtures were analyzed by TEM in the two river samples and in the tap water sample but without adding phosphoric acid and L-cys. The micrographs of the Fig. 5 show AgNPs aggregation in the water samples matrices being the degree of aggregation greater in the case of the binary mixture. Among samples, the highest degree of AgNPs aggregation was observed in river water 1 likely due to its highest conductivity and presence of bivalent cations (such as Mg^{2+} o Ca^{2+}) that favor aggregation of AgNPs [22,43,44]. However, it should

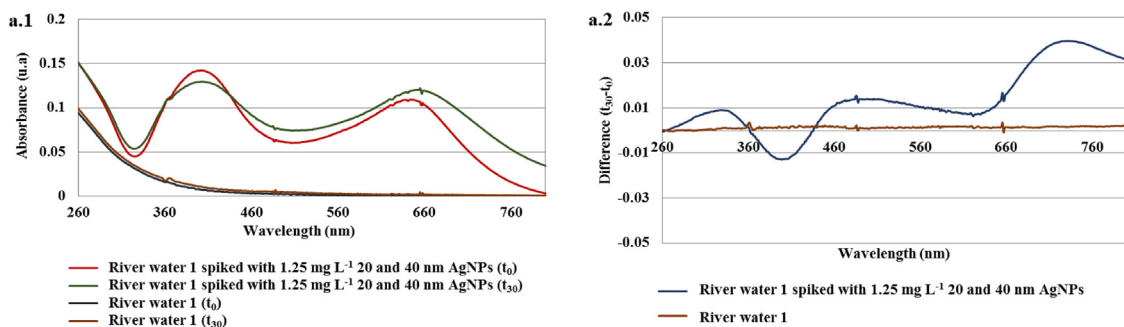


Fig. 4. (a.1) Overlaid UV-vis spectra recorded at t_0 (red and blue lines) and t_{30} (green and brown lines) corresponding to the river water 1 sample without (blue and brown lines) and with adding (red and green lines) a binary mixture of 20 and 40 nm AgNPs at a concentration level of 1.25 mg L^{-1} each. (a.2) Difference UV-vis spectra obtained by subtracting t_0 and t_{30} spectra from river water 1 without (brown line) and with adding (blue line) a binary mixture of 20 and 40 nm AgNPs at a concentration level of 1.25 mg L^{-1} each. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

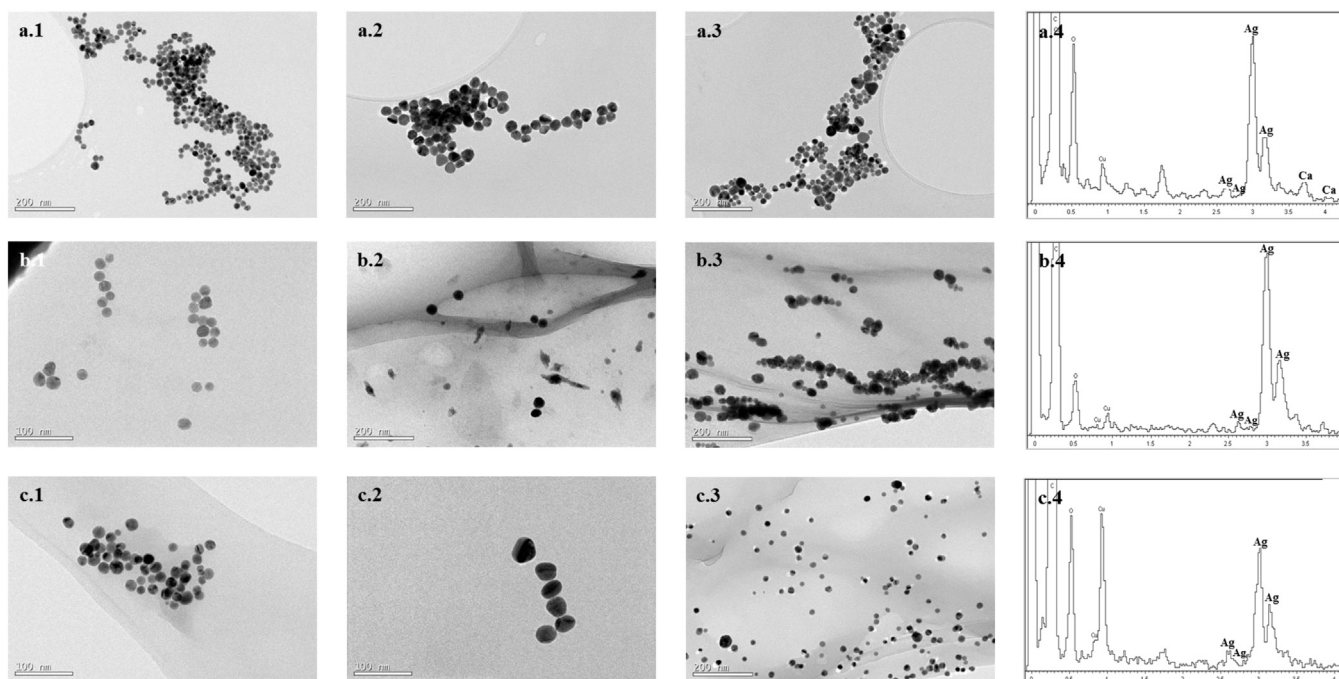


Fig. 5. Transmission electron micrographs of a) river water 1, b) river water 2 and c) tap water spiked with 1) 2.50 mg L^{-1} of 20 nm AgNPs, 2) 2.50 mg L^{-1} of 40 nm AgNPs and 3) a binary mixture 20 and 40 nm AgNPs at a concentration level of 1.25 mg L^{-1} each. a.4, b.4 and c.4 correspond to XDS spectra of river water 1, river water 2 and tap water spiked with 2.50 mg L^{-1} of 20 nm cit-AgNPs, respectively. TEM images and XDS spectra were obtained without adding L-cys and H_3PO_4 to the water samples.

be noted that the presence of the acid and the amino acid accentuated and improved this aggregation process, being L-cys and H_3PO_4 key factors for controlling the aggregation procedure in terms of obtaining reproducibility measurements.

3.5. Effect of capping agent of AgNPs

To verify whether the method developed depended on the agent that stabilizes the AgNPs, the water samples were spiked with an individual mixture of 40 nm AgNPs stabilized with PVP at a concentration of 1.25 mg L^{-1} . The analysis of the UV-vis signal after subtracting the spectra recorded at t_0 and t_{30} gave results that showed no significant differences with respect to those previously obtained with the 40 nm cit-AgNPs. In addition, TEM analysis in the river water 1 sample showed that these nanoparticles also underwent aggregation and agglomeration processes, although to a lesser extent than cit-AgNPs (Fig. 3(c.3–c.4)).

4. Conclusions

A fast method based on variation of optic properties of AgNPs when they form aggregated/assembled structures with L-cys along with chemometrics tools was developed for determining simultaneously the size and the concentration of AgNPs in synthetic mixtures and AgNPs-spiked water samples of different nature. A good correspondence was obtained between predicted values and the total amount of AgNPs added in the different mixtures and water tested. The developed model was also able to predict the AgNPs aggregation observed by TEM measurements in some of the mixtures and water tested. Additionally, the ability of the model to predict size and concentration of AgNPs regardless of their coating agent (citrate and PVP) widens the applicability of the method. The developed methodology implies a minimum sample treatment and the use of affordable equipment such as UV-vis spectrophotometer which makes it highly suitable for screening procedures in quality control laboratories. Nowadays most of UV-vis instruments available in the market incorporate chemometric tools in their software for data treatment.

Acknowledgments

The authors thank the Spanish Commission of Science and Technology (CTQ2014-54801-C2-1-R) and the Community of Madrid/FEDER Programme (S2013/ABI-3028, AVANSECAL-CM) for funding.

References

- [1] Q.H. Tran, V.Q. Nguyen, A.-T. Le, Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives, *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* 4 (2013) 033001, <http://dx.doi.org/10.1088/2043-6262/4/3/033001>.
- [2] Y.A. Krutyakov, A.A. Kudrinskiy, A.Y. Olenin, G.V. Lisichkin, Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects, *Russ. Chem. Rev.* 77 (2008) 233–257, <http://dx.doi.org/10.1070/RC2008v077n03ABEH003751>.
- [3] E. Abbasi, M. Milani, S. Fekri Aval, M. Kouhi, A. Akbarzadeh, H. Tayefi Nasrabadi, P. Nikasa, S.W. Joo, Y. Hanifehpour, K. Nejati-Koshki, M. Samiei, Silver nanoparticles: synthesis methods, bio-applications and properties, *Crit. Rev. Microbiol.* 7828 (2014) 1–8, <http://dx.doi.org/10.3109/1040841X.2014.912200>.
- [4] M.E. Vance, T. Kuiken, E.P. Vejerano, S.P. McGinnis, M.F. Hochella, D.R. Hull, Nanotechnology in the real world: redeveloping the nanomaterial consumer products inventory, *Beilstein J. Nanotechnol.* 6 (2015) 1769–1780, <http://dx.doi.org/10.3762/bjnano.6.181>.
- [5] W. Zhou, Y.-L. Liu, A.M. Stallworth, C. Ye, J.J. Lenhart, Effects of pH, electrolyte, humic acid, and light exposure on the long-term fate of silver nanoparticles, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 12214–12224, <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.6b03237>.
- [6] A. Syafuddin, S. Salmiati, T. Hadibarata, A.B.H. Kueh, M.R. Salim, M.A.A. Zaini, Silver nanoparticles in the water environment in Malaysia: inspection, characterization, removal, modeling, and future perspective, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1–15, <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-19375-1>.
- [7] I.L. Bergin, L.A. Wilding, M. Morishita, K. Walacavage, A.P. Ault, J.L. Axson, D.I. Stark, S.A. Hashway, S.S. Capracotta, P.R. Leroueil, A.D. Maynard, M.A. Philbert, Effects of particle size and coating on toxicologic parameters, fecal elimination kinetics and tissue distribution of acutely ingested silver nanoparticles in a mouse model, *Nanotoxicology* 10 (2016) 352–360, <http://dx.doi.org/10.3109/17435390.2015.1072588>.
- [8] O. Choi, T.E. Clevenger, B. Deng, R.Y. Surampalli, L. Ross, Z. Hu, Role of sulfide and ligand strength in controlling nanosilver toxicity, *Water Res.* 43 (2009) 1879–1886, <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2009.01.029>.
- [9] L. Kvítek, A. Panáček, J. Soukupová, M. Kolář, R. Večeřová, R. Prucek, M. Holecová, R. Zbořil, Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs), *J. Phys. Chem. C* 112 (2008) 5825–5834, <http://dx.doi.org/10.1021/jp711616v>.
- [10] S. Kittler, C. Greulich, J. Diendorf, M. Köller, M. Epple, Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions, *Chem. Mater.* 22 (2010) 4548–4554, <http://dx.doi.org/10.1021/cm100023p>.
- [11] C. Marambio-Jones, E.M.V. Hoek, A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment, *J. Nanopart. Res.* 12 (2010) 1531–1551, <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-010-9900-y>.
- [12] J. Fabrega, S.N. Luoma, C.R. Tyler, T.S. Galloway, J.R. Lead, Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment, *Environ. Int.* 37 (2011) 517–531, <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2010.10.012>.
- [13] I. Vinković Vrček, I. Žuntar, R. Petlevski, I. Pavičić, M.D. Sikirić, M. Ćurlin, W. Goessler, Comparison of *in vitro* toxicity of silver ions and silver nanoparticles on human hepatoma cells, *Environ. Toxicol.* 31 (2014) 679–692.
- [14] S. Gaillat, J.-M. Rouanet, Silver nanoparticles: their potential toxic effects after oral exposure and underlying mechanisms – a review, *Food Chem. Toxicol.* 77 (2015) 58–63, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.12.019>.
- [15] M. Ema, H. Okuda, M. Gamo, K. Honda, A review of reproductive and developmental toxicity of silver nanoparticles in laboratory animals, *Reprod. Toxicol.* 67 (2017) 149–164.
- [16] O. Bondarenko, K. Juganson, A. Ivask, K. Kasemets, M. Mortimer, A. Kahru, Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells *in vitro*: a critical review, *Arch. Toxicol.* 87 (2013) 1181–1200, <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-013-1079-4>.
- [17] J. Fabrega, S.R. Fawcett, J.C. Renshaw, J.R. Lead, Silver nanoparticle impact on bacterial growth: effect of pH, concentration, and organic matter, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 7285–7290, <http://dx.doi.org/10.1021/es803259g>.
- [18] J. Fabrega, J.C. Renshaw, J.R. Lead, Interactions of silver nanoparticles with *Pseudomonas putida* biofilms, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 9004–9009, <http://dx.doi.org/10.1021/es901706j>.
- [19] C. Levard, E.M. Hotze, G.V. Lowry, G.E. Brown, Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 6900–6914, <http://dx.doi.org/10.1021/es2037405>.
- [20] S.J. Yu, Y. Yin, J. Liu, Silver nanoparticles in the environment, *Environ. Sci. Process. Impacts* 15 (2013) 78–92, <http://dx.doi.org/10.1039/c2em30595j>.
- [21] N. Odzak, D. Kistler, L. Sigg, Influence of daylight on the fate of silver and zinc oxide nanoparticles in natural aquatic environments, *Environ. Pollut.* 226 (2017) 1–11, <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.006>.
- [22] G.E. Schaumann, A. Philippe, M. Bundschuh, G. Metreveli, S. Klitzke, D. Rakcheev, A. Grün, S.K. Kumahor, M. Kühn, T. Baumann, F. Lang, W. Manz, R. Schulz, H.J. Vogel, Understanding the fate and biological effects of Ag- and TiO₂-nanoparticles in the environment: the quest for advanced analytics and interdisciplinary concepts, *Sci. Total Environ.* 535 (2015) 3–19, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.035>.
- [23] L. Zhang, X. Li, R. He, L. Wu, L. Zhang, J. Zeng, Chloride-induced shape transformation of silver nanoparticles in a water environment, *Environ. Pollut.* 204 (2015) 145–151, <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2015.04.018>.
- [24] C. Levard, S. Mitra, A.D. Jew, A.R. Badireddy, G.V. Lowry, G.E.B. Jr, Effect of chloride on the dissolution rate of silver nanoparticles and toxicity to *E. coli*, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 5738–5745, <http://dx.doi.org/10.1021/es400396f>.
- [25] J. Liu, R.H. Hurt, Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano silver colloids, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 2169–2175.
- [26] M. Tejamaya, I. Römer, R.C. Merrifield, J.R. Lead, Stability of citrate, PVP, and PEG coated silver nanoparticles in ecotoxicology media, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 7011–7017, <http://dx.doi.org/10.1021/es2038596>.
- [27] F. Laborda, E. Bolea, G. Cepriá, M.T. Gómez, M.S. Jiménez, J. Pérez-Arantegui, J.R. Castillo, Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: a review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples, *Anal. Chim. Acta* 904 (2016) 10–32, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.11.008>.
- [28] V. Banerjee, K.P. Das, Interaction of silver nanoparticles with proteins: a characteristic protein concentration dependent profile of SPR signal, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 111 (2013) 71–79, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.04.052>.
- [29] P. Lodeiro, E.P. Achterberg, M.S. El-Shahawi, Detection of silver nanoparticles in seawater at ppb levels using UV–visible spectrophotometry with long path cells, *Talanta* 164 (2017) 257–260, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.11.055>.
- [30] V. Levchenko, R. Reisfeld, Enhancement of fluorescence of Eu EDTA chelate complex in sol-gel glasses by surface plasmons of copper nanoparticles, *Opt. Mater.* (2017) 8–11, <http://dx.doi.org/10.1016/j.optmat.2017.04.040>.
- [31] A. Contino, G. Maccarrone, M. Zimbone, R. Reitano, P. Musumeci, L. Calcagno, I. Pietro Oliveri, Tyrosine capped silver nanoparticles: a new fluorescent sensor for the quantitative determination of copper(II) and cobalt(II) ions, *J. Colloid Interface Sci.* 462 (2016) 216–222, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2015.10.008>.
- [32] N. Sreeju, A. Rufus, D. Philip, Microwave-assisted rapid synthesis of copper nanoparticles with exceptional stability and their multifaceted applications, *J. Mol. Liq.* 221 (2016) 1008–1021, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2016.06.080>.
- [33] K.B. Ayaz Ahmed, M. Sengan, P. Suresh Kumar, A. Veerappan, Highly selective colorimetric cysteine sensor based on the formation of cysteine layer on copper nanoparticles, *Sens. Actuators B Chem.* 233 (2016) 431–437, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2016.04.125>.
- [34] Y. Hu, H. Cheng, X. Zhao, J. Wu, F. Muhammad, S. Lin, J. He, L. Zhou, C. Zhang, Y. Deng, P. Wang, Z. Zhou, S. Nie, H. Wei, Surface-enhanced Raman scattering active gold nanoparticles with enzyme-mimicking activities for measuring glucose and lactate in living tissues, *ACS Nano* 11 (2017) 5558–5566, <http://dx.doi.org/10.1021/acsnano.7b00905>.
- [35] X. Hu, X. Mao, X. Zhang, Y. Huang, Sensors and actuators B: chemical one-step synthesis of orange fluorescent copper nanoclusters for sensitive and selective sensing of Al³⁺ ions in food samples, *Sens. Actuators B Chem.* 247 (2017) 312–318, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2017.03.050>.
- [36] P. Zheng, X. Shi, K. Curtin, F. Yang, N. Wu, Detection of mercury(II) with a surface-enhanced raman scattering sensor based on functionalized gold nanoparticles, *Mater. Res. Express* 4 (2017), <http://dx.doi.org/10.1088/2053-1591/aa6c7b>.
- [37] S.K. Vaishnav, K. Patel, K. Chandraker, J. Korram, R. Nagwanshi, K.K. Ghosh, M.L. Satnami, Surface plasmon resonance based spectrophotometric determination of medicinally important thiol compounds using unmodified silver nanoparticles, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 179 (2017) 155–162, <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2017.02.040>.
- [38] F. Rabbani, M.R.H. Nezhad, H. Abdollahi, Useful multivariate kinetic analysis: size determination based on cysteine-induced aggregation of gold nanoparticles, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 115 (2013) 588–594, <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2013.06.090>.
- [39] E. Kazemi, S. Dadfarnia, A.M. Haji Shabani, M.R. Fattahi, J. Khodaveisi, Indirect spectrophotometric determination of sulfadiazine based on localized surface plasmon resonance peak of silver nanoparticles after cloud point extraction, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 187 (2017) 30–35, <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2017.06.023>.
- [40] J.P. Chinta, Coinage metal nanoparticles based colorimetric assays for natural amino acids: a review of recent developments, *Sens. Actuators B Chem.* 248 (2017) 733–752, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2017.04.028>.
- [41] S. Mandal, A. Gole, N. Lala, R. Gonnade, V. Ganvir, M. Sastry, Studies on the reversible aggregation of cysteine-capped colloidal silver particles interconnected via hydrogen bonds studies on the reversible aggregation of cysteine-capped colloidal silver particles interconnected via hydrogen, *Assembly* (2001) 6262–6268, <http://dx.doi.org/10.1021/la010536d>.
- [42] V.L. Pachapur, A. Dalila Larios, M. Cledón, S.K. Brar, M. Verma, R.Y. Surampalli, Behavior and characterization of titanium dioxide and silver nanoparticles in soils, *Sci. Total Environ.* 563–564 (2016) 933–943, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.090>.
- [43] K. Afshinnia, M. Baalousha, Effect of phosphate buffer on aggregation kinetics of citrate-coated silver nanoparticles induced by monovalent and divalent electrolytes, *Sci. Total Environ.* 581–582 (2017) 268–276, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.117>.
- [44] T. Huang, M. Sui, X. Yan, X. Zhang, Z. Yuan, Anti-algae efficacy of silver nanoparticles to *Microcystis aeruginosa*: influence of NOM, divalent cations, and pH, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 509 (2016) 492–503, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.09.009>.

1.2. Caracterización de AgNPs y AuNPs en lodos de depuradora a través de la detección individual de partículas mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo

Characterization of AgNPs and AuNPs in sewage sludge by single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry

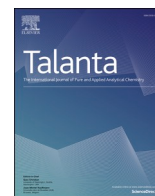
Gustavo Moreno-Martín, Beatriz Gómez-Gómez, María Eugenia León-González,
Yolanda Madrid

Talanta 238 (2022) 123033



Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

Characterization of AgNPs and AuNPs in sewage sludge by single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry

Gustavo Moreno-Martín^{*,*}, Beatriz Gómez-Gómez, Maria Eugenia León-González, Yolanda Madrid^{*}

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Single particle ICP-MS
Nanoparticle extraction
Sewage sludge
Environmental samples
AgNPs
AuNPs

ABSTRACT

This study develops for the first time an analytical method for the characterization of silver and gold nanoparticles in sewage sludge. The evaluation of the effect of temperature, extracting agent and centrifugation speed and time on the extraction yield was carried out through a multifactorial analysis of variance which allows us to select 289 g, 5 min and 20 mM sodium pyrophosphate tetrabasic as optimal extraction conditions. Under these conditions, the analysis of the extract by single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry provided recovery percentages of $70 \pm 2\%$ and $56 \pm 1\%$ for silver and gold nanoparticles, respectively. Moreover, the complementary results obtained upon analysis of these extracts by transmission electron microscopy and single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry showed that the developed method did not modify the original size and shape of these nanoparticles during the extraction procedure. Size detection limits of 23 nm and 16 nm as well as number concentration limits of 3.12×10^9 particles kg^{-1} and 1.38×10^9 particles kg^{-1} were obtained for silver and gold nanoparticles, respectively. Moreover, a stability study of silver and gold nanoparticles in sewage sludge for 12 months showed differences between the two nanoparticle types. Although the sizes were not affected during the 12 months, silver nanoparticles underwent an oxidation process from 6 months onwards, which was reflected in an increase in the percentage of ionic silver from $14 \pm 1\%$ at 6 months to $24 \pm 2\%$ at 12 months. The developed methodology represents a simple, reliable and fast tool for detecting, quantifying and assessing the stability of nanoparticles in an important environmental sample such as sewage sludge.

1. Introduction

Nanoparticles (NPs) are defined as discrete piece of material with all external dimensions in the length range approximately from 1 nm to 100 nm [1]. Nowadays, we can find many consumer products and applications with metallic nanoparticles, such as silver and gold nanoparticles (AgNPs and AuNPs). “The Nanodatabase”, is an inventory of nanomaterials available in the European consumer market [2]. This inventory is updated daily and lists 5003 products of which 517 and 72 are registered as silver and gold containing products, respectively [3]. AgNPs due to their strong antimicrobial properties [4] are used in a wide range of products such as paints, cosmetics, textiles, clothing, detergents and food packaging. AuNPs, for their part, are used in biomedical applications such as drug delivery, photodynamic and photothermal therapy and X-ray imaging [5].

Once used, NPs can reach wastewater streams and eventually pass through the sewer systems and wastewater treatment plants (WWTPs) [6]. These WWTPs are considered as a crucial barrier that can remove a high percentage of NPs (i.e., 90% for AgNPs [7]) before entering into the environment [8,9]. Several studies have shown that nanoparticles are retained and accumulated in sewage sludge, which would become a way of entering of NPs into the environment [4,10]. In many countries, this sewage sludge is often used as agricultural fertilizer, disposed in landfills and/or incinerated in thermal waste-treatment plants. Consequently, NPs might be transferred from the sewage sludge to different environmental compartments [2,11,12]. In fact, although there is still uncertainty about environmental concentration levels of NPs, predictive models have estimated that AgNPs might reach water bodies in the range of ng L^{-1} and soil, sediments, and sludge in the range of mg kg^{-1} [13–16].

* Corresponding author. Dept. of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, E-28040, Madrid, Spain.

** Corresponding author. Dept. of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, E-28040, Madrid, Spain.

E-mail addresses: gusmoren@ucm.es (G. Moreno-Martín), ymadrid@quim.ucm.es (Y. Madrid).

Once in the environment, conditions such as pH, organic matter, electrolyte composition and ionic strength, can influence both NPs behavior (mobility, transport, toxicity and bioavailability) and properties (size, surface chemistry, solubility and aggregation state) [17–20]. Therefore, the development of methods to determine and quantify nanoparticles is needed to correctly assess the impact of nanoparticles in humans and ecosystems [21].

A large number of methods have been established to detect, characterize and quantify metallic nanoparticles in the environment, mainly in soils and aqueous matrices [22]. Characterization techniques such as electron microscopy, ultraviolet-visible spectroscopy, dynamic light scattering or nanoparticle tracking analysis are widely used to obtain information about shape, size aggregation state and concentration of NPs. However, most of them do not provide limits of detection low enough to detect the NPs levels naturally occurring in the environmental samples [23,24]. Although the technique single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry (spICP-MS) dates from 2003, it has seen rapid growth recently. This trend is also the result of new developments in the field of ICP-MS in the last years, such as instruments that can be operated with dwell times within the microsecond range or capable of removing spectral interferences in a more straightforward way (e.g., the introduction of ICP-MS/MS instrumentation or new generations of SF-ICP-MS instruments) [25–27]. Therefore, this technique has become an important analytical tool to determine the particle number and elemental mass concentration and size distribution of metal-based NPs at environmentally relevant levels ($\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$) [28–30]. However, special attention should be paid to the NPs extraction procedure when applied spICP-MS to determine NPs in solid samples. NPs need to be separated from sample matrix without altering their original physicochemical properties [31,32]. Extraction methods using solvents of different nature (i.e., ultrapure water, detergents or surfactants [21, 33]) followed by some physical separation techniques such as centrifugation, sedimentation, filtration or dialysis are the sample treatment procedures most frequently used [21,34].

The main aim of this study is to develop a method for extracting AgNPs and AuNPs in sewage sludge with the aim of being analyzed by spICP-MS. For this purpose, 1) the effect of different extraction agents (ultrapure water and sodium pyrophosphate tetrabasic (TSP)) on size and aggregation state of both NPs was evaluated by transmission electron microscopy (TEM); 2) the influence of temperature, as well as centrifugation time and speed on the number of particles was investigated by using spICP-MS technique and multifactorial analysis of variance (ANOVA) and finally, 3) the developed methodology was applied to the determination of AgNPs and AuNPs in spiked sewage sludge.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Commercial sodium citrate-stabilized (2 mM) silver and gold nanoparticles of 60 and 80 nm from NanoComposix (San Diego, CA, USA) were employed to prepare AgNPs and AuNPs standards working solutions and spiked sewage sludge samples. Citrate-AuNPs reference material LGC5050 of 30 nm from LGC (Teddington, UK) was used to calculate transport efficiency in spICP-MS analyses. Ionic silver and gold standard solutions for ICP-MS (1000 mg L^{-1}) purchased from Merck (Madrid, Spain) were utilized to establish the calibration curves for ICP-MS. Guarantee-reagent grade nitric acid (60%, w/w) and hydrochloric acid (37%, w/w) were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain) and hydrogen peroxide (30%, v/v) obtained from Panreac (Barcelona, Spain) were employed to digest sewage sludge samples. To dilute the samples before spICP-MS analysis, citric acid, trisodium salt dehydrate (99%) was purchased from Merck (Madrid, Spain). Ultrapure water from a Milli-Q purification system (Millipore Corp., Bedford, MA) and sodium pyrophosphate tetrabasic (TSP, 95%) from Merck (Madrid, Spain) were utilized to extract the AgNPs and AuNPs from sewage sludge.

2.2. Instrumentation

A JEOL JEM 1400 (USA) operated between 60 and 120 kV and equipped with a microanalysis composition system was employed to evaluate changes in size, morphology and aggregation state of the AgNPs and AuNPs during extraction procedure. A minimum number of 300 particles were evaluated for each sample to characterize both nanoparticles.

A Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument LTD, Malvern UK) system equipped with a laser of 633 nm was used to determine changes in the hydrodynamic diameter and zeta potential of both NPs.

X-ray diffraction pattern for AgNPs and AuNPs was obtained by using a Panalytical X'PERT MPD X-ray diffractometer operating at voltage 45 KeV, current 40 mA and using $K\alpha$ of copper radiation ($1.54059\text{ \AA}$).

A 1000 W MSP microwave oven (CEM, Matthews, NC) equipped with temperature and pressure feedback controllers and 12 high pressure vessels of 100 mL inner volume (EasyPrep), operating at a maximum power of 1600 W was used for microwave acid digestion.

A 7700x ICP-MS from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) was used to determine total Ag and Au concentration and single particle analysis. The instrument was equipped with a concentric (Micromist) nebulizer and a refrigerated Scott-type spray chamber.

Extraction experiments were performed by using a See-Saw Rocker (Fisher Scientific, Madrid, Spain) and an Eppendorf 5804 R centrifuge (Hamburg, Germany).

2.3. Sewage sludge samples

Samples of sewage sludge were collected from a WWTP located in Madrid, Spain. The study of their physicochemical properties provided an oxygen chemical demand of $45.51 \pm 0.08\text{ g}\cdot\text{O}_2\cdot\text{L}^{-1}$, a total organic carbon content of $34.3 \pm 0.5\text{ g L}^{-1}$ and a total solids content of $55.5 \pm 0.3\text{ g kg}^{-1}$. The samples were transported to the laboratory and stored at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ until use. To perform recovery studies, 3.5 g of wet sewage sludge sample were weighted in 50 mL polypropylene centrifugal tubes, spiked with AgNPs of 60 nm and AuNPs of 80 nm suspension ($112\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{Ag L}^{-1}$ and $112\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{Au L}^{-1}$) to obtain $5.7\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{Ag kg}^{-1}$ and $5.7\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{Au kg}^{-1}$ dried sewage sludge, and mixed by using a See-Saw Rocker (at 45 opm) for a period of 24 h in the dark at room temperature. Next, the samples were centrifuged at $12\,857\text{ g}$ for 10 min to separate the supernatant from the NP-spiked sewage sludge. The NP-spiked sewage sludge samples were dried overnight into an oven at $42\text{ }^\circ\text{C}$. A non-spiked sewage sludge was also used as control sample.

2.3.1. Enrichment of sewage sludge with AgNPs and AuNPs and extraction experiments

The efficiency of the spiking procedure was verified throughout ICP-MS analysis and X-ray diffraction.

For this purpose, two sets of experiments were performed. In one set, Ag and Au total content was determined by ICP-MS, after performing a microwave acid digestion in the following samples: 1) dried sewage sludge samples (control and spiked samples), 2) supernatants obtained after spiking experiments and 3) NPs suspensions ($112\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{Ag L}^{-1}$ of 60 nm AgNPs and $112\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{Au L}^{-1}$ of 80 nm AuNPs). To determine total Ag content, about 0.05 g of dried sewage sludge or 1 mL of supernatant and NPs suspensions (3 replicates of each) were digested in the microwave with 3 mL of nitric acid and 1 mL of hydrogen peroxide at $150\text{ }^\circ\text{C}$ for 20 min, then cooled until room temperature and finally diluted with ultrapure water to a final volume of 10 mL. In the case of total Au content, the digestion procedure was the same as the one described for Ag, but in this case the microwave-digested samples were evaporated to dryness in Teflon vessels. Afterwards, 2 mL of aqua regia (HCl: nitric acid (3: 1)) was added and evaporated to dryness, and finally 1 mL of hydrochloric acid was added and evaporated to dryness. The samples were diluted to 10 mL with 2% HCl. In the other set of experiments, the dried sewage sludge (control and spiked samples) was analyzed by X-ray diffraction

and their stability was evaluated with this technique at the beginning and after 12 months of storage.

Extraction of AgNPs and AuNPs from sewage sludge was performed by modifying the method described by Torrent et al. [17]. Briefly, 5 mL of extracting solution (ultrapure water and TSPP in a concentration range between 2.5 and 50 mM) were added to about 0.05 g of dried sewage sludge and the mixture was submitted to rocker-agitation (at 45 opm) at room temperature overnight in the dark. Afterwards, the samples were centrifuged at 289 g during 5 min and the supernatant containing particles was pipetted and analyzed by TEM, dynamic light scattering (DLS), and spICP-MS, after dilution with 1 mM trisodium citrate to avoid the matrix effect. To evaluate the stability of NPs in the samples, spICP-MS analyses were performed after 0, 3, 6 and 12 months.

2.4. Optimization of the extraction parameters

2.4.1. Temperature effect

Suspensions of 60 nm AgNPs ($112 \mu\text{g}\cdot\text{Ag}\cdot\text{L}^{-1}$) and 80 nm AuNPs ($112 \mu\text{g}\cdot\text{Au}\cdot\text{L}^{-1}$) in ultrapure water were placed in an oven at 42°C overnight and subsequently analyzed by spICP-MS, to investigate the effect of temperature on NPs properties.

2.4.2. Centrifugation and solvent effect. Statistical analysis based on multifactorial ANOVA

The effect of centrifugation process on the isolation of AgNPs of 60 and 80 nm and AuNPs of 60 and 80 nm from sewage sludge was investigated by applying different centrifugation time (5 and 12 min) and speeds (289, 1575, 4629 and 12 857 g) to AgNPs ($112 \mu\text{g}\cdot\text{Ag}\cdot\text{L}^{-1}$) and AuNPs ($112 \mu\text{g}\cdot\text{Au}\cdot\text{L}^{-1}$) dispersions prepared in both ultrapure water and 2.5 mM TSPP. After each experiment, samples were analyzed by spICP-MS without prior sonication. Statistical analysis of data based on multifactorial ANOVA was applied to evaluate the effect of solvent and centrifugation time and speed on the recovery of both NP types.

2.5. Instrumental analysis and data processing

Data from ICP-MS analysis were collected at m/z 107 and 197 for Ag and Au, respectively. Dissolved Ag and Au calibration standards were prepared over a range from 1 to $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ with an acid content equivalent to that of the samples resulting from each digestion procedure. For the spICP-MS analysis, the dwell time was set to 3 ms with an acquisition time of 60 s for each sample (time resolved mode (TRA)). The transport efficiency was determined daily through the particle frequency method using citrate-AuNPs reference material LGC5050 that was appropriately diluted until a concentration of $10 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$. Its average value of different measurement sessions was $7.8 \pm 0.2\%$ [35]. Calibration curves of ionic Ag and Au were prepared daily within $1\text{--}100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ range in 1 mM trisodium citrate. Raw signal intensity data were processed manually using the Microsoft Excel spreadsheet developed by Abad-Álvarez et al. [36] to calculate the particle number concentration and particle size. A 5σ approach was used to discriminate particles from the background. The particle size and its corresponding size histogram were obtained considering the density of the metal, its mass fraction, the flow rate and the transport efficiency. Moreover, spherical shape of NPs was assumed in this calculation. Size detection limit (LOD_{size}) and number concentration limit ($\text{LOD}_{\text{number}}$) of each nanoparticle were determined through the spreadsheet mentioned above and by applying the equations described by Laborda et al. [37]. The recoveries of Ag and Au particles were assessed by comparing the concentration of particles (particles-Ag and Au kg^{-1} dry sewage sludge) extracted from sewage sludge to total concentration of particles (particles-Ag and Au kg^{-1} dry sewage sludge) incorporated in sewage sludge and by considering losses produced after centrifugation stage.

The software package Statgraphics 18 running under Windows 10 was used for the statistical analysis.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of the extraction parameters

Key parameters affecting AgNPs and AuNPs extraction from sewage sludge (extraction agent, temperature and centrifugation conditions (time and speed)) were evaluated in the reference suspensions of 60 nm AgNPs ($112 \mu\text{g}\cdot\text{Ag}\cdot\text{L}^{-1}$) and 80 nm AuNPs ($112 \mu\text{g}\cdot\text{Au}\cdot\text{L}^{-1}$). However, only in the evaluation of centrifugation conditions AgNPs of 60 and 80 nm and AuNPs of 60 and 80 nm were considered since size is a key factor that may greatly influence particle sedimentation during centrifugation processes.

Based on previous studies reported on the literature on AgNPs extraction in soils and sediments [31,34,38], ultrapure water and 2.5 mM TSPP at pH 9.56 ± 0.02 were chosen for this study as extracting agents. To evaluate the effect of the extracting agents on the original characteristics of NPs, NPs were dispersed in water and TSPP and subsequently analyzed by TEM and DLS. TEM micrographs in Fig. 1a–d evidence the presence of spherical and disperse 60 nm AgNPs and 80 nm AuNPs with an average diameter size of 60 ± 8 and 79 ± 9 nm, respectively, in both ultrapure water (Fig. 1a and c) and TSPP (Fig. 1b y d). These NPs were also characterized by DLS with the aim of assessing their stability. The hydrodynamic size of AgNPs in TSPP was 86 ± 6 nm while in ultrapure water was 65 ± 1 nm. In case of AuNPs, a higher hydrodynamic size was also found in TSPP, 96 ± 1 nm, compared to ultrapure water which was 88 ± 1 nm. The possible binding of TSPP to the surface of both nanoparticles could explain this increase in the hydrodynamic size. In addition, the zeta potential values obtained in both extracting agents indicate that AgNPs (-40 ± 1 and -45 ± 4 mV for ultrapure water and TSPP, respectively) and AuNPs (-40 ± 3 and -43 ± 2 mV for ultrapure water and TSPP, respectively) were stable, as these values are lower than -30 mV.

Considering that temperature might influence the stability of AgNPs and AuNPs during the sewage sludge drying step, changes in particle size and recovery of particle number between reference suspensions exposed at 42°C and room temperature (21°C) overnight were studied by spICP-MS. No significant differences (p-value greater than 0.05) were observed between both temperatures in terms of particle size and recovery of particle number (Table S1 in the Supplementary data). Therefore, these results indicated that the temperature employed in the sewage sludge drying process (42°C) would not have any effect on original size and concentration of AgNPs and AuNPs.

After assessing the effect of the extracting agent and temperature on AgNPs and AuNPs, it is of paramount importance to optimize the centrifugation time and speed. The results showed in Fig. 2 revealed a decrease in particle number recovery percentages as time and centrifugation speed increase regardless of nanoparticle size (60 nm and 80 nm). In case of 60 and 80 nm AgNPs (Fig. 2a and b) the best recoveries, higher than 74%, were obtained at a centrifugation speed of 289 g for both 5 and 12 min regardless the extracting agents employed.

However, for 80 and 60 nm AuNPs (Fig. 2c and d), recovery values above 74% were only obtained for a centrifugation speed of 289 g for 5 min. Therefore, to develop a method for further extracting AgNPs and AuNPs from sewage sludge in a single run, the optimal centrifugation conditions are 289 g during 5 min. A decrease in particle number recoveries as centrifugation speed increases was also observed by D.M. Schwertfeger et al. [33] and Lei Li et al. [21] during the optimization of an extraction method for determining AgNPs from soils. Despite the differences in particle number recovery, the sizes of both types of nanoparticles were not affected by the different centrifugation processes.

A multifactorial ANOVA analysis (data shown in Table S2) was also performed to jointly evaluate the effect of all parameters studied before (extracting agent, centrifugation time and speed, as well as size and NPs composition) on particle number recoveries. Fig. 3 shows significant differences in the particle number concentration (p-value less than 0.05)

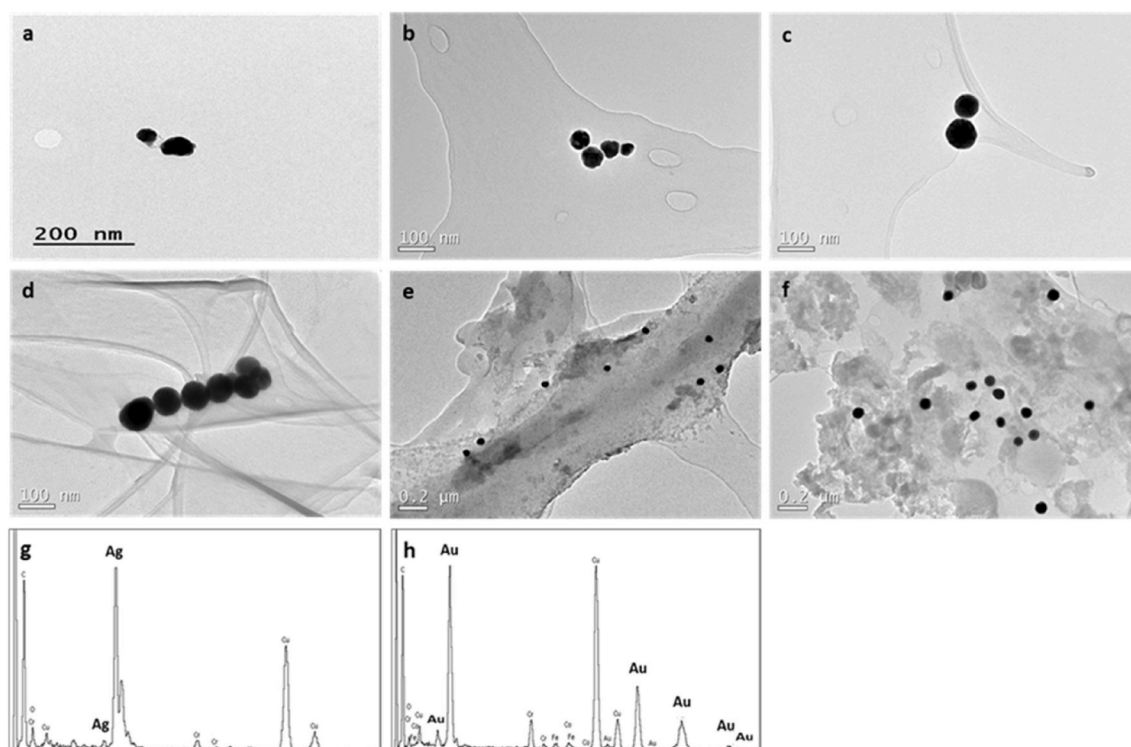


Fig. 1. TEM micrographs of 60 nm AgNPs in water (a) and TSPP (b) and 80 nm AuNPs in water (c) and TSPP (d) dispersions. The images e and f correspond to AgNPs and AuNPs, respectively extracted from spiked sewage sludge. The EDS spectra correspond to images g for AgNPs and h for AuNPs.

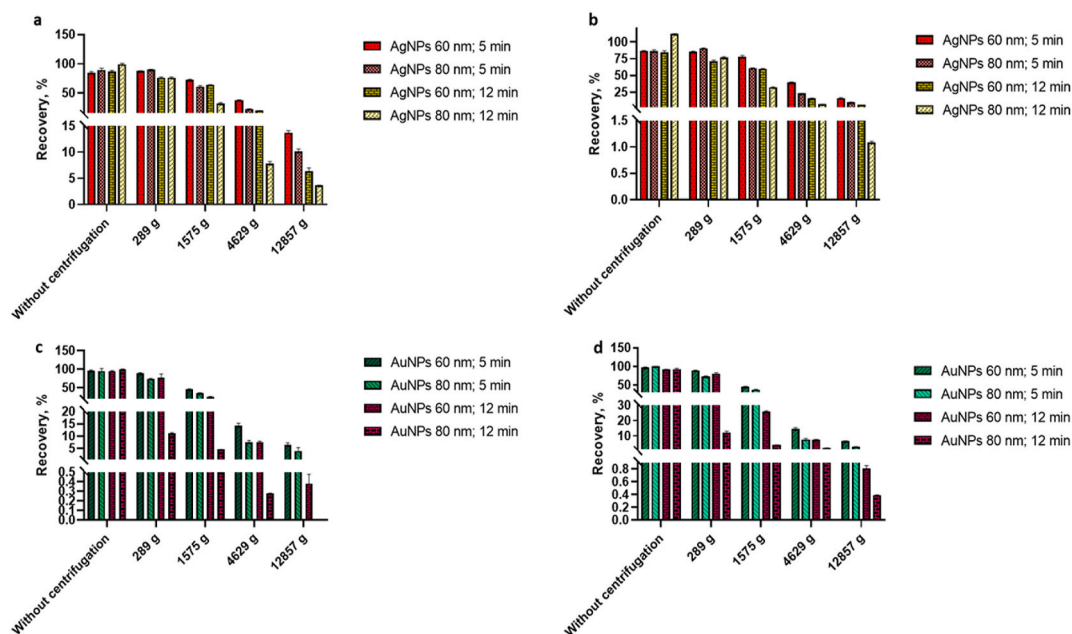


Fig. 2. Percentage of particle number recovery for 60 and 80 nm AgNPs in ultrapure water (a) and TSPP (b) and 60 and 80 nm AuNPs in ultrapure water (c) and TSPP (d) dispersions after applying different centrifugation conditions.

for all the factors studied except for the extracting agents (p-value 0.7504). In the case of centrifugation speed and time (p-value 0.0000 for both), increasing their values leads to an increase in the number of particles deposited at the bottom, thus affecting the recovery percentage. Moreover, this behavior is directly related to the NPs size (p-value 0.0000). Regarding the type of nanoparticles (p-value 0.0000), their effect on centrifugation and therefore on the recovery percentage could

be associated with the different density of both metals, 10.49 g cm^{-3} for Ag and 19.32 g cm^{-3} for Au. This statistical analysis also shows the existence of 5 secondary effects, i.e., statistically significant interactions (p-value less than 0.05) between the different factors (Fig. S1 in the Supplementary data): 1) centrifugation speed and time (Fig. S1a); 2) centrifugation speed and NPs size (Fig. S1b); 3) centrifugation speed and NPs composition (Fig. S1c); 4) centrifugation speed and NPs size

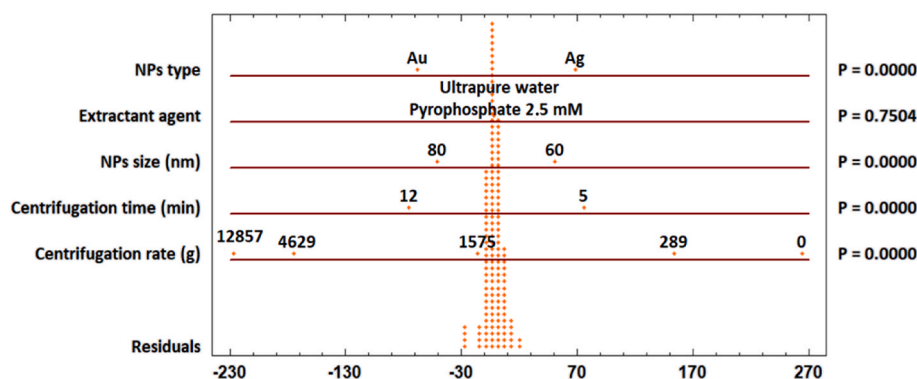


Fig. 3. Multifactorial ANOVA test. Influence of factors (NPs composition, extraction agent, NPs size, centrifugation time and centrifugation rate) on particle number recovery.

(Fig. S1d) and 5) NPs size and NPs composition (Fig. S1e). These interactions suggest the direct correlation between centrifugation time and speed, and NPs size with the recovery percentages. Furthermore, the relationship between centrifugation time and speed with respect to the composition of nanoparticles confirms the influence of the density of the metals on the recovery percentages.

3.2. Sewage sludge analysis

The developed extraction procedure was employed to determine AuNPs and AgNPs in sewage sludge. For this purpose, non-spiked samples and 60 nm AgNPs and 80 nm AuNPs spiked samples ($5.7 \text{ mg} \cdot \text{Ag} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $5.7 \text{ mg} \cdot \text{Au} \cdot \text{kg}^{-1}$ dried sewage sludge) were tested. Concerning to the efficiency of the spiking experiments evaluated after analysis of digested samples by ICP-MS, no significant differences were found between the expected amount of metal added ($37 \pm 1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $3.4 \pm 0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ for AgNPs and AuNPs, respectively) and the amount of metal found ($41 \pm 3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $3.6 \pm 0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ for AgNPs and AuNPs, respectively) considering that the moisture content of the sewage sludge was $86 \pm 4\%$, after drying at 42°C . Moreover, X-ray diffraction measurements were also carried out to confirm the presence of Ag and Au in non-spiked and NPs-spiked samples. For Ag, peaks from XRD spectrum (Fig. S2a) of non-spiked sample were correlated with ionic Ag, in form of Ag_2O_3 and Ag_3O_4 according to standard literature data (card number 01-077-1829 and 00-040-1054, respectively). In AgNPs-spiked sample, the peaks were also correlated not only with ionic Ag, in this case Ag_2O_3 , but also with metallic Ag (card number 00-001-1167), which would indicate the presence of AgNPs and the absence of new forms of Ag, apart from this metallic Ag. In case of Au, peaks from XRD spectra (Fig. S2b) did not allow us a clear identification of Au species in either non-spiked or AuNPs-spiked samples, which could be associated with its low levels in the sample. Although the presence of Au could not be corroborated by XRD, total content analysis performed by ICP-MS confirmed its presence in samples.

After fixing the centrifugation condition at 289 g during 5 min, the extraction of AgNPs and AuNPs from spiked sewage sludge was carried out using ultrapure water and 2.5 mM TSPP at $\text{pH} 9.56 \pm 0.02$. The percentage of particle number recovery using ultrapure water was less than $4.6 \pm 0.3\%$ for AgNPs and $3.0 \pm 0.5\%$ for AuNPs. In the case of 2.5 mM TSPP, a higher extraction efficiency was obtained for AgNPs, achieving recovery percentages of $70 \pm 2\%$, while for AuNPs recovery levels as low as $25 \pm 1\%$ were achieved. On the other hand, the histograms of Fig. S3 obtained by spICP-MS show that the size distribution of AgNPs and AuNPs after their extraction with both extracting agents varied with respect to the reference suspensions. Nevertheless, the average particle sizes of NPs extracted with ultrapure water ($58 \pm 8 \text{ nm}$ for AgNPs and $82 \pm 13 \text{ nm}$ for AuNPs) and 2.5 mM TSPP ($58 \pm 6 \text{ nm}$ for AgNPs and $83 \pm 13 \text{ nm}$ for AuNPs), corresponding to these histograms,

were not affected by the extracting agent since the average sizes were similar to those obtained for AgNPs ($59 \pm 7 \text{ nm}$) and AuNPs ($70 \pm 10 \text{ nm}$) reference dispersions (data were obtained from the histograms displayed in Fig. S3). In addition, for ultrapure water, it should be noted that the size distributions and their mean values are not very representative since the extraction percentages achieved were very low. In spite of that, the extraction results showed that 2.5 mM TSPP at $\text{pH} 9.56 \pm 0.02$ was the most appropriated extractant for isolating AgNPs and AuNPs from sewage sludge matrix, although when applied to AuNPs the extraction recovery was far from being quantitative.

Considering that an increase of TSPP concentration could improve the extraction efficiency of AuNPs in sewage sludge, TSPP concentration was optimized from 2.5 to 50 mM by fixing the pH around 9–10. Fig. 4a indicates that recovery of particle number showed an increasing trend as TSPP concentration increased until reaching a maximum value of $56 \pm 1\%$ at 20 mM. Furthermore, it should be noticed that an increase in TSPP concentration caused the sewage sludge extract to become increasingly turbid, as it can be seen in Fig. 4b. A possible explanation for this behavior can be attributed to the presence of carboxyl and phenolic groups in sewage sludge causing the organic matter to be negatively charged which can interact with Na^+ in TSPP solution generating an electrostatic repulsion between particles and therefore promoting the dispersion of the sewage sludge particles [21]. Moreover, the pyrophosphate provides a better extraction efficiency of the nanoparticles as it can displace the organic matter adsorbed on the surface of the nanoparticles [39,40]. Therefore, 20 mM TSPP was selected for extracting AgNPs and AuNPs from sewage sludge, since this increase in TSPP concentration did not affect the extraction recovery of AgNPs, obtaining a value of $71 \pm 2\%$, which remained constant but notably improve the extraction efficiency of AuNPs. Moreover, this increase in TSPP concentration did not affect either the size of both nanoparticles or the recovery of AgNPs, indicating that the TSPP concentration does not influence the centrifugation process. On the other hand, the analysis of control sewage sludge under these conditions did not show the occurrence of AgNPs and AuNPs.

To evaluate potential changes in AgNPs and AuNPs properties when they were extracted from sewage sludge, extracts were analyzed by TEM and DLS. In the direct analysis of the AgNPs and AuNPs in the extracts by TEM, micrographs in Fig. 1e and f shows that the NPs did not undergo any change during the extraction procedure since spherical and disperse AgNPs and AuNPs with an average diameter size of 62 ± 9 and $80 \pm 10 \text{ nm}$, respectively, were observed. However, in DLS analysis, the complexity of the extract interfered in the measurements of size due to the presence of large particles together with the NPs of interest. A distribution of $440 \pm 35 \text{ nm}$ and an average zeta potential of $-23 \pm 2 \text{ mV}$ were found in the extracts, after NPs extraction.

For an analytical method we usually strive for a recovery within the range of 70–120%. However, when the analytes are NPs, it is also

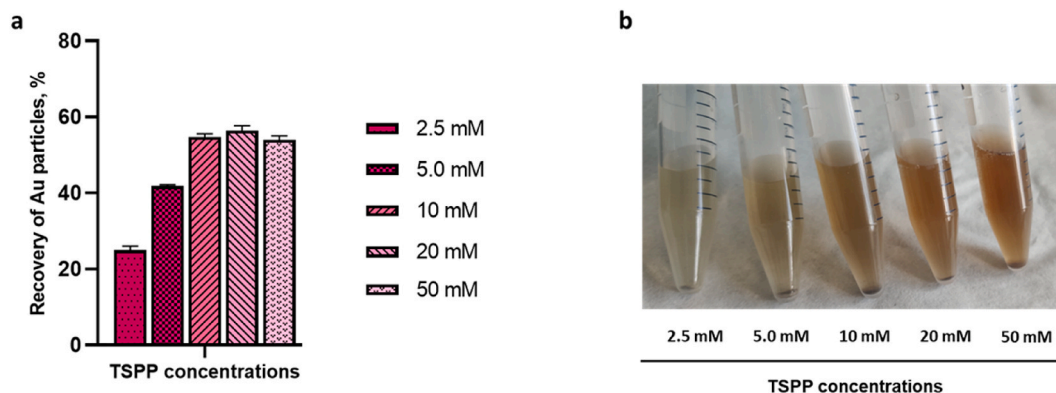


Fig. 4. Recovery percentage of Au particle number by increasing TSPP concentration (a) and change in extract turbidity with increasing extracting agent concentration (b).

important to avoid changes in their original physicochemical properties. The method developed using TSPP as extracting agent allowed the detection and size characterization of AgNPs and AuNPs, as well as estimating their particle number concentration, based on the extraction percentages obtained. The LOD_{size} for AgNPs and AuNPs were 23 and 16 nm, respectively, while the LOD_{number} were 3.12×10^9 particles kg^{-1} for AgNPs and 1.38×10^9 particles kg^{-1} for AuNPs.

In recent years, different extraction methods have been applied to separate AgNPs and AuNPs from environmental matrices prior to their detection by spICP-MS. Table 1 shows a comparison between the methods found in scientific literature for extracting NPs from environmental matrices and their analysis through spICP-MS. As it can be seen in the table, the recovery percentages achieved in the current study are comparable to those found in the literature.

3.3. Stability study

Stability studies of AgNPs and AuNPs in sewage sludge samples were also performed by spICP-MS analysis during 0, 3, 6 and 12 months and by applying the optimal extraction conditions described above. As it can be seen from Table 2, AgNPs remained stable during the first 3 months in sewage sludge, as it is shown by data on particle number concentration and recovery percentages, which are close to 70%. After 6 and 12 months, recovery percentages of Ag particles decreased to $54.9 \pm 0.2\%$

and $45.1 \pm 0.1\%$, respectively. In addition, an increase in the percentage of ionic Ag content was observed corresponding to a not detected concentration during the first 3 months, to $14 \pm 1\%$ for 6 months and $24 \pm 2\%$ for 12 months. In contrast, AuNPs remain stable in the sewage sludge for at least 12 months but also their stability was higher compared to the stability of AgNPs, as the appearance of ionic gold was not observed in any time of the study. Regarding the average diameter size of AgNPs and AuNPs, no significant differences were observed during the 12 months, as shown in Table 2 and in the histograms in Fig. 5. Considering the LODs obtained, all particle analyzed in this study could be detected since their size and number concentration are above both LODs. On the other hand, to evaluate possible changes in the structure and composition of the NPs in the sewage sludge, XRD analysis was carried out after 12 months. For Ag, it was only possible to identify the presence of Ag as ionic (Ag_2O_3) form in the spiked sample (Fig S2c) while for Au, the results obtained, both in the spiked and non-spiked samples (Fig. S2d), were no conclusive, as a clear identification of the phases could not be possible. Nevertheless, the spICP-MS analysis confirmed the presence of AgNPs and AuNPs in the sewage sludge during the period of time evaluated.

4. Conclusions

The aim of this study was to develop an analytical method for the

Table 1
Methods used to extract AgNPs and AuNPs from environmental matrices followed by their quantification by spICP-MS.

Matrix	NPs	Capping agent	Size (nm)	Extraction method	Extracting agent	Recovery (%)	LOD_{size} (nm)	LOD_{number} (particles kg^{-1})	Reference
Soil	AgNPs	Citrate	60	Aqueous extraction	Milli-Q water	37–44	20		[31]
			100						
Clay	AgNPs	Citrate	60	Aqueous extraction	Milli-Q water	42–46	20		[31]
			100						
Soil	AgNPs	Citrate	60	CPE	Milli-Q water		40		[17]
			100		+5% Triton X-114				
Soil	AgNPs	PVP*	75	CPE	Milli-Q water+		40		[17]
			100		5% Triton X-114				
Soil	AuNPs	Citrate	60	CPE	Triton X-114 +	>80			[28]
					NaCl; HNO_3 ; $CaCl_2$				
Soil	AgNPs	PVP	40	Aqueous extraction	2.5 mM TSPP	80			[33]
Soil	AgNPs	PVP	60	Aqueous extraction	2.5 mM TSPP	65			[21]
Soil	AgNPs	Citrate	80	Aqueous extraction	2.5 mM TSPP	97			[21]
Soil	AgNPs	Unknown	100	Aqueous extraction	2.5 mM TSPP	57			[21]
Sediment	AgNPs	PVP	60	Aqueous extraction	2.5 mM TSPP	99			[21]
Sediment	AgNPs	Citrate	80	Aqueous extraction	2.5 mM TSPP	70			[21]
Sediment	AgNPs	Unknown	100	Aqueous extraction	2.5 mM TSPP	66			[21]
Sewage sludge	AgNPs	Citrate	60	Aqueous extraction	25 mM TSPP	69	23	3.12×10^9	Present method
Sewage sludge	AuNPs	Citrate	80	Aqueous extraction	25 mM TSPP	57	16	1.38×10^9	Present method

Table 2

Stability of AgNPs and AuNPs in sewage sludge (mean $\pm$ sd; n = 3). The results are expressed per amount of dry sewage sludge.

Stability (months)	AgNPs-spiked sewage sludge				AuNPs-spiked sewage sludge			
	AgNPs size (nm)	Spiked-AgNPs (10^9 particles kg^{-1})	Found AgNPs (10^9 particles kg^{-1})	Recovery (%)	AuNPs size (nm)	Spiked-AuNPs (10^9 particles kg^{-1})	Found AuNPs (10^9 particles kg^{-1})	Recovery (%)
0	62 $\pm$ 8	156	109 $\pm$ 1	69.7 $\pm$ 0.8	76 $\pm$ 12	544	303 $\pm$ 2	55.6 $\pm$ 0.3
3	61 $\pm$ 8	156	108 $\pm$ 2	69 $\pm$ 1	76 $\pm$ 11	544	304 $\pm$ 2	55.9 $\pm$ 0.3
6	65 $\pm$ 9	156	85.6 $\pm$ 0.3	54.9 $\pm$ 0.2	78 $\pm$ 11	544	299 $\pm$ 1	54.9 $\pm$ 0.2
12	66 $\pm$ 10	156	70.4 $\pm$ 0.2	45.1 $\pm$ 0.1	81 $\pm$ 12	544	308 $\pm$ 1	56.7 $\pm$ 0.2

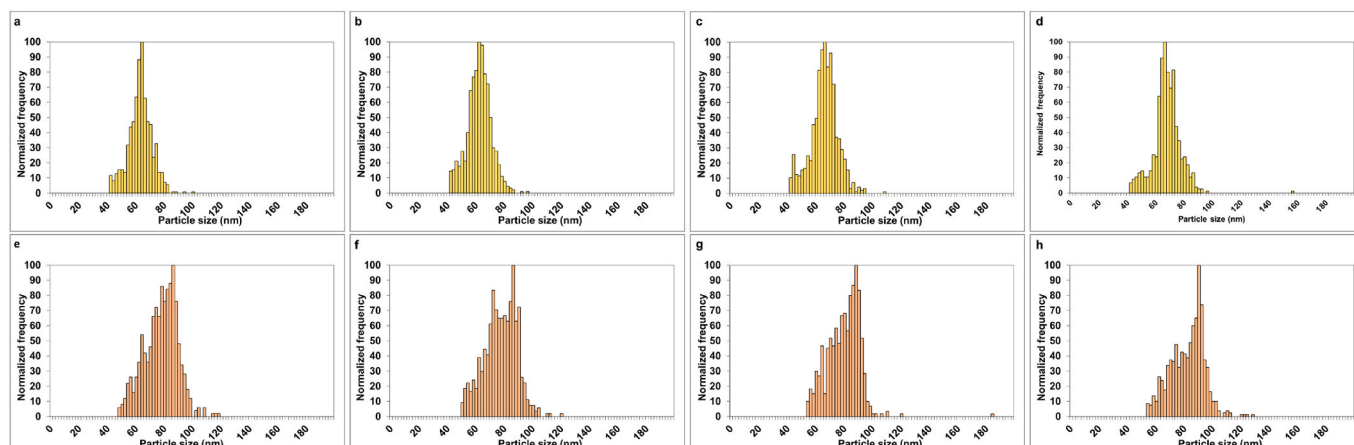


Fig. 5. AgNPs size distribution in sewage sludge spiked after 0 (a), 3(b), 6 (c) and 12 months(d). AuNPs size distribution in sewage sludge spiked after 0 (e), 3(f), 6 (g) and 12 months(h).

characterization of AgNPs and AuNPs, in terms of size and particle number concentration, in sewage sludge without changing the original physicochemical properties of the extracted NPs. In the optimization of the method, the effects of temperature, extracting agent, centrifugation rate and centrifugation time on the recovery of NPs were methodically investigated using standard dispersions of AgNPs and AuNPs of different size. Due to the large number of variables involved in the experiments, statistical analysis based on multifactorial ANOVA made possible to establish the effect of each factor on the recovery percentages, showing that both size and type of nanoparticles (i.e., the density of the metal that forms the NPs) highly influenced these percentages. The final method consisted of the extraction of these NPs, using 20 mM TSPP, followed by spICP-MS analysis of the resulting extract. Using this method, the particle number concentration, the particle size and size distribution of the AgNPs and AuNPs spiked to sewage sludge sample could be determined. In fact, stability study carried out applying this methodology allowed us to demonstrate that AgNPs were less stable than AuNPs in sewage sludge after 12 months of exposure, although the size of both NPs did not change during this period of time. However, after 6 months AgNPs underwent an oxidation process leading to an increased in silver ionic content in the samples analyzed. The developed method can be useful to eco-toxicological and risk-assessments studies of AgNPs and AuNPs in sewage sludge.

Credit author statement

Gustavo Moreno-Martín: Conceptualization, Methodology, Investigation, Validation Writing original draft, writing review and editing. Beatriz Gómez-Gómez: Conceptualization, Methodology, Investigation, Validation, writing review and editing. Maria Eugenia León-González: Conceptualization, Methodology, Validation, Supervision, Resources, writing review and editing. Yolanda Madrid: Conceptualization, Methodology, Validation, Supervision, Resources, writing review and editing, Funding acquisition.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors thank the Spanish Commission of Science and Technology (PID2020-114714RB-I00), the Comunidad de Madrid and European funding from FSE and FEDER programs for financial support (S2018/BAA-4393, AVANSECA-II-CM) and the Complutense University through a pre-doctoral grant (CT42/18-CT43/18).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123033>.

References

- [1] International Organization for Standardization, *Nanotechnologies-vocabulary-part 1: Core Terms and Definitions* (ISO/DIS 80004-1), 2015.
- [2] E. McGillicuddy, I. Murray, S. Kavanagh, L. Morrison, A. Fogarty, M. Cormican, P. Dockery, M. Prendergast, N. Rowan, D. Morris, Silver nanoparticles in the environment: sources, detection and ecotoxicology, *Sci. Total Environ.* 575 (2017) 231–246, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.041>.
- [3] The Nanodatabase, <https://nanodb.dk/en/> (accessed 2.22.2021).
- [4] P. Wang, N.W. Menzies, P.G. Dennis, J. Guo, C. Forstner, R. Sekine, E. Lombi, P. Kappen, P.M. Bertsch, P.M. Kopittke, Silver nanoparticles entering soils via the wastewater-sludge-soil pathway pose low risk to plants but elevated Cl concentrations increase Ag bioavailability, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 8274–8281, <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01180>.
- [5] N. Elahi, M. Kamali, M.H. Baghersad, Recent biomedical applications of gold nanoparticles: a review, *Talanta* 184 (2018) 537–556, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.088>.
- [6] Y. Huang, A.A. Keller, P. Cervantes-Avilés, J. Nelson, Fast multielement quantification of nanoparticles in wastewater and sludge using single-particle ICP-

- MS, ACS ES&T Water 1 (2021) 205–213, <https://doi.org/10.1021/acestwater.0c00083>.
- [7] T.M. Benn, P. Westerhoff, Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 4133–4139, <https://doi.org/10.1021/es7032718>.
 - [8] P. Cervantes-Avilés, Y. Huang, A.A. Keller, Multi-technique approach to study the stability of silver nanoparticles at predicted environmental concentrations in wastewater, *Water Res.* 166 (2019), 115072, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115072>.
 - [9] C. Meier, A. Voegelin, A. Pradas Del Real, G. Sarret, C.R. Mueller, R. Kaegi, Transformation of silver nanoparticles in sewage sludge during incineration, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 3503–3510, <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04804>.
 - [10] V. Bolaños-Benítez, F. McDermott, L. Gill, J. Knappe, Engineered silver nanoparticle (Ag-NP) behaviour in domestic on-site wastewater treatment plants and in sewage sludge amended-soils, *Sci. Total Environ.* 722 (2020), 137794, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137794>.
 - [11] S.A. Blaser, M. Scheringer, M. MacLeod, K. Hungerbühler, Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: contribution of nano-functionalized plastics and textiles, *Sci. Total Environ.* 390 (2008) 396–409, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.10.010>.
 - [12] D. Fytli, A. Zabanitoutou, Utilization of sewage sludge in EU application of old and new methods-A review, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 12 (2008) 116–140, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2006.05.014>.
 - [13] K. Tiede, A.B.A. Boxall, D. Tiede, S.P. Tear, H. David, J. Lewis, A robust size-characterisation methodology for studying nanoparticle behaviour in “real” environmental samples, using hydrodynamic chromatography coupled to ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 964–972, <https://doi.org/10.1039/b822409a>.
 - [14] S. Cunningham, L. Joshi, Assessment of Exposure to Metallic Nanoparticles (NPs), Focusing on Silver (AgNPs) on Marine and Freshwater Model Organisms at a Cellular and Genetic Level, EPA, Ireland.
 - [15] F. Gottschalk, T. Sonderer, R.W. Scholz, B. Nowack, Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 9216–9222, <https://doi.org/10.1021/es9015553>.
 - [16] M.A. Maurer-Jones, I.L. Gunsolus, C.J. Murphy, C.L. Haynes, Toxicity of engineered nanoparticles in the environment, *Anal. Chem.* 85 (2013) 3036–3049, <https://doi.org/10.1021/ac303636s>.
 - [17] L. Torrent, F. Laborda, E. Marguí, M. Hidalgo, M. Iglesias, Combination of cloud point extraction with single particle inductively coupled plasma mass spectrometry to characterize silver nanoparticles in soil leachates, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 5317–5329, <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01914-y>.
 - [18] J.R. Lead, G.E. Batley, P.J.J. Alvarez, M.N. Croteau, R.D. Handy, M.J. McLaughlin, J.D. Judy, K. Schirmer, Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects—an updated review, *Environ. Toxicol. Chem.* 37 (2018) 2029–2063, <https://doi.org/10.1002/etc.4147>.
 - [19] L. Goswami, K.H. Kim, A. Deep, P. Das, S.S. Bhattacharya, S. Kumar, A. Adelodun, Engineered nano particles: nature, behavior, and effect on the environment, *J. Environ. Manag.* 196 (2017) 297–315, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.01.011>.
 - [20] S.J. Yu, Y. Yin, J. Liu, Silver nanoparticles in the environment, *Environmental Sci.: Process. Impacts.* 15 (2013) 78–92, <https://doi.org/10.1039/c2em30595j>.
 - [21] L. Li, Q. Wang, Y. Yang, L. Luo, R. Ding, Z.G. Yang, H.P. Li, Extraction method development for quantitative detection of silver nanoparticles in environmental soils and sediments by single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 91 (2019) 9442–9450, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05575>.
 - [22] A. López-Serrano, R.M. Olivas, J.S. Landaluze, C. Cámara, Nanoparticles: a global vision. characterization, separation, and quantification methods. Potential environmental and health impact, *Anal. Methods.* 6 (2014) 38–56, <https://doi.org/10.1039/c3ay40517f>.
 - [23] J.A. Gallego-Urrea, J. Tuoriniemi, M. Hasselöv, Applications of particle-tracking analysis to the determination of size distributions and concentrations of nanoparticles in environmental, biological and food samples, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 473–483, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.01.005>.
 - [24] F. von der Kammer, P.L. Ferguson, P.A. Holden, A. Masion, K.R. Rogers, S.J. Klaine, A.A. Koelmans, N. Horne, J.M. Urline, Analysis of engineered nanomaterials in complex matrices (environment and biota): general considerations and conceptual case studies, *Environ. Toxicol. Chem.* 31 (2012) 32–49, <https://doi.org/10.1002/etc.723>.
 - [25] E. Bolea-Fernandez, D. Leite, A. Rua-Ibarz, L. Balcaen, M. Aramendia, M. Resano, F. Vanhaecke, Characterization of SiO₂ nanoparticles by single particle-inductively coupled plasma-tandem mass spectrometry (SP-ICP-MS/MS), *J. Anal. At. Spectrom.* 32 (2017) 2140–2152, <https://doi.org/10.1039/c7ja00138j>.
 - [26] E. Bolea-Fernandez, D. Leite, A. Rua-Ibarz, T. Liu, G. Woods, M. Aramendia, M. Resano, F. Vanhaecke, On the effect of using collision/reaction cell (CRC) technology in single-particle ICP-mass spectrometry (SP-ICP-MS), *Anal. Chim. Acta* 1077 (2019) 95–106, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.05.077>.
 - [27] I. Jreije, A. Azimzada, M. Hadioui, K.J. Wilkinson, Measurement of CeO₂ nanoparticles in natural waters using a high sensitivity, single particle ICP-ms, *Molecules* 25 (23) (2020), 5561, <https://doi.org/10.3390/molecules25235516>.
 - [28] H. El Hadri, V.A. Hackley, Investigation of cloud point extraction for the analysis of metallic nanoparticles in a soil matrix, *Environ. Sci. Nano.* 4 (2017) 105–116, <https://doi.org/10.1039/c6en00322b>.
 - [29] J.F. Liu, S.J. Yu, Y.G. Yin, J.B. Chao, Methods for separation, identification, characterization and quantification of silver nanoparticles, *Trends Anal. Chem.* 33 (2012) 95–106, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.10.010>.
 - [30] Y. Yang, L. Luo, H.P. Li, Q. Wang, Z.G. Yang, C.L. Long, Separation and determination of silver nanoparticle in environmental water and the UV-induced photochemical transformations study of AgNPs by cloud point extraction combined ICP-MS, *Talanta* 161 (2016) 342–349, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.08.052>.
 - [31] K.N.M. Mahdi, R.J.B. Peters, E. Klumpp, S. Bohme, M. van der Ploeg, C. Ritsema, V. Geissen, Silver nanoparticles in soil: aqueous extraction combined with single-particle ICP-MS for detection and characterization, *Environ. Nanotechnol. Monit. Manag.* 7 (2017) 24–33, <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2016.12.002>.
 - [32] J. Liu, G. Jiang, Silver Nanoparticles in the Environment, first ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, London, 2015 <https://doi.org/10.1007/978-3-662-46070-2>.
 - [33] D.M. Schwertfeger, J.R. Velicogna, A.H. Jesmer, S. Saaticioglu, H.A.O. McShane, R. P. Scroggins, J.I. Princz, Extracting metallic nanoparticles from soils for quantitative analysis: method development using engineered silver nanoparticles and SP-ICP-MS, *Anal. Chem.* (2017), <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04668>.
 - [34] K.N.M. Mahdi, R.J.B. Peters, E. Klumpp, S. Bohme, M. Van Der Ploeg, C. Ritsema, V. Geissen, Silver nanoparticles in soil : aqueous extraction combined with single-particle ICP-MS for detection and characterization, *Environ. Nanotechnol. Monit. Manag.* 7 (2017) 24–33, <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2016.12.002>.
 - [35] H.E. Pace, N.J. Rogers, C. Jarolimek, V.A. Coleman, C.P. Higgins, J.F. Ranville, Determining transport efficiency for the purpose of counting and sizing nanoparticles via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 83 (2011) 9361–9369, <https://doi.org/10.1021/ac201952t>.
 - [36] I. Abad-Álvarez, E. Peña-Vázquez, E. Bolea, P. Bermejo-Barrera, J.R. Castillo, F. Laborda, Evaluation of number concentration quantification by single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry: microsecond vs. millisecond dwell times, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 5089–5097, <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9515-y>.
 - [37] F. Laborda, A.C. Gimenez-Ingalaturre, E. Bolea, J.R. Castillo, About detectability and limits of detection in single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochim. Acta B: At. Spectrosc.* 169 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.sab.2020.105883>.
 - [38] Di Schwertfeger, J. Velicogna, A. Jesmer, H. McShane, R. Scroggins, J. Princz, Ion exchange technique (IET) to characterise Ag+ exposure in soil extracts contaminated with engineered silver nanoparticles, *Environ. Chem.* 14 (2017) 123–133, <https://doi.org/10.1071/EN16136>.
 - [39] G. Cornelis, L. Pang, C. Doolette, J.K. Kirby, M.J. McLaughlin, Transport of silver nanoparticles in saturated columns of natural soils, *Sci. Total Environ.* 463–464 (2013) 120–130, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.05.089>.
 - [40] I.C. Regelin, L. Weng, G.F. Koopmans, W.H. van Riemsdijk, Asymmetric flow field-flow fractionation as a new approach to analyse iron-(hydr)oxide nanoparticles in soil extracts, *Geoderma* 202–203 (2013) 134–141, <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2013.03.015>.

Appendix A. Supplementary data

for

Characterization of AgNPs and AuNPs in sewage sludge by single particle inductively coupled plasma mass

Gustavo Moreno-Martín*, Beatriz Gómez-Gómez, Maria Eugenia León-González, Yolanda Madrid*

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

*Corresponding Authors:

Prof. Yolanda Madrid Albarrán (E-mail: ymadrid@quim.ucm.es)

Gustavo Moreno Martín (E-mail: gusmoren@ucm.es)

Dept. of Analytical Chemistry

Faculty of Chemistry

Universidad Complutense de Madrid

E-28040 Madrid, Spain

Phone: ++0034913945145

Fax: ++0034913944329

Table S1. Particle size, particle number concentration and recovery obtained after placing suspensions of 112 $\mu\text{g}\cdot\text{Ag}$ and Au-L-1 in form of AgNPs and AuNPs of 60 and 80 nm at 42 °C and room temperature overnight. (mean $\pm$ sd; n = 3).

Nanoparticles	Temperature (°C)	Particle Size (nm)		Particle number concentration (10^7 particle mL^{-1})		
		Calculated ^a	Manufacturer value ^b	Found ^c	Estimated	Recovery (%)
AgNPs	42	56 $\pm$ 11	59 $\pm$ 5	9.5 $\pm$ 0.2	10.6	90 $\pm$ 3
AgNPs	21	55 $\pm$ 11	59 $\pm$ 5	9.0 $\pm$ 0.1	10.6	85 $\pm$ 2
AuNPs	42	76 $\pm$ 10	78 $\pm$ 10	2.2 $\pm$ 0.2	2.46	91 $\pm$ 5
AuNPs	21	80 $\pm$ 10	78 $\pm$ 10	2.3 $\pm$ 0.1	2.46	94 $\pm$ 2

Nanoparticle size measured by ^bTEM and ^aspICP-MS.

Nanoparticle concentration measured by ^cspICP-MS

Table S2. Data for multifactorial ANOVA analysis.

Centrifugation rate (g)	Centrifugation time (min)	NPs size (nm)	Extraction agent	NPs type	Recovery (%)
0	5	60	Ultrapure water	Au	97.5
0	5	60	Ultrapure water	Au	94.85
289	5	60	Ultrapure water	Au	88.2
289	5	60	Ultrapure water	Au	90.2
1575	5	60	Ultrapure water	Au	46.2
1575	5	60	Ultrapure water	Au	45.0
4629	5	60	Ultrapure water	Au	13.5
4629	5	60	Ultrapure water	Au	14.9
12857	5	60	Ultrapure water	Au	7.0
12857	5	60	Ultrapure water	Au	5.9
0	5	80	Ultrapure water	Au	90
0	5	80	Ultrapure water	Au	100.0
289	5	80	Ultrapure water	Au	73.0
289	5	80	Ultrapure water	Au	75.0
1575	5	80	Ultrapure water	Au	36.0
1575	5	80	Ultrapure water	Au	34.0
4629	5	80	Ultrapure water	Au	8.0
4629	5	80	Ultrapure water	Au	7.0
12857	5	80	Ultrapure water	Au	3.0
12857	5	80	Ultrapure water	Au	4.9
0	12	60	Ultrapure water	Au	93.5
0	12	60	Ultrapure water	Au	95.8
289	12	60	Ultrapure water	Au	70.3
289	12	60	Ultrapure water	Au	84.2

Table S2 cont. Data for multifactorial ANOVA analysis.

Centrifugation rate (g)	Centrifugation time (min)	NPs size (nm)	Extraction agent	NPs type	Recovery (%)
1575	12	60	Ultrapure water	Au	26.0
1575	12	60	Ultrapure water	Au	24.0
4629	12	60	Ultrapure water	Au	7.1
4629	12	60	Ultrapure water	Au	7.8
12857	12	60	Ultrapure water	Au	0.45
12857	12	60	Ultrapure water	Au	0.31
0	12	80	Ultrapure water	Au	98.0
0	12	80	Ultrapure water	Au	100.0
289	12	80	Ultrapure water	Au	10.8
289	12	80	Ultrapure water	Au	11.3
1575	12	80	Ultrapure water	Au	4.59
1575	12	80	Ultrapure water	Au	4.57
4629	12	80	Ultrapure water	Au	0.27
4629	12	80	Ultrapure water	Au	0.28
12857	12	80	Ultrapure water	Au	0.0
12857	12	80	Ultrapure water	Au	0.0
0	5	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	95.3
0	5	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	97.7
289	5	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	88.4
289	5	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	89.7
1575	5	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	44.2
1575	5	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	45.6
4629	5	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	14.0
4629	5	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	15.1
12857	5	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	6.6

Table S2 cont. Data for multifactorial ANOVA analysis.

Centrifugation rate (g)	Centrifugation time (min)	NPs size (nm)	Extraction agent	NPs type	Recovery (%)
12857	5	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	6.7
0	5	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	100.3
0	5	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	100.0
289	5	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	72.0
289	5	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	74.0
1575	5	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	38.0
1575	5	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	36.0
4629	5	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	8.0
4629	5	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	7.3
12857	5	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	2.9
12857	5	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	2.5
0	12	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	91.6
0	12	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	92.1
289	12	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	78.9
289	12	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	82.2
1575	12	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	25.6
1575	12	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	26.2
4629	12	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	7.5
4629	12	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	7.6
12857	12	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	0.84
12857	12	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	0.77
0	12	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	91.0
0	12	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	94.0
289	12	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	12.8
289	12	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	11.5

Table S2 cont. Data for multifactorial ANOVA analysis.

Centrifugation rate (g)	Centrifugation time (min)	NPs size (nm)	Extraction agent	NPs type	Recovery (%)
1575	12	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	4.04
1575	12	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	4.09
4629	12	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	2.06
4629	12	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	2.08
12857	12	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	0.38
12857	12	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Au	0.39
0	5	60	Ultrapure water	Ag	86.0
0	5	60	Ultrapure water	Ag	83.0
289	5	60	Ultrapure water	Ag	87.0
289	5	60	Ultrapure water	Ag	88.0
1575	5	60	Ultrapure water	Ag	71.0
1575	5	60	Ultrapure water	Ag	73.0
4629	5	60	Ultrapure water	Ag	38.0
4629	5	60	Ultrapure water	Ag	37.5
12857	5	60	Ultrapure water	Ag	14.0
12857	5	60	Ultrapure water	Ag	13.5
0	5	80	Ultrapure water	Ag	91.3
0	5	80	Ultrapure water	Ag	87.3
289	5	80	Ultrapure water	Ag	89.5
289	5	80	Ultrapure water	Ag	90.4
1575	5	80	Ultrapure water	Ag	62.0
1575	5	80	Ultrapure water	Ag	59.0
4629	5	80	Ultrapure water	Ag	22.5
4629	5	80	Ultrapure water	Ag	21.9
12857	5	80	Ultrapure water	Ag	9.8

Table S2 cont. Data for multifactorial ANOVA analysis.

Centrifugation rate (g)	Centrifugation time (min)	NPs size (nm)	Extraction agent	NPs type	Recovery (%)
12857	5	80	Ultrapure water	Ag	10.5
0	12	60	Ultrapure water	Ag	88.0
0	12	60	Ultrapure water	Ag	85.0
289	12	60	Ultrapure water	Ag	76.8
289	12	60	Ultrapure water	Ag	75.2
1575	12	60	Ultrapure water	Ag	64.0
1575	12	60	Ultrapure water	Ag	63.8
4629	12	60	Ultrapure water	Ag	19.7
4629	12	60	Ultrapure water	Ag	19.5
12857	12	60	Ultrapure water	Ag	5.9
12857	12	60	Ultrapure water	Ag	6.8
0	12	80	Ultrapure water	Ag	100.0
0	12	80	Ultrapure water	Ag	98.0
289	12	80	Ultrapure water	Ag	74.8
289	12	80	Ultrapure water	Ag	76.9
1575	12	80	Ultrapure water	Ag	31.0
1575	12	80	Ultrapure water	Ag	33.0
4629	12	80	Ultrapure water	Ag	8.1
4629	12	80	Ultrapure water	Ag	7.5
12857	12	80	Ultrapure water	Ag	3.7
12857	12	80	Ultrapure water	Ag	3.6
0	5	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	87.0
0	5	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	86.0
289	5	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	86.0
289	5	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	85.0

Table S2 cont. Data for multifactorial ANOVA analysis.

Centrifugation rate (g)	Centrifugation time (min)	NPs size (nm)	Extraction agent	NPs type	Recovery (%)
1575	5	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	76.0
1575	5	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	79.0
4629	5	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	40.2
4629	5	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	38.9
12857	5	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	16.7
12857	5	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	15.5
0	5	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	84.7
0	5	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	87.5
289	5	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	89.7
289	5	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	90.8
1575	5	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	61.0
1575	5	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	61.1
4629	5	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	23.1
4629	5	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	23.3
12857	5	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	10.0
12857	5	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	10.2
0	12	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	86.0
0	12	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	82.0
289	12	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	72.3
289	12	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	69.5
1575	12	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	59.9
1575	12	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	60.1
4629	12	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	16.0
4629	12	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	15.0
12857	12	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	6.3

Table S2 cont. Data for multifactorial ANOVA analysis.

Centrifugation rate (g)	Centrifugation time (min)	NPs size (nm)	Extraction agent	NPs type	Recovery (%)
12857	12	60	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	6.4
0	12	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	90.0
0	12	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	88.0
289	12	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	75.8
289	12	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	77.5
1575	12	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	32.0
1575	12	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	32.7
4629	12	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	7.0
4629	12	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	7.1
12857	12	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	1.07
12857	12	80	Pyrophosphate 2.5 mM	Ag	1.1

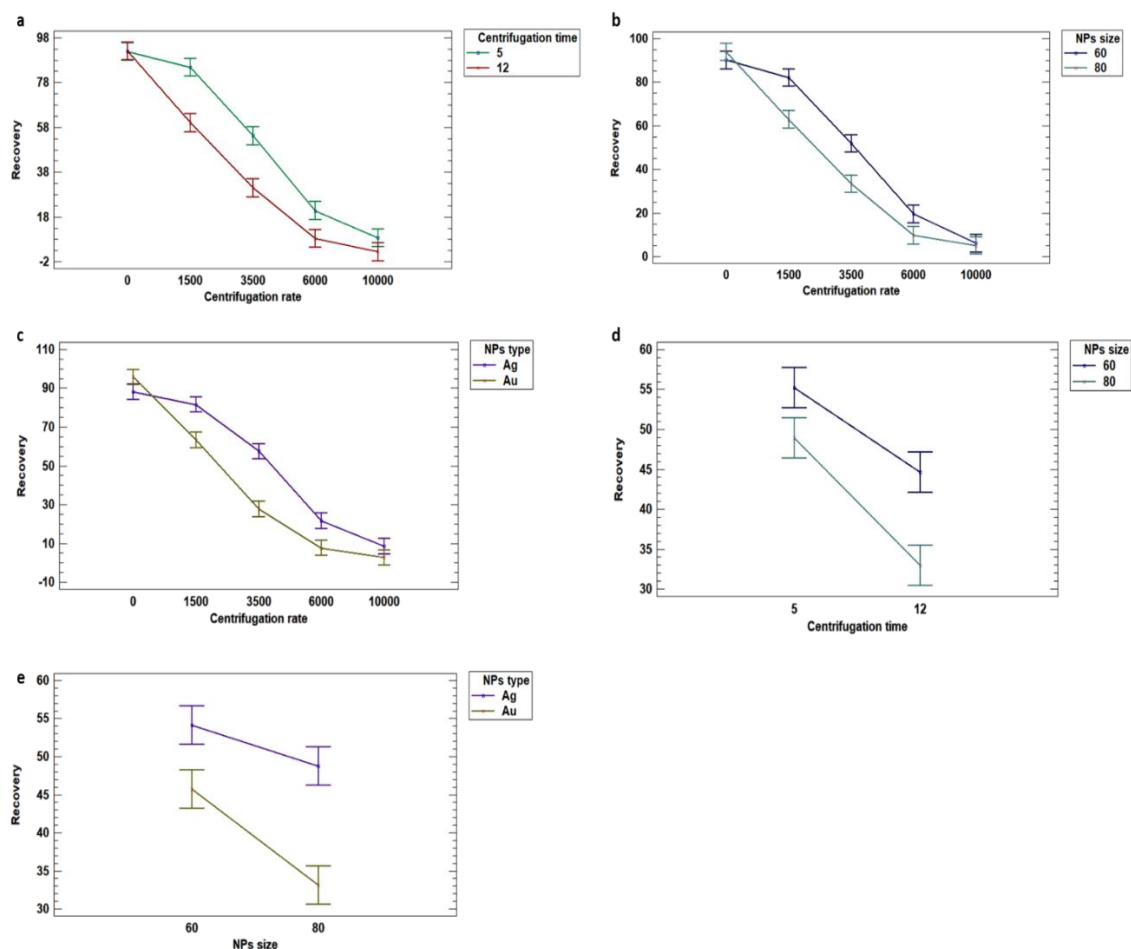


Fig S1. Secondary effects between the studied factors for AgNPs and AuNPs extraction by multifactorial ANOVA: centrifugation rate and centrifugation time (a), centrifugation rate and NPs size (b) centrifugation rate and NPs type (c), centrifugation time and NPs size (d) and NPs size and NPs type (e).

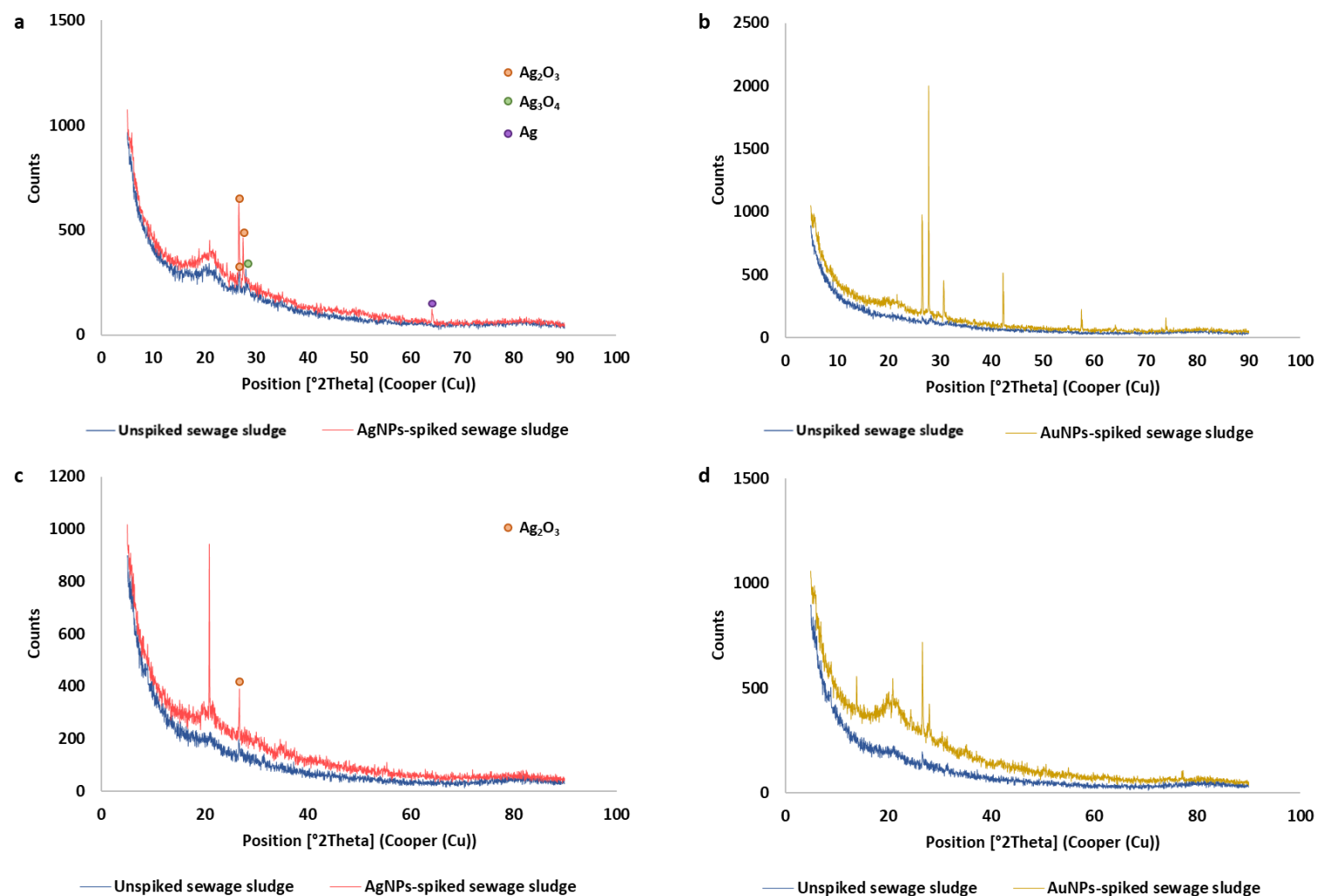


Fig. S2. XRD spectra after spiking sewage sludge with AgNPs and AuNPs at the beginning (a and b) and after 12 months of storage (c and d), respectively.

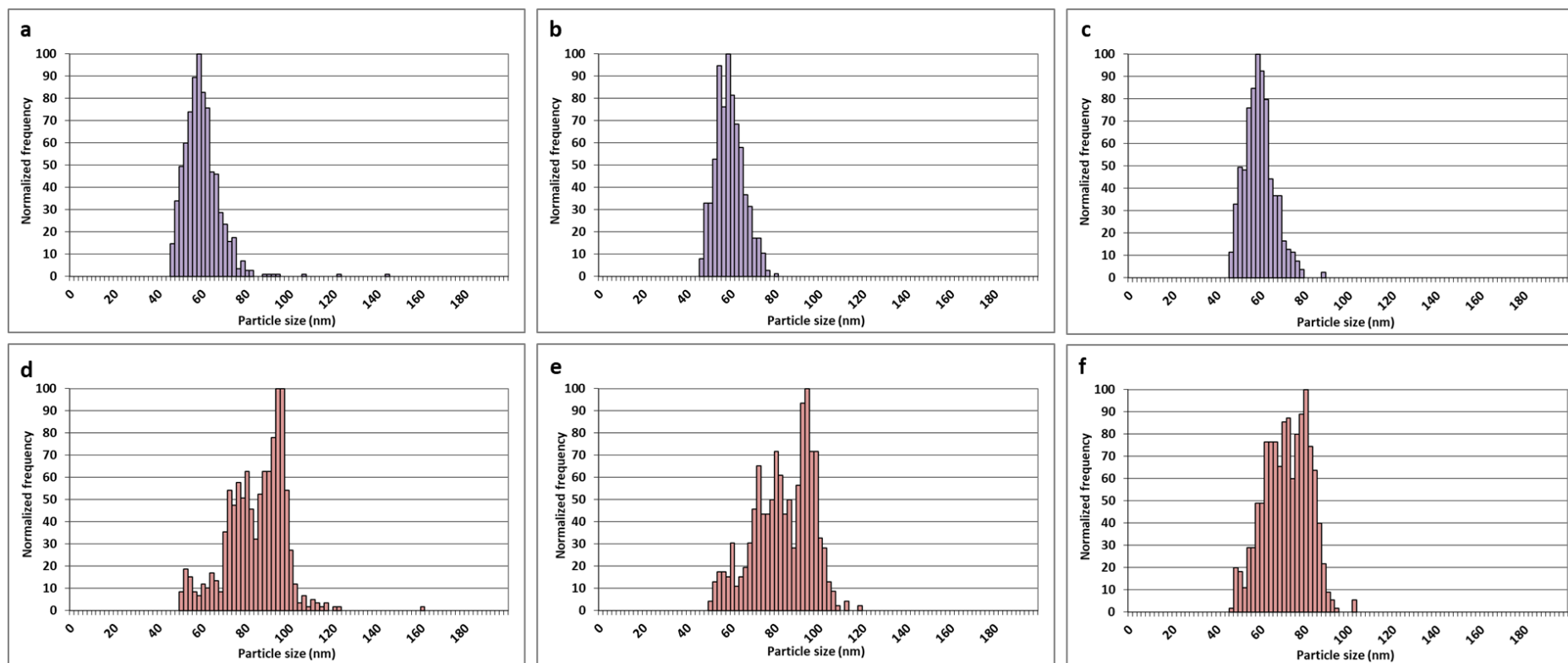


Fig. S3. Particle size distribution in sewage sludge after extraction of AgNPs using ultrapure water (a) and 2.5 mM TSPP pH (9.56 ± 0.02) (b) and AuNPs using ultrapure water (d) and 2.5 mM TSPP (9.56 ± 0.02) (e). Images c and f correspond to particle size distribution of AgNPs and AuNPs reference suspensions, respectively.

2. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE SeNPs. METABOLIZACIÓN DE SELENIO POR ORGANISMOS VIVOS: PLANTAS Y BACTERIAS

El selenio es un micronutriente esencial para los seres vivos ya que participa en importantes funciones fisiológicas como la estimulación del sistema inmune, el incremento de la producción de anticuerpos, la homeostasis redox, y la regulación del metabolismo de la hormona tiroidea. A pesar de estos beneficios, el rango entre la cantidad diaria requerida de selenio y la dosis tóxica es muy estrecho, dependiendo esta toxicidad no solo de la concentración sino también de la forma química en la que se encuentre presente este elemento. En este sentido es sabido que las especies inorgánicas de selenio (selenito y selenato) presentan una mayor toxicidad que las especies orgánicas (selenoaminoácidos). En los últimos años la investigación sobre el selenio se ha centrado también en las SeNPs al exhibir, entre otras propiedades, una toxicidad menor que el resto de las especies de este metaloide.

Las SeNPs son consideradas una nueva especie de este elemento que se caracterizan por sus capacidades antimicrobiana y antioxidante junto con su potencial efecto anticarcinogénico. Estas propiedades han incrementado el interés por estas nanopartículas y su aplicación en diferentes sectores científico-tecnológicos, así como en el campo de la biomedicina. Este uso creciente puede producir su entrada al medioambiente provocando su interacción con los ecosistemas acuáticos y terrestres. De hecho, este tipo de nanopartículas está siendo investigado para su aplicación como nanofertilizante para la fortificación en selenio de diferentes cultivos, como el de arroz, o trigo.

Las transformaciones que experimentan las SeNPs después de su exposición directa a diferentes organismos vivos son poco conocidas. Es cierto que existen algunos estudios relacionados con la formación y cuantificación de especies no volátiles de selenio, tras el crecimiento de plantas y bacterias en presencia de este tipo de nanopartículas. Sin embargo, estudios de esta misma naturaleza, pero relacionados con la producción de especies de selenio volátiles son más escasos, y aún más cuando se llevan a cabo *in vivo*, es decir, durante el ciclo vital del organismo objeto de estudio. En base a esto, en el primer trabajo titulado *In vivo solid phase microextraction for quantitative analysis of volatile organoselenium compounds in plants* (*Analytica Chimica Acta* 1081 (2019) 72- 80) se llevó a cabo la cuantificación *in vivo* de especies volátiles

orgánicas de selenio, producidas por las especies de plantas *Raphanus sativus* y *Brassica juncea* tras su exposición directa a SeNPs. Las SeNPs fueron sintetizadas en el laboratorio empleando selenito como precursor, ácido ascórbico como reductor y quitosano como estabilizante. Además, en este trabajo se demostró por primera vez la biotransformación de estas nanopartículas en las especies orgánicas volátiles DMSe y DMDSe.

En primer lugar, se desarrolló un nuevo método analítico basado en HS-SPME con estandarización interna en fibra, y análisis con GC-MS para la cuantificación de las especies volátiles orgánicas de selenio liberadas por ambas especies de plantas durante su crecimiento. Para ello, y a través de un diseño experimental, se optimizaron los efectos del tiempo de extracción y de la temperatura de desorción de las especies volátiles de selenio seleccionadas (DMSe, DESe y DMDSe), y del compuesto dimetilsulfuro deuterado (d^6 -DMS, *Dimethyl Sulfide- d^6*). Este último se utilizó como patrón interno para llevar a cabo la cuantificación, debido a la ausencia comercial de una especie de selenio marcada isotópicamente y de naturaleza volátil. La dificultad de cuantificar *in vivo* las especies volátiles mediante el uso de un patrón interno implica buscar un método reproducible para incorporar dicho estándar, y que sea alternativo a su adición directa sobre el medio de crecimiento del organismo, dado que podría alterar sus condiciones normales de crecimiento. El método propuesto para la extracción de los compuestos volátiles mediante HS-SPME, seguido de su separación y análisis por GC-MS se caracterizó porque durante la etapa de extracción, primero se extrajeron los compuestos DMSe, DESe y DMDSe sobre la fibra de SPME para a continuación extraer, sobre esa misma fibra, el compuesto d^6 -DMS depositado en un vial diferente al de los patrones de selenio. A través de esta metodología se consiguió obtener una mayor reproducibilidad frente a otras alternativas estudiadas.

El método fue posteriormente aplicado para cuantificar *in vivo* los compuestos volátiles de selenio producidos por ambas especies de plantas, durante su crecimiento en presencia de SeNPs en un sistema hidropónico. Una vez las plantas se pusieron en contacto con estas nanopartículas, se colocó sobre ellas una caja de metacrilato sin base con varios pasamuros que permitieron el alojamiento de un septum y, por tanto, la introducción de la fibra de SPME, en el espacio de cabeza, para la extracción de los compuestos volátiles de selenio. Una vez extraídos sobre la misma fibra los compuestos de selenio y el patrón interno, este último incorporado en un vial fuera de la caja de

metacrilato, se procedió a su desorción en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases. Los resultados evidenciaron la biotransformación de las SeNPs en DMSe y DMDSe tanto por *Raphanus sativus* como por *Brassica juncea*, en cantidades del orden de los ng. Finalmente, un estudio estadístico utilizando ANOVA multifactorial permitió evaluar la influencia de la especie de planta y el tiempo de exposición a las SeNPs con la producción tanto de DMSe como de DMDSe.

Una vez comprobada la interacción de las SeNPs con las plantas y su biotransformación a especies orgánicas volátiles de selenio, cabría preguntarse si estas nanopartículas podrían transformarse a especies no volátiles de selenio y además alterar la incorporación de metales esenciales y, por tanto, afectar el metabolismo de las plantas. Para intentar dar respuesta a esta pregunta se realizó el segundo trabajo que lleva por título *Insights into the accumulation and transformation of Ch-SeNPs by Raphanus sativus and Brassica juncea: Effect on essential elements uptake (Science of the Total Environment 725 (2020) 138453)* donde las plantas cultivadas en un sistema hidropónico en presencia de SeNPs fueron divididas en raíz y parte aérea para evaluar la acumulación de selenio, la biotransformación de las SeNPs en especies orgánicas no volátiles y el efecto de estas nanopartículas en la incorporación de metales esenciales para el desarrollo de la planta (Fe, Cu, Zn y Mo). La digestión ácida asistida por microondas de las diferentes partes de ambas plantas, y su posterior análisis por ICP-MS y espectroscopía de absorción atómica con llama (FAAS, *Flame Atomic Absorption Spectroscopy*), esta última para el análisis de Zn, permitió determinar la acumulación de selenio y de los diferentes metales esenciales tanto en la raíz como en la parte aérea de las plantas cultivadas en presencia y en ausencia de SeNPs. Mediante un proceso de hidrólisis enzimática, seguido del análisis de los extractos por HPLC-ICP-MS y HPLC-ESI-MS/MS se confirmó que estas nanopartículas se habían biotransformado en las especies orgánicas no volátiles de selenio: SeMet, SeMetSeCys y γ -Glu-SeMetSeCys. Finalmente, el efecto de las SeNPs en la incorporación de metales esenciales fue estudiado a través de un análisis ANOVA multifactorial y un análisis por PCA. El ANOVA multifactorial permitió evaluar la influencia del tratamiento y de las partes de las plantas (raíz y parte aérea) no solo sobre el contenido de Fe, Cu, Zn y Mo, sino también sobre el contenido de selenio y de las especies SeMet y SeMetSeCys. Por su parte, el análisis por PCA permitió estudiar la relación que había entre la cantidad de metales determinada en cada parte de la planta, o en la planta en su

conjunto, así como su relación con la naturaleza de las especies de selenio determinadas, incluyendo las especies volátiles estudiadas en el primer trabajo de este apartado.

Como se ha comentado, previamente, la toxicidad del selenio en los diferentes organismos vivos depende del tipo de organismo, y de la forma química y la concentración de selenio suplementada. En la presente Tesis Doctoral se ha evaluado además la interacción del selenio con las bacterias. En el caso concreto de las bacterias, su exposición a niveles elevados de selenio, principalmente en forma de selenito, hace que activen un mecanismo de detoxificación por el que eliminan este elemento en forma de SeNPs, y de especies orgánicas volátiles, como DMSe y DMDS₂. En los últimos años, la síntesis de nanopartículas mediante procesos biogénicos (microorganismos y extractos de plantas) se ha incorporado a los métodos de síntesis de nanopartículas ya que, ofrece ventajas como estar en consonancia con los principios de la Química Verde (disminución de productos químicos, condiciones menos drásticas de síntesis, etc.) y compatibilidad de las nanopartículas con aplicaciones biomédicas. Sin embargo, la caracterización de las nanopartículas en general y de las de origen biogénico en particular, supone un reto para la Química Analítica, ya que además de utilizar plataformas multitécnica para determinar las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas, se deben establecer métodos que permitan separar las nanopartículas de las matrices biológicas utilizadas para su síntesis. En base a esto, en el tercer trabajo titulado *Determination of size and mass-and number-based concentration of biogenic SeNPs synthesized by lactic acid bacteria by using a multimethod approach* (*Analytica Chimica Acta* 992 (2017) 34- 41) se cultivaron diferentes bacterias del género *Lactobacillus* (*Lactobacillus acidophilus* CRL 636, *Lactobacillus reuteri* CRL 101 y *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* CRL 656) en presencia de selenito de sodio para llevar a cabo la síntesis biogénica de SeNPs, y su posterior separación y caracterización.

Aunque todas las bacterias del género *Lactobacillus* fueron capaces de sintetizar SeNPs tras su cultivo en presencia de selenito, *Lactobacillus reuteri* mostró una mayor capacidad de acumulación de selenio. Por tanto, esta especie fue considerada la más adecuada para sintetizar este tipo de nanopartículas, y llevar a cabo su separación y caracterización. El uso de tensioactivos (dodecilsulfato de sodio (SDS, *Sodium Dodecyl Sulfate*)) para la ruptura de la pared bacteriana y la filtración en serie permitió separar las SeNPs del cultivo bacteriano. Posteriormente, la aplicación de una plataforma multitécnica

permitió realizar la caracterización de estas nanopartículas. Esta plataforma incluyó técnicas basadas en la microscopía electrónica, y en la dispersión de luz para determinar el tamaño y la concentración en número de las SeNPs. Asimismo, el acoplamiento *online* y *offline* de la técnica AF⁴ con ICP-MS permitió determinar la concentración en masa de las SeNPs y recoger la fracción nanoparticulada para establecer su tamaño por DLS.

Los estudios de la interacción de selenio con bacterias se ampliaron a bacterias tan importantes desde el punto de vista medioambiental, alimentario y clínico como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Los resultados obtenidos se recogen en este apartado, y en concreto en el cuarto trabajo que lleva por título *In vivo quantification of volatile organoselenium compounds released by bacteria exposed to selenium with HS-SPME-GC-MS. Effect of selenite and selenium nanoparticles* (Talanta 224 (2021) 121907) y en el quinto trabajo titulado *Exploring the metabolic transformations of selenium in Escherichia coli and Staphylococcus aureus exposed to selenite and selenium nanoparticles* (enviado a *Analytica Chimica Acta*). En el cuarto trabajo, el cultivo de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en presencia de selenio en forma de selenito y de SeNPs puso de manifiesto que ambas especies bacterianas transformaron las dos formas de selenio en especies orgánicas volátiles de este elemento (DMSe y DMDSe) y en especies volátiles mixtas de azufre y selenio (sulfuro de dimetilselenio; DMSeS; *Dimethyl Selenenyl Sulfide*).

La adaptación del método optimizado en el primer artículo de este apartado a las condiciones de crecimiento bacteriano permitió cuantificar el DMSe y DMDSe producidos por estas bacterias. En este caso, los Erlenmeyer, donde se realizó el cultivo bacteriano, fueron sellados con un septum para poder introducir la fibra de SPME y así llevar a cabo la extracción de las distintas especies volátiles. Asimismo, el análisis ANOVA multifactorial de los resultados permitió relacionar la formación de estos compuestos volátiles de selenio con la forma de selenio añadido al cultivo, y con el tipo de especie bacteriana, ya que *Escherichia coli* pertenece a la familia de las bacterias Gramnegativas mientras *Staphylococcus aureus* a la familia de las Grampositivas.

Vista la capacidad de estas dos especies bacterianas de transformar el selenito y las SeNPs en las especies volátiles DMSe y DMDSe, en el último artículo de este apartado se evidenció que ambas bacterias también fueron capaces de convertir estas dos formas químicas de selenio, incorporadas en su cultivo, en el selenoaminoácido SeCys. Para ello

se llevó a cabo la optimización del tiempo de incubación necesario para llevar a cabo una correcta extracción de las especies del pellet bacteriano, haciendo uso de una hidrólisis enzimática con proteasa XIV, previa ruptura enzimática o mecánica de la pared bacteriana, utilizando lisozima y bolas de vidrio, respectivamente. Posteriormente, el análisis por HPLC-ICP-MS del extracto mostró la aparición de un único pico cromatográfico. Aunque este pico podía relacionarse con la SeCys, fue necesario realizar un proceso de carbamidometilación, previo a la hidrólisis enzimática, para preservar la integridad de dicha especie mediante la protección de los residuos de SeCys y evitar así que reaccionasen formando puentes Se-Se y/o Se-S. Asimismo, para corroborar la formación de SeCys por parte de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, fue necesario recurrir a una segunda técnica, HPLC-ESI-MS/MS. Esta técnica confirmó la formación de CAM-SeCys, y por tanto de SeCys, a través de su patrón de fragmentación y de una búsqueda bibliográfica debido a la ausencia de un estándar de CAM-SeCys.

2.1. Microextracción en fase sólida *in vivo* para el análisis cuantitativo de compuestos orgánicos volátiles de selenio en plantas

In vivo solid phase microextraction for quantitative analysis of volatile organoselenium compounds in plants

Gustavo Moreno-Martín, Jon Sanz-Landaluze, María Eugenia León-González,
Yolanda Madrid

Analytica Chimica Acta 1081 (2019) 72-80

Parte de los resultados de esta investigación se presentaron en:

40TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON ENVIRONMENTAL & FOOD MONITORING.
*Semiquantification of volatile selenium species from radish (*Raphanus sativus*) exposed to chitosan-modified selenium nanoparticles by GC/MS and headspace solid-phase microextraction.*
Santiago de Compostela, España, junio de 2018. Tipo de comunicación: oral.

III SIMPOSIO ANUAL EN QUÍMICA AVANZADA. Semicuantificación por GC/MS y microextracción en fase sólida en espacio en cabeza de especies volátiles de selenio producidas por rábanos (*Raphanus sativus*) expuestos a nanopartículas de selenio modificadas con quitosan.
Madrid, España, julio de 2018. Tipo de comunicación: oral.



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

In-vivo solid phase microextraction for quantitative analysis of volatile organoselenium compounds in plants

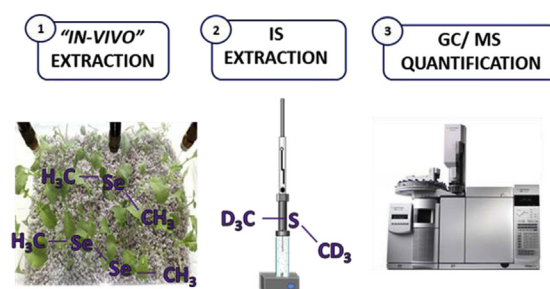
Gustavo Moreno-Martin, Jon Sanz-Landaluze, María Eugenia León-Gonzalez **, Yolanda Madrid*

Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, Spain

HIGHLIGHTS

- HS-SPME and in fiber internalization is developed for *in vivo* volatile Se compounds.
- DMSe and DMDSe released by plants exposed to SeNPs were quantified.
- Plant type and time of exposure on volatile Se compounds was evaluated by ANOVA.
- Transformation of SeNPs in living system as plants is demonstrated.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 April 2019

Received in revised form

18 June 2019

Accepted 28 June 2019

Available online 30 June 2019

Keywords:

Headspace solid-phase microextraction

Gas chromatography coupled to mass

spectrometry

Chemometrics analysis

Selenium nanoparticles

Plant metabolisms

In vivo volatile selenium compounds

quantification

ABSTRACT

A new calibration method based on the use of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and in-fiber internal standardization, combined with gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) was developed for quantifying Se volatile organic species released by plants exposed to chitosan-modified selenium nanoparticles (Cs-SeNPs). The effect of several parameters affecting extraction and separation of the selected organic species of selenium (dimethylselenium (DMSe), diethylselenium (DESe) and dimethyldiselenium (DMDSe)) and deuterated dimethyl sulphide (d^6 -DMS) employed as internal standard were studied and optimized using an experimental design. The developed methodology was applied for quantifying the volatile selenium compounds produced over time by the plant species *Raphanus sativus* and *Brassica juncea* grown in hydroponic solution containing 5 mg Se L^{-1} in the form Cs-SeNPs. The procedure employed consisted in two steps. Volatile selenium species released from the plants were first extracted in the SPME fiber located at the headspace of a box with a fixed volume. Subsequently, the internal standard placed in a vial subjected to the same conditions as plants was extracted on the same fiber than the one previously used for extracting selenium compounds. Finally the extracted compounds were separated and analyzed by GC/MS. Results evidenced Cs-SeNPs biotransformation into DMSe and DMDSe by both plants species during growing stage, in amounts of the order of ng. Additionally, the resulting data were submitted to multifactorial ANOVA to evaluate the influence of plant type and time of exposure to Cs-SeNPs on the production of volatile selenium compounds.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author. Dept. of Analytical Chemistry Faculty of Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, E-28040, Madrid, Spain.

** Corresponding author. Dept. of Analytical Chemistry Faculty of Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, E-28040, Madrid, Spain.

E-mail addresses: leongon@quim.ucm.es (M.E. León-Gonzalez), ymadrid@quim.ucm.es (Y. Madrid).

1. Introduction

SPME has been usually employed for *in-vivo* monitoring of semi-volatile and volatile compounds released from metabolic processes. The experiments have been mostly performed in headspace (HS) mode as protects the fiber coating from damage by the presence of non-volatile interferences and high molecular mass compounds and, therefore extending the useful life of the fiber. Moreover, HS mode allows modifying the matrix by adjusting the pH and adding salts with the aim of enhancing analytes volatility [1–4]. Moreover, static headspace SPME is usually preferred instead of dynamic SPME for volatile compounds extraction from living organism as it does not require a purge gas that could alter the growing conditions of the organisms. Unfortunately, SPME is used in most of the reported studies as screening but not as a quantitative analytical tool.

SPME quantification is based on the mass transfer of analytes between the different phases of the system [5]. Despite of the existence of calibration methods exclusively developed for their application in SPME (equilibrium extraction, exhaustive extraction and diffusion-based calibration), traditional calibration methods such as external standard, standard additions and internal standard have been also applied for performing quantitative determination using SPME methodologies [6,7]. In this line, traditional methods have been extensively used for quantifying volatile organic compounds (VOCs) in environmental, biological/clinical and food matrices by means of using HS-SPME. Nevertheless, the application of these quantification methods when working with SPME is not an easy task and several problems can occur. For instance, external standard calibration lacks of precision due to the differences between the samples and the calibration conditions. Moreover, when standard additions and internal standard are employed, ensuring homogeneity in adding the standard is complicated, especially when dealing with living systems. Internal standard calibration overcomes the disadvantages of both external (a high dilution and the need of using a blank sample matrix for complex samples) and standard additions calibration (the need of analyzing a large number samples) [1,6,8,9]. In addition, this calibration method corrects losses of analyte during sample preparation and irreproducibility in the injection volume when working with gas chromatography. Unfortunately, it is difficult to find a compound that properly acts as internal standard (IS), since it must have similar properties to those of the analytes under study and they must not be present in the sample. Among internal standards, the use of an isotopic analogue of the analyte such as deuterated IS is nowadays the best alternative [5]. Unfortunately, deuterated IS are commercially available only for a small number of compounds and they are very expensive. Pawliszyn's group introduced the concept of in-fiber internal standardization based on the pre-loading of the IS in the fiber before performing the extraction of the analytes [10,11]. Despite of its high potential, its use in *in-vivo* systems has not been evaluated yet. As it has been mentioned, the application of HS-SPME-GC in living systems have been limited to screening the VOCs profile released from bacteria [4,12–14], fungi [4,15,16] or plants [4,16,17]. In those studies in which quantification has been performed, SPME calibration methods have been applied which are by far more complex when comparing with the calibration based on in-fiber internal standardization.

Selenium is an essential trace element for many living systems. Selenium essentiality and toxicity depends on their concentration and chemical form [18]. Recently, interest in selenium has been focused on selenium nanoparticles (SeNPs) that are considered as a new Se species. SeNPs present a lower cytotoxicity than organic and inorganic selenium species [19]. Of special interest is its potential application in the field of agriculture where SeNPs could replace the use of selenate as fertilizer. The ability of plants to

biotransform inorganic selenium into organic selenium species is well documented [20]. In this biotransformation process, the formation of volatile organoselenium compounds is considered as a self-detoxification process. DMSe and DMDSe are the main volatile metabolites produced by plants as a results of phyto-volatilization or biomethylation of selenium [21,22]. However, direct exposure of plants to SeNPs has been less explored. Previous studies have shown that SeNPs are biotransformed into non-volatile organoselenium compounds in *Raphanus sativus*, but the volatile fraction has not been investigated yet [23].

Consequently, two novelties are presented in this work. The first one is the development and optimization of a method based on HS-SPME-GC/MS and internal calibration using deuterated species with the aim of performing for first time the traceability and -quantification of volatile organoselenium compounds released *in-vivo* systems, specifically in plants hydroponically cultivated in the presence of chitosan-modified selenium nanoparticles (Cs-SeNPs). On the other hand, the results obtained when the developed method was applied to plants species (*Raphanus sativus* and *Brassica juncea*) hydroponically grown in presence of nanoparticles evidence the biotransformation of SeNPs into volatile species by plants.

2. Materials and methods

2.1. Synthesis of chitosan-modified selenium nanoparticles (Cs-SeNPs)

Nanoparticles were prepared following the procedure described by Bay et al. [24] Firstly, ascorbic acid (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) was added dropwise into an aqueous solution of chitosan (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and kept under stirring at 250 rpm for 30 min at room temperature. After that, sodium selenite (Merck, Madrid, Spain) was slowly added to the chitosan-ascorbic acid mixture. The dispersion was subsequently diluted to 250 mL to get a final composition of 200 mg L⁻¹ of selenium as Cs-SeNPs, 0.1% (w/v) chitosan and 0.054 M ascorbic acid. Synthesized Cs-SeNPs were stored at 4 °C for up to two months.

Cs-SeNPs were characterized in terms of size, morphology and composition by transmission electron microscopy (TEM) (JEOL JEM 2100, USA) operated at 200 kV and equipped with an X-ray energy dispersive spectroscopy (XEDS) microanalysis composition system (Oxford Inca, city). TEM characterization of Cs-SeNPs was also performed in presence of perlite (Ikea, Madrid, Spain) and 0.1 strength Hoagland's nutrient solution [23] with the aim of evaluating the effect of hydroponic medium composition on the size, shape and state of aggregation of these NPs.

2.2. HS-SPME-GC/MS optimization

Optimization was performed by using a factorial experimental design; two factors and two levels plus three replicates at the center point with a total of 7 experiments were applied. To obtain the response function, extraction time (10–30 min) and desorption temperature (240–300 °C), at two levels each, were studied. All experiments were carried out by using 5 µg L⁻¹ of d⁶-DMS (Merck, Madrid, Spain), as internal standard (IS), and 100 µg Se L⁻¹ for dimethylselenium (DMSe) and dimethyldiselenium (DMDSe) and 50 µg Se L⁻¹ for diethylselenium (DESe) (all of them supplied from Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). All were dissolved in H₂O: MeOH (50: 50, v/v) solution by using purified water (18 MΩ cm⁻¹), from a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA) and MeOH (HPLC grade, Scharlab, Barcelona, Spain). The order of experiments was fully randomized.

The analytical procedure consists of two stages: extraction by

HS-SPME followed by separation and analysis by GC/MS. In the extraction step, 2.0 mL of a standard aqueous solution containing the three volatile selenium compounds, at the concentration levels indicated above, were transferred to a 4 mL screw-capped vial (sealed with a Teflon-lined silicon septum) (Scharlab, Barcelona, Spain). Then, a 75 μm fiber coated with Carboxen/PDMS (Supelco, Bellefonte, PA, USA) was inserted into the vial through the septum and the set was placed in a heating plate whose temperature was kept constant at 25 °C without stirring. Analytes extraction was performed in the headspace during 26 min. Immediately after this extraction, the same fiber was inserted in other 4 mL screw-capped vial (sealed with a Teflon-lined silicon septum) with 2.0 mL of a standard aqueous solution containing IS at a concentration level of 5 $\mu\text{g L}^{-1}$. The extraction conditions for IS were the same as those mentioned above for selenium compounds.

The responses obtained were expressed as retention time (RT) for internal standard and response factor (RF) for each selenium compound. According to Eq. (1), RF was calculated by considering the ratio between the analyte area and the internal standard concentration with respect to the internal standard area and the analyte concentration.

$$\text{RF} = \frac{A_{\text{analyte}} \times C_{\text{IS}}}{A_{\text{IS}} \times C_{\text{analyte}}} \quad (1)$$

Where A is the area of the chromatographic peak and C is the concentration.

The chemometric method used to explore the data was the response surface analysis. Multiple response analyses (MRA) were performed to determine the combination of experimental factors, which simultaneously optimize experimental responses.

Separation and analysis of the resulting extracts was performed in an Agilent 7890A/5975C GC/MS (Agilent Technologies S.A., Madrid, Spain) instrument. High purity helium (purity > 99.999%) was employed as carrier gas flowing at 0.5 mL min⁻¹. A 0.75 mm ID SPME Inlet Liner (Supelco, Bellefonte, PA, USA) was used, and all injections were performed in splitless mode. The inlet temperature was set at 300 °C and desorption was performed at a purge flow of 60 mL min⁻¹ during 0.25 min, and the septum purge flow was 3 mL min⁻¹. A polydimethylsiloxane (95%) cross linked ZB-5MS (Zebron, Phenomenex, Madrid, Spain) capillary column was used (30 m $\times$ 0.25 mm ID, 0.25 μm d_f). The oven temperature program was as follows: from 40 °C (3 min) to 180 °C (5 min) at 10 °C min⁻¹ and from 180 °C to 200 °C (1 min) at 30 °C min⁻¹. The mass spectrometer conditions were the following: quadrupole temperature 150 °C, transfer line temperature 280 °C and ion source temperature 230 °C. A 1.90 min acquisition delay was selected; electron ionization was performed at 70 eV and 1471 V voltage. SCAN mode with an acquisition range of 25–300 *m/z* was selected for the identification of the selenium and IS compounds based on the retention times as well as the fragmentations of standard solutions. For analytes quantification, SIM mode was chosen and the following fragments, referred to the mass to charge ratio (*m/z*), were employed: *m/z* 50 and 68 for d⁶-DMS, *m/z* 80, 95 and 110 for DMSe, *m/z* 80, 95, 110 and 138 for DESe and *m/z* 95, 160, 175 and 190 for DMDSe. Data were acquired using MSD ChemStation software and analyzed in a MSD ChemStation Data analysis Application (Agilent Technologies S.A., Madrid, Spain). Compound identification was carried out based on the 2011 NIST library and supported by corrected retention times and fragmentation standard.

2.3. Method validation

Validation of analytical procedure was based on assessing the method performance with standard solutions in terms of linear

range, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and precision. Validation was carried out under optimized experimental condition described in Section 2.2.

Linearity was determined at six concentration levels within the 1.2–300 ng range for DMSe and eight concentration levels within the 0.02–20 ng range for DMDSe. All standard solutions were prepared in Milli-Q water. Results were analyzed by least squares linear regression using RF values, and linearity was evaluated in terms of the squared correlation coefficients (*R*²) obtained. Calibration curves were used for semi-quantification of target analytes in the two plants species.

LODs were estimated at five concentration levels within the 0.06–1.0 ng range for DMSe and four concentration levels within the 0.5–2.0 ng range for DMDSe. All standard solutions were prepared in Milli-Q water. Results were analyzed by least squares linear regression using RF values, and LODs were determined by interpolating the *y*_{LOD} values obtained from Eq. (2) on the calibration curves while LOQs were obtained as 3.3LODs.

$$y_{\text{LOD}} = \bar{y}_b + 2t_{\alpha, \nu(1 \text{ tail})} S_{y/x} \quad (2)$$

where *y*_{LOD} is LOD signal, $\bar{y}_b$, is the intercept of calibration curve, *t* _{$\alpha, \nu(1 \text{ tail})$} , is Student's t-test value for one tail, a probability level of 0.05 (α) and (*n* - 2) degrees of freedom (ν) and *S*_{*y*/*x*} is the typical error of the calibration graph.

Precision was evaluated from standard solutions at different levels, depending on the analyte: 75 ng for DMSe and 5 ng for DMDSe while the IS concentration level was maintained at 10 ng. Intra-day precision was estimated by injecting three standard solution (*N* = 3) on the same day. Inter-day variation was performed in the same way, during three successive days (three injection per day, *N* = 9). Relative standard deviation (RSD, %) was chosen as a measure of repeatability and intermediate precision, and it was calculated for RF of each analyte.

2.4. Plant growth conditions in presence of Cs-SeNPs

Plants were hydroponically grown under controlled light and temperature conditions. Seeds were germinated in darkness at 25 °C on filter paper moistened with Milli-Q water in a polystyrene box during 3–5 days for *Raphanus sativus* and 7–10 days for *Brassica juncea*. After germination of the seeds, the seedlings (12 plants) were grown during 4–5 weeks in hydroponic culture in 7.5 L vessels containing perlite as substrate and 0.1 strength Hoagland's nutrient solution. Afterwards, selenium as Cs-SeNPs was supplied in the medium at a concentration level of 5 mg L⁻¹. Plants were maintained under a methacrylate box (31 cm height $\times$ 28 cm width $\times$ 42 cm length) with several holes for inserting the SPME fiber with the aim of performing headspace extraction at different sampling times. The experimental set-up is illustrated in Fig. 1. A control group of plants without Cs-SeNPs supplement was also grown in a parallel hydroponic culture.

2.5. Extraction and determination by HS-SPME-GC of volatile selenium compounds released by plant species

The procedure described in Section 2.2. and the optimal conditions established were applied but with slightly differences in the extraction stage. In this case, selenium volatile compounds from plants were extracted by using three fibers exposed during 26 min to the headspace of the methacrylate box and at different sampling times after Cs-SeNPs supplementation: 24, 48, 72, 144 and 167 h for *Raphanus sativus* and 24, 48, 72 and 120 h for *Brassica juncea*. The fiber was conditioned between runs for ~5 min in the injection port at 300 °C to prevent memory effect from previous extractions or



Fig. 1. Experimental set-up employed for extracting volatile selenium compounds released from plants exposed to Cs-SeNPs by HS-SMPE.

condensation of larger analytes inside the pores of the Carboxen phase [25,26].

2.6. Statistical analysis based on multifactor analysis of variance (multifactorial ANOVA)

This chemometric tool was applied to explore the volatile selenium compounds produced by both plant species. The software package Statgraphics Centurion XVIII, running under Windows 10 was used both for the multifactorial ANOVA and for the factorial experimental design.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of Cs-SeNPs by TEM

TEM micrographs in Fig. 2 evidence the presence of spherical and dispersed Cs-SeNPs with an average diameter size of 50 ± 5 nm. Cs-SeNPs were also characterized in the presence of Hoagland's nutrient solution and perlite + Hoagland's nutrient solution with the aim of assessing their stability in presence of the hydroponic medium composition. No significant differences between images acquired from SeNPs dispersed in the synthesis media (a.1) and those obtained in hydroponic medium (a.2 and a.3) were observed. EDXS analysis confirmed the presence of Se (L_{α} (1.4 keV), K_{α} (11.22 keV) and K_{β} (12.49 keV)) in the nanoparticles (a.4).

3.2. Optimization of the SPME extraction and desorption process

Based on preliminary studies, a 15 s desorption time was selected since at higher times peak resolution start getting worse. As it was previously mentioned an internal standard was employed with the purpose of quantifying and improving reproducibility between the peak area measurements of the compounds. Due to the absence of commercial deuterated compounds of DMSe, DESe and DMDSe, d^6 -DMS was chosen as IS because of its physical-chemical similarities to the analytes of interest and its absence in

the samples at the established detection limit. DMSe, DESe and DMDSe, d^6 -DMS standards solutions were prepared in aqueous solution as the composition of the culture medium used for growing plants (Hoagland solution) consists mainly in an aqueous solution.

In a first attempt, optimization was carried out directly inside the methacrylate box by incorporating the IS and selenium standards at different concentration levels with the aim of using an experiment that mimics as much as possible the further experiments with plants. However, after overnight extraction, no signal was detected when the fibers were injected at the CG/MS injection port. Consequently, in-fiber internal standardization based on the procedure described by Pawliszyn's group [10,11] was employed but with slightly modifications. For this purpose and with the aim of avoiding irreproducibility problems, selenium compounds released from the plants were first extracted and then the IS. An initial ramp temperature of 40°C was enough for ensuring IS retention. In addition, as retention time was as low as 2.27 min, the acquisition delay was set at 1.90 min.

A Carboxen/PDMS was selected as fiber coating based in previous work [27]. The fiber height was optimized to 4.5 cm as it provides the highest sensitivity for all analytes tested. Factorial experimental design for volatile selenium compounds were carried out as described above (see Section 2.2.). For evaluating the performance of the separation, the RF for selenium analytes and RT for IS were selected as experimental responses. Finally, as the plants were grown throughout the study at 25°C , this temperature was established as extraction temperature. Consequently extraction time and desorption temperature were the only variables optimized by using a factorial experimental design with a total of seven experiments.

Once the seven experiments were performed, the factorial design analysis allowed estimating both the individual influence of the factors and the interaction effects on each of the evaluated responses. For this purpose, the mathematical models adjusted the responses to a normalized equation, first-degree polynomial, of the type:

$$RT = \beta_0 + \beta_1 \times t_{\text{extraction}} + \beta_2 \times T_{\text{desorption}} + \beta_{12} \times t_{\text{extraction}} \times T_{\text{desorption}} \quad (3)$$

$$RF = \alpha_0 + \alpha_1 \times t_{\text{extraction}} + \alpha_2 \times T_{\text{desorption}} + \alpha_{12} \times t_{\text{extraction}} \times T_{\text{desorption}} \quad (4)$$

Table 1 shows the fit parameters described in Eqs. (3) and (4) for the IS retention time and the selenium compounds RF.

Fig. 3 illustrates the estimated response surfaces obtained for retention time of d^6 -DMS (a.1) and the response factors of DMSe, DESe and DMDSe (a.2, a.3 and a.4, respectively). The optimization criterion was selected with the aim of maximizing both RT of IS and RFs of selenium compounds. As it can be observed in Fig. 3, the highest retention time was obtained when the lowest extraction time and the lowest desorption temperature were used while the highest response factors were achieved with the highest values of both factors, extraction time and desorption temperature. Therefore, through the desirability function, a compromise optimal conditions, (26 min for extraction time and 300°C for desorption temperature) were selected. In addition, this function provided a high desirability percentage of 81.55%, which means a good fit of the statistical model. Under these conditions, the model predicted a RT value of 2.27 min and RF values of 0.147, 0.149 and 0.049 for DMSe, DESe and DMDSe, respectively. The expected values for these responses were experimentally assessed under selected conditions. These results were (2.30 ± 0.03) min for RT (d^6 -DMS),

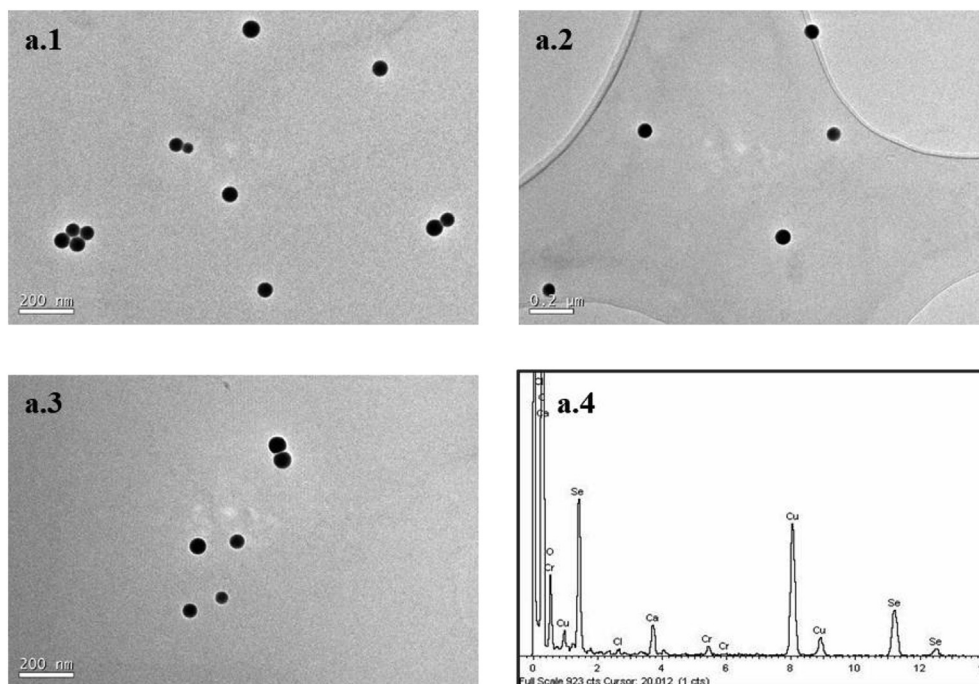


Fig. 2. Transmission electron microscopy (TEM) images of Cs-SeNPs dispersed in (a.1) synthesis, (a.2) 0.1 strength Hoagland's nutrient solution perlite and (a.3) perlite + 0.1 strength Hoagland's nutrient solution media. (a.4) X-ray energy dispersive spectroscopy (EDXS) spectrum of Cs-SeNPs showing the Se absorption peaks corresponding to SeL α , SeK α and SeK β at 1.4, 11.22 and 12.49 keV, respectively.

Table 1
Adjustment coefficients of the mathematical model for each response.

Responses	Coefficients			
	β_0	β_1	β_2	β_{12}
RT _{d6-DMS}	2.275	-0.015	0.0	0.0
	α_0	α_1	α_2	α_{12}
RF _{DMSe}	0.124	-0.007	0.017	0.017
RF _{DESe}	0.084	0.009	0.048	0.024
RF _{DMDSe}	0.026	0.006	0.016	0.009

β_0 and α_0 are the intercepts, β_1 and α_1 are the linear coefficients of $t_{\text{extraction}}$, β_2 and α_2 are the linear coefficients of $T_{\text{desorption}}$ and β_{12} and α_{12} are the interactions coefficients of $t_{\text{extraction}}$ and $T_{\text{desorption}}$.

(0.147 ± 0.005) for RF (DMSe), (0.11 ± 0.01) for RF (DESe) and (0.049 ± 0.002) for RF (DMDSe). All of them were inside desirability percentage and the statistical analysis showed that there were no significant differences between the experimental and predicted results at a confidence level of 95%.

3.3. Validation of the HS-SPME-GC/MS method

Quantification of the analytes released by plants and contained in a polystyrene box was performed by using standards of selenium volatile standards placed into 4-ml screw vials. The difference in volumes between the polystyrene box and 4 mL vials do not hamper the applicability of the method. According to Pawliszyn [6], the amount of substance extracted depends on the total amount of analyte in the sample, the distribution constant of the analyte between the fiber and the sample and the volumes of the fiber and the sample. However, when the volume of the sample is greater than the volume of the fiber coating the amount of analyte extracted does not depend on the volume. Consequently, this approach can be applied to performing the calibration in mass since both the box and the vial have a greater volume than the volume of the fiber coating.

The method was validated according to the procedure described in Section 2.3. Table 2 shows the quality parameters for quantification of the two volatile selenium compounds found, including linear range, LOD, LOQ, day-to-day precision and run-to-run precision. The linear range was determined by internal standard calibration and a good correlation was obtained with determination coefficients (R^2) greater than 0.990 for both compounds. Repeatability and intermediate precision were evaluated by calculating the relative standard deviation (RSD, %) of the RFs for an intermediate point of the calibration line: 75 ng for DMSe, 5 ng for DMDSe and a fix amount of IS of 10 ng. Intra-day precision was estimated from three successive injections on the same day ($n = 3$), and inter-day precision from three consecutive days (three injections per day, $n = 9$). The results in Table 2 evidence that the performance and repeatability of the method was satisfactory. It should be noted that results include the variability between fibers since to determine each of these parameters two holders were used with one CAR/PDMS fiber each.

3.4. SPME analysis of selenium volatile compounds from plants exposed to Cs-SeNPs

The method was applied to quantify the volatile selenium species produced *in-vivo* by two plant species (*R. sativus* and *B. juncea*) when grown in presence of Cs-SeNPs. *R. sativus* was selected for this study because it is an easily cultivable plant that accumulates metals/metalloids in roots, the edible part. On other hand, *B. juncea* is considered as a secondary selenium accumulator plant used for bioremediation of highly contaminated sites being also able of accumulating large amounts of Se without showing symptoms of toxicity [28–32]. Before exposing each of the plant species to 5 mg Se L⁻¹ in the form of Cs-SeNPs, two blank analysis were run by exposing the fiber for 26 min or 24 h to the headspace of the methacrylate box containing only to 0.1 strength Hoagland's nutrient solution. In all cases, neither signals of selenium

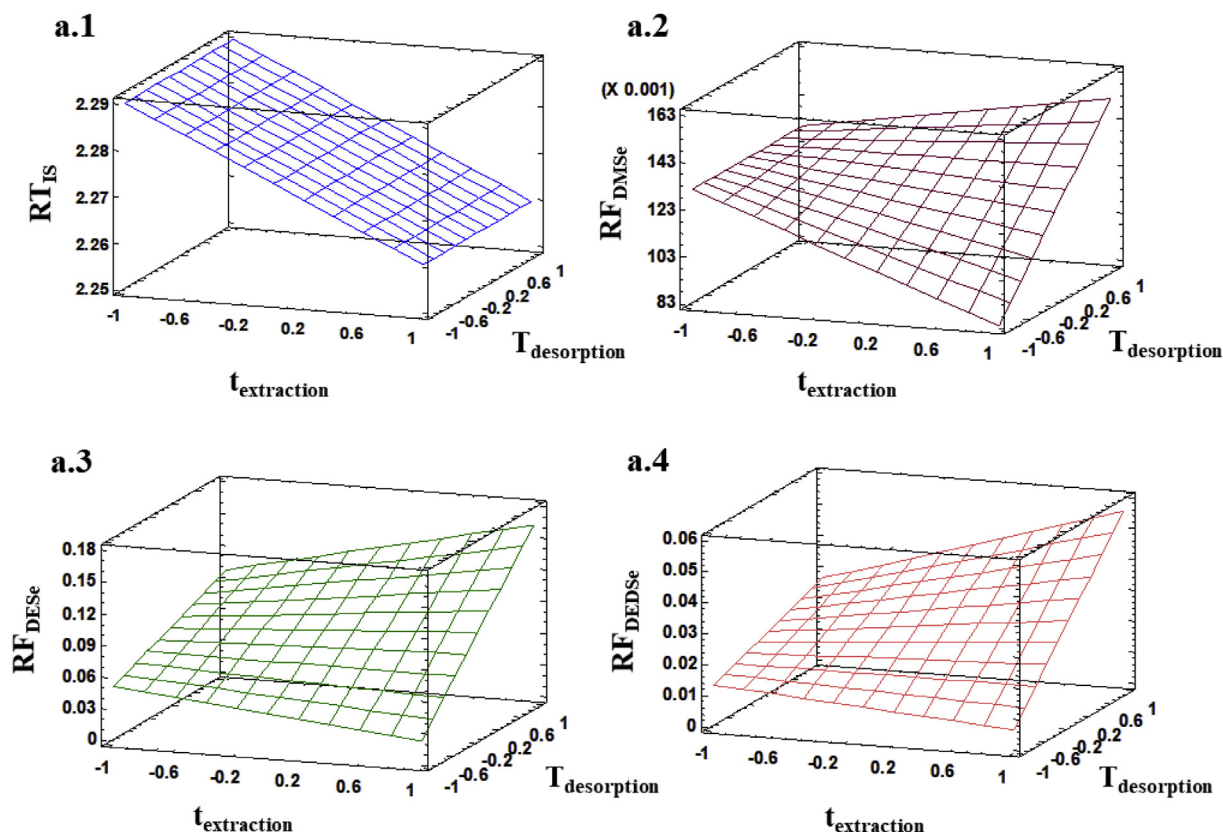


Fig. 3. Estimated normalized response surfaces obtained for each optimized responses in volatile selenium compounds separation: (a.1) d^6 -DMS RT; (a.2) DMSe RF; (a.3) DESe RF and (a.4) DMDSe RF.

Table 2

Quality parameters obtained for DMSe and DMDSe. Concentrations of DMSe and DMDSe found in *R. sativus* and *B. juncea* during their exposition to Cs-SeNPs.

Parameters			DMSe	DMDSe	
Linearity range (ng)			1.2–300	0.1–20	
Correlation coefficient (n = 6 (DMSe); n = 8 (DMDSe))			0.999	0.990	
LOD range (ng)			0.06–1.0	0.2–0.05	
LOD (ng)			0.03	0.01	
LOQ (ng)			0.11	0.03	
<u>Precision (RSD, %)</u>					
Intraday (n = 3)			8	11	
Interday (n = 9)			7	12	
<u>R. sativus</u>					
Sampling time (hours)	24	48	72	120	
DMSe concentration (ng)	16 ± 3	52 ± 8	176 ± 10	163 ± 39	
DMDSe concentration (ng)	< LOD	0.49 ± 0.03	1.6 ± 0.8	0.6 ± 0.1	
<u>B. juncea</u>					
Sampling time (hours)	24	48	72	144	167
DMSe concentration (ng)	3.6 ± 0.7	25 ± 8	83 ± 26	106 ± 18	116 ± 13
DMDSe concentration (ng)	< LOD	1.0 ± 0.4	1.6 ± 0.6	1.0 ± 0.4	2.2 ± 0.9

LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; RSD, relative standard deviation. The precision was calculate for concentrations of 75 and 5 ng for DMSe and DMDSe, respectively.

compounds nor the deuterated sulfur standard were obtained. In addition, no volatile species produced by both plant species in absence of selenium that they may interfere with selenium volatile compounds and the IS were detected.

First experiments were conducted by exposing the SPME fiber overnight to the headspace of the methacrylate box containing *R. sativus* in presence of Cs-SeNPs and subsequently extraction of

the IS for 26 min, as stated in the *experimental* section 2.2. During exposure, DMSe and DMDSe species were identified based on retention times and m/z ratios, while the presence of DESe species was not detected. When the volatile species found were quantified with the internal standard, increasing quantities of both compounds were obtained until they reached a plateau at 240 h after Cs-SeNPs exposure. However, a great variability in the results was obtained that it was attributed to an oversaturation of the SPME fibers when exposed overnight to the headspace of the box. This oversaturation affected the subsequent extraction of the IS making the quantification process more irreproducible.

In order to improve the quantification process, the optimized conditions obtained from the experimental design were applied: 26 min for extracting the released volatile selenium compounds followed by another 26 min for extracting the IS. The previous identified DMSe and DMDSe were again detected and quantified (from the RF and the corresponding calibration curve) at different sampling times between 24 and 120 h after Cs-SeNPs exposure. The values obtained for each compound at different sampling times are included in Table 2. This table shows that DMDSe level at 24 h is below the LOD. This fact could be attributed to the low quantities of DMDSe that together with the large volume of the box makes the method able of detecting but not quantifying it. In contrast, DMSe quantification was possible. Increasing levels of DMSe were obtained from 24 to 120 h after exposure. From the results obtained, it can be concluded that *R. sativus* exposed to Cs-SeNPs is able to produce volatile selenium compounds, mainly in the form of DMSe. Although there are no data in the literature on the production of volatile selenium compounds by this radish species exposed to selenium, M. Palomo-Siguero et al. [23] evaluated the accumulation and biotransformation capacity of *R. sativus* when exposed to 1 mg

Se L⁻¹ in the form of Cs-SeNPs. They demonstrated that between 95 and 98% of the selenium was accumulated in the roots and bio-transformed mostly in MetSeCys, a non-proteinogenic selenoamino acid linked to selenium detoxification processes in plants. Therefore, this information is in agreement with the low amounts of DMSe and DMDSe produced by *R. sativus* exposed to SeNPs.

The identification of volatile selenium compounds produced by the species *B. juncea* after exposure to 5 mg Se L⁻¹ (as CsSeNPs) was carried out following the methodology previously described in the

experimental section 2.2. After performing sampling between 24 and 167 h after Cs-SeNPs exposure, only DMSe and DMDSe were detected and subsequent quantified. The DMDSe was again produced in quantities below the LOD at 24 h and the reason would be likely the same as previously described for *R. sativus*. On the other hand, increasing quantities of DMSe was obtained from 24 to 167 h but without reaching a stationary state.

The variability of the results can be considered acceptable since from sampling three holders with a CAR/PDMS fiber each were

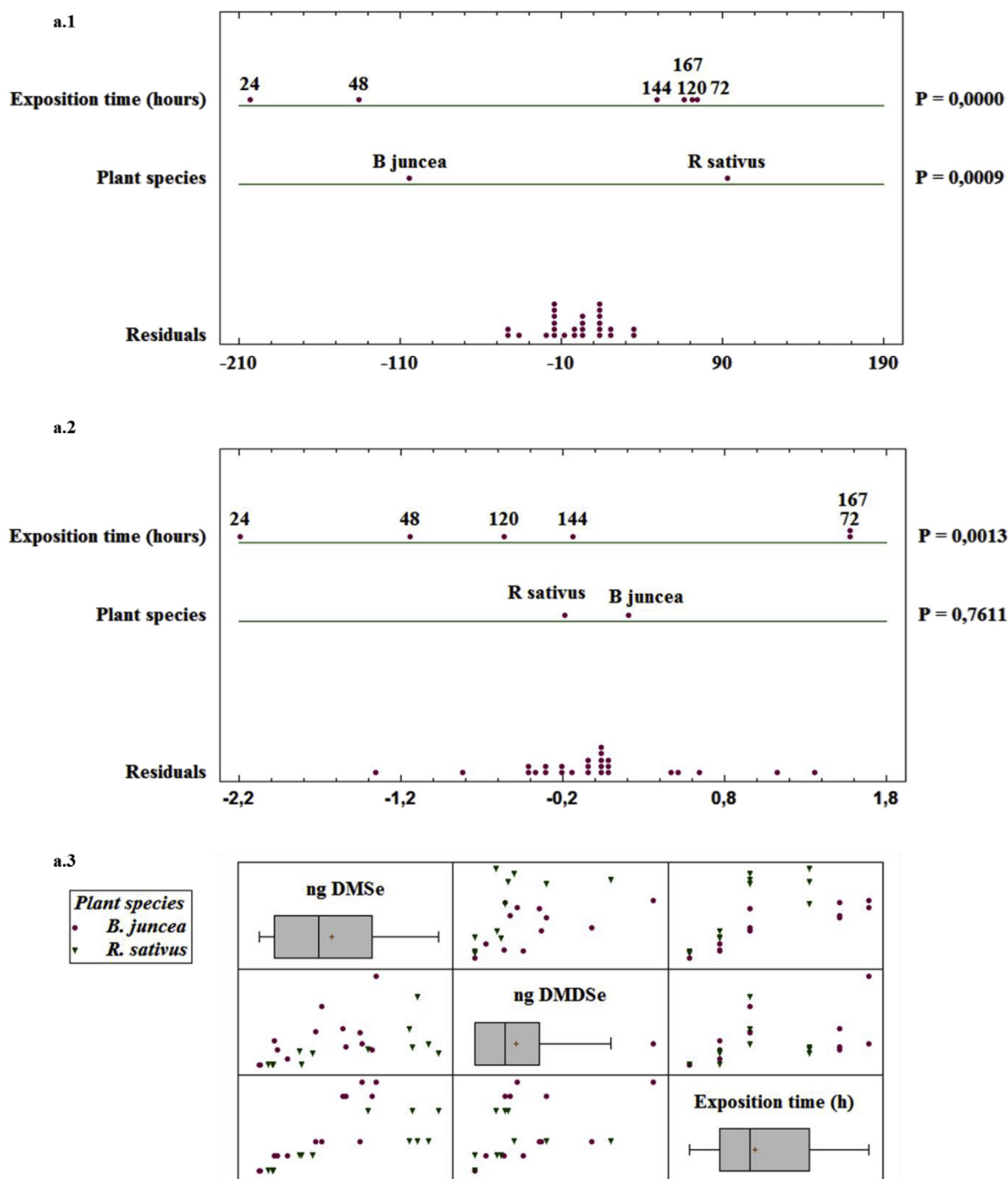


Fig. 4. Multifactorial ANOVA test. Influence of factors (exposition time and plant species) in DMSe (a.1) and DMDSe (a.2) production with their corresponding p-values. Multivariate analysis that correlates the amounts of DMSe, DMDSe and time of exposure to each other taking into account plant species (a.3).

used, which sampled in different regions of the headspace of the box. In addition, during the time of exposure of *R. sativus* and *B. juncea* to SeNPs, their respective control groups were cultivated in parallel.

Although to date no studies of exposure of *B. juncea* to SeNPs have been reported, there are studies in which this plant species has been supplemented with different sources of both organic and inorganic selenium to study the production of selenium volatile compounds. J. Meija et al. [25] employed HS-SPME-GC/MS and HS-SPME-GC/ICPMS to monitor the volatile selenium compounds produced by the wild-type plant *B. juncea* in presence of 15 mg Se L⁻¹ in the form of selenite, selenate, Se-methionine and KSeCN. Regardless of the source of selenium, DMSe and DMDSe were detected but not DESe which is in agreement with the results reported in the current work. Quantification was achieved by external standard and DMSe was the main volatile selenium specie when *B. juncea* was exposed to selenite while DMDSe when Se-methionine was added as source of selenium. C. Dietz et al. [20] also evaluated the volatile selenium compounds produced by *B. juncea* using the HS-SPME-MC-MIP-AES technique when supplemented with 1 and 5 mg Se L⁻¹ in the form of selenite and selenate. Although bioavailability was higher in selenite, in both cases the volatile compounds found were DMSe, DMDSe and DESe.

In order to evaluate the existence of differences in the formation of DMSe and DMDSe a multifactorial ANOVA was performed. During the first hours of exposure to Cs-SeNPs, quantification of the volatile selenium species could not be carried out as the signal was below the LOD. Even during the first 24 h, the concentration levels obtained for the DMSe were very low. For this purpose, plant species (*R. sativus* and *B. juncea*) and exposition time (24, 48, 72, 120, 144 and 167 h) were selected as factors while the quantities produced of each of the volatile selenium compounds were selected as responses. The multifactorial ANOVA test showed significant differences in the production of DMSe (p-value less than 0.05) for the two factors studied with residuals showing Gaussian behaviour (Fig. 4, a1). In the case of the exposition time (p-value 0.0009), three different groups are observed: the first one would correspond to 24 h, the second one to 48 h and the third one the remaining times. This behaviour reflects the increasing amount of DMSe produced over time until it reaches a steady state. Concerning to plant species (p-value 0.0000), significant differences are also observed since the species *R. sativus* produces a larger quantity of this compound. The reason can be explained to the fact that *R. sativus* unlike *B. juncea* is not an accumulator of selenium and therefore, for a same level of Se concentration produces greater amounts of this compound for its detoxification. Concerning to DMDSe although all its values were below at 24 h, the multifactorial ANOVA test showed only significant differences for the time of exposure whose distribution was similar to that obtained for the DMSe. In addition, through a multivariate analysis (Fig. 4, a2) in which the quantities produced of both compounds and the exposition time were related simultaneously for both plant species, it was concluded that while there was no correlation between the two compounds, there was a linear correlation between the amount of DMSe y DMDSe and the exposure time.

4. Conclusions

The need of monitoring in real time the production of volatile selenium compounds released by plant species *R. sativus* and *B. juncea* when were exposed to 5 mg Se L⁻¹ in form of Cs-SeNPs has led us to the development of a calibration method using SPME. In this sense, a new and simple method based on in-fiber internal standardization has been developed which enables for first time the *in-vivo* quantification of DMSe and DMDSe species produced as

a result of the Cs-SeNPs biotransformation by plant species. Therefore, the results obtained reflect the promising future that this developed method presents not only for the quantification of volatile selenium species but also for the quantification of VOCs and other volatile compounds produced by the metabolisms of different living organisms such as fungi, bacteria, algae, etc. The data also evidence transformation of nanoparticles in living systems which of special relevance for correctly establishing their impact on human health and ecosystems.

Author contributions

All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

Financial interest

The authors declare no competing financial interest.

Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors thank the Spanish Commission of Science and Technology (CTQ2017-83569-C2-1-R) and the Comunidad of Madrid and European funding from FSE and FEDER programs for financial support (project S2018/BAA-4393, AVANSECAL-II-CM).

References

- [1] É.A. Souza-Silva, R. Jiang, A. Rodríguez-Lafuente, E. Gionfriddo, J. Pawliszyn, A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices I. Environmental analysis, TrAC Trends Anal. Chem. 71 (2015) 224–235. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.016>.
- [2] S. Azzi-Achkouty, N. Estephan, N. Ouaini, D.N. Rutledge, Headspace solid-phase microextraction for wine volatile analysis, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 57 (2017) 2009–2020. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.957379>.
- [3] S. Balasubramanian, S. Panigrahi, Solid-phase microextraction (SPME) techniques for quality characterization of food products: a review, Food Bioprocess Technol. 4 (2011) 1–26. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0299-3>.
- [4] G. Ouyang, D. Vuckovic, J. Pawliszyn, Nondestructive sampling of living systems using *in vivo* solid-phase microextraction, Chem. Rev. 111 (2011) 2784–2814. <https://doi.org/10.1021/cr100203t>.
- [5] G. Ouyang, J. Pawliszyn, A critical review in calibration methods for solid-phase microextraction, Anal. Chim. Acta 627 (2008) 184–197. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.08.015>.
- [6] J. Pawliszyn, Handbook of Solid Phase Microextraction, first ed., Elsevier Inc., Waltham, 2012 (n.d.).
- [7] A.C. Soria, M.J. García-Sarrió, M.L. Sanz, Volatile sampling by headspace techniques, TrAC Trends Anal. Chem. 71 (2015) 85–99. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.015>.
- [8] É.A. Souza-Silva, E. Gionfriddo, J. Pawliszyn, A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices II. Food analysis, TrAC Trends Anal. Chem. 71 (2015) 236–248. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.018>.
- [9] É.A. Souza-Silva, N. Reyes-Garcés, G.A. Gómez-Ríos, E. Boyaci, B. Bojko, J. Pawliszyn, A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices III. Bioanalytical and clinical applications, TrAC Trends Anal. Chem. 71 (2015) 249–264. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.017>.
- [10] Y. Wang, J. O'Reilly, Y. Chen, J. Pawliszyn, Equilibrium in-fibre standardisation technique for solid-phase microextraction, J. Chromatogr., A 1072 (2005) 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.12.084>.
- [11] W. Zhao, G. Ouyang, J. Pawliszyn, Preparation and application of in-fibre internal standardization solid-phase microextraction, Analyst (Cambridge, U.K.)

- 132 (2007) 256–261, <https://doi.org/10.1039/b612604a>.
- [12] G.B. Akanni, H.L. De Kock, Y. Naudé, E.M. Buys, Volatile compounds produced by *Bacillus* species alkaline fermentation of Bambara groundnut (*Vigna subterranean* (L.) Verdc) into a dawadawa-type African food condiment using headspace solid-phase microextraction and GC × GC–TOFMS, *Int. J. Food Prop.* 21 (2018) 929–941, <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1460757>.
- [13] C. Wagner, A. Bonte, L. Brühl, K. Niehaus, H. Bednarz, B. Matthäus, Micro-organisms growing on rapeseed during storage affect the profile of volatile compounds of virgin rapeseed oil, *J. Sci. Food Agric.* 98 (2018) 2147–2155, <https://doi.org/10.1002/jsfa.8699>.
- [14] O.A. Odeyemi, C.M. Burke, C.J.S. Bolch, R. Stanley, Evaluation of spoilage potential and volatile metabolites production by *Shewanella baltica* isolated from modified atmosphere packaged live mussels, *Food Res. Int.* 103 (2018) 415–425, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.068>.
- [15] T. Sawoszczuk, J. Sygula-Cholewińska, J.M. del Hoyo-Meléndez, Application of HS-SPME–GC–MS method for the detection of active moulds on historical parchment, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 2297–2307, <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0173-x>.
- [16] E.I. Savelieva, O.P. Gavrilova, T.Y. Gagkaeva, Using solid-phase microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry for the study of the volatile products of biosynthesis released by plants and microorganisms, *J. Anal. Chem.* 69 (2014) 609–615, <https://doi.org/10.1134/S1061934814050086>.
- [17] I. Jerković, Z. Marijanović, M. Roje, P.M. Kus, S. Jokić, R. Čož-Rakovac, Phytochemical study of the headspace volatile organic compounds of fresh algae and seagrass from the Adriatic Sea (single point collection), *PLoS One* 13 (2018) 1–13, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196462>.
- [18] J. Lv, J. Wu, J. Zuo, L. Fan, J. Shi, L. Gao, M. Li, Q. Wang, Effect of Se treatment on the volatile compounds in broccoli, *Food Chem.* 216 (2017) 225–233, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.005>.
- [19] B. Hosnedlova, M. Kepinska, S. Skalickova, C. Fernandez, B. Ruttkay-Nedecky, Q. Peng, M. Baron, M. Melcova, R. Opatrilova, J. Zidkova, G. Bjørklund, J. Sochor, R. Kizek, Nano-selenium and its nanomedicine applications: a critical review, *Int. J. Nanomedicine.* 13 (2018) 2107–2128, <https://doi.org/10.2147/IJN.S157541>.
- [20] C. Dietz, J. Sanz Landaluze, P. Ximénez-Embún, Y. Madrid-Albarrán, C. Cámara, Volatile organo-selenium speciation in biological matter by solid phase microextraction–moderate temperature multicapillary gas chromatography with microwave induced plasma atomic emission spectrometry detection, *Anal. Chim. Acta* 501 (2004) 157–167, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.09.027>.
- [21] N. Campillo, R. Peñalver, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, Headspace solid-phase microextraction for the determination of volatile organic sulphur and selenium compounds in beers, wines and spirits using gas chromatography and atomic emission detection, *J. Chromatogr., A* 1216 (2009) 6735–6740, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.08.019>.
- [22] J.L. Gómez-Ariza, J.A. Pozas, I. Giraldez, E. Morales, Speciation of volatile forms of selenium and inorganic selenium in sediments by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr., A* 823 (1998) 259–277, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00581-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00581-0).
- [23] M. Palomo-Siguero, M.I. López-Heras, C. Cámara, Y. Madrid, Accumulation and biotransformation of chitosan-modified selenium nanoparticles in exposed radish (*Raphanus sativus*), *J. Anal. At. Spectrom.* (2015) 1237–1244, <https://doi.org/10.1039/C4JA00407H>.
- [24] Y. Bai, Y. Wang, Y. Zhou, W. Li, W. Zheng, Modification and modulation of saccharides on elemental selenium nanoparticles in liquid phase, *Mater. Lett.* 62 (2008) 2311–2314, <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2007.11.098>.
- [25] J. Meija, M. Montes-Bayón, D.L. Le Duc, N. Terry, J.A. Caruso, Simultaneous monitoring of volatile selenium and sulfur species from se accumulating plants (wild type and genetically modified) by GC/MS and GC/ICPMS using solid-phase microextraction for sample introduction, *Anal. Chem.* 74 (2002) 5837–5844, <https://doi.org/10.1021/ac020285t>.
- [26] G.A. Mills, V. Walker, Headspace solid-phase microextraction profiling of volatile compounds in urine: application to metabolic investigations, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 753 (2001) 259–268, [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00554-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00554-5).
- [27] C. Dietz, T. Pérez-Corona, Y. Madrid-Albarrán, C. Cámara, SPME for on-line volatile organo-selenium speciation, *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 467–473, <https://doi.org/10.1039/b211460g>.
- [28] E.A.H. Pilon-Smits, L.H.E. Winkel, Z.-Q. Lin, Selenium in plants: molecular, physiological, Ecological and Evolutionary Aspects (2017), <https://doi.org/10.1007/978-3-319-56249-0>.
- [29] M. Schiavon, E.A.H. Pilon-smits, Tansley review the fascinating facets of plant selenium accumulation – biochemistry, physiology, *New Phytol.* 213 (2017) 1582–1596, <https://doi.org/10.1111/nph.14378>.
- [30] M. Biology, Selenium in higher plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51 (2000) 401–432.
- [31] M. Montes-Bayón, E.G. Yanes, C.P. De Leo, K. Jayasimhulu, A. Stalcup, J. Shann, J.A. Caruso, Initial studies of selenium speciation in *Brassica juncea* by LC with ICPMS and ES-MS Detection, an Approach for Phytoremediation Studies 74 (2002) 107–113.
- [32] C.N. Prins, L.J. Hantzis, C.F. Quinn, E.A.H. Pilon-Smits, Effects of selenium accumulation on reproductive functions in *Brassica juncea* and *Stanleya pinnata*, *J. Exp. Bot.* 62 (2011) 5633–5640, <https://doi.org/10.1093/jxb/err247>.

2.2. Conocimiento de la acumulación y transformación de Ch-SeNPs por *Raphanus sativus* y *Brassica juncea*: Efecto sobre la incorporación de elementos esenciales

*Insights into the accumulation and transformation of Ch-SeNPs by *Raphanus sativus* and *Brassica juncea*: Effect on essential elements uptake*

Gustavo Moreno-Martín, Jon Sanz-Landaluze, María Eugenia León-González,
Yolanda Madrid

Science of the Total Environment 725 (2020) 138453

Parte de los resultados de esta investigación se presentaron en:

IX INTERNATIONAL CONGRESS ON ANALYTICAL NANOSCIENCE AND NANOTECHNOLOGY. *The impacts of Cs-SeNPs on *Raphanus sativus* and *Brassica juncea*. Biotransformation and effects on metabolism.* Zaragoza, España, julio de 2019. Tipo de comunicación: oral.



Insights into the accumulation and transformation of Ch-SeNPs by *Raphanus sativus* and *Brassica juncea*: Effect on essential elements uptake

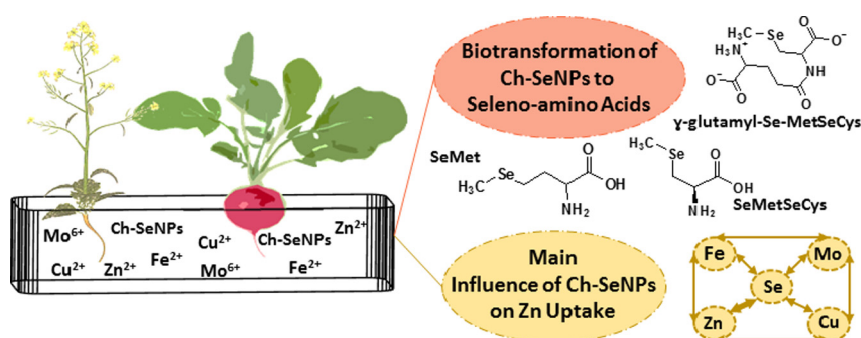
Gustavo Moreno-Martín, Jon Sanz-Landaluze, María Eugenia León-González*, Yolanda Madrid*

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

HIGHLIGHTS

- *R. sativus* and *B. juncea* are able to accumulate and biotransform SeNPs.
- SeNPs were transformed to organic Se-species more bioavailable for plants.
- The uptake of Fe, Cu and Zn was greatly affected after SeNPs supplementation.
- PCA and speciation techniques are useful tools in assessing the impact of SeNPs.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 January 2020

Received in revised form 2 April 2020

Accepted 2 April 2020

Available online 4 April 2020

Editor: Damia Barcelo

Keywords:

Selenium nanoparticles

Selenium speciation

Biotransformation

Principal component analysis

Essential metals uptake

Seleno-amino acids

ABSTRACT

Selenium (Se) at very low doses has important functions for humans. Unfortunately, the low levels of Se in soils in various regions of the world have implemented the agronomic biofortification of crops by applying Se-enriched fertilizers (mainly based on selenate). Lately, the use of nanofertilizers is growing in interest as their low size reduces the amount of chemicals and minimizes nutrient losses in comparison with conventional bulk fertilizers. However, the knowledge on their fate and environmental impact is still scarce. This study aims to evaluate the biotransformation of chitosan-modified Se nanoparticles (Ch-SeNPs) as well as their effect on the metabolism of essential metals (Fe, Cu, Zn and Mo) when applied to hydroponic cultivation of *R. sativus* and *B. juncea*. In house-synthesized Ch-SeNPs were characterized in both synthesis and hydroponic culture media by transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering (DLS) and nanoparticle tracking analysis (NTA). The composition of one-tenth strength Hoagland's solution did not affect the size, shape and concentration in number of particles per mL of Ch-SeNPs. The plants were grown inside a box at 25 °C during the months of May–July in 2018. After a week of treatment with Ch-SeNPs, plants were harvested and divided into roots and aerial part. The biotransformation of Ch-SeNPs was evaluated through a process of enzymatic hydrolysis and subsequent analysis by HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS/MS. The results confirmed the transformation of Ch-SeNPs to seleno-amino acids: Selenomethionine (SeMet), Semethylselenocysteine (SeMetSeCys) and γ-glutamyl-Se-MetSeCys. Moreover, Multiple-way analysis of variance (ANOVA) and principal component analysis (PCA) showed that, regardless the plant species, Ch-SeNPs supplementation affected the absorption of Zn.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding authors at: Dept. of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, Spain.

E-mail addresses: leongon@ucm.es (M.E. León-González), ymadrid@quim.ucm.es (Y. Madrid).

1. Introduction

Se is an essential micronutrient for human beings and animals (Natasha et al., 2018). It is involved in important physiological functions such as stimulation of the immune system, an increment of antibody production and redox homeostasis and a modulation of thyroid hormone metabolism (Guan et al., 2018). Additionally to these health-promoting benefits, it has been suggested that an optimum level of Se supplementation decreases the incidence of several types of cancer (prostate or lung) and the appearance of cardiovascular and gastrointestinal diseases and chronic diseases such as type 2 diabetes (Eiche et al., 2015; Peñas et al., 2011). Unfortunately, there are several areas in the world such as in southern and eastern European countries where Se intake is below the recommended dietary allowance (RDA) ($55 \mu\text{g} \cdot \text{day}^{-1}$) (Alzate et al., 2010).

So far agronomic biofortification of food crops with Se-enriched fertilizers (through soil or foliar application) is the most recommended strategy to increase the Se status of the populations (Boldrin et al., 2013; Wang et al., 2018). Se absorption by plants depends on multiple factors such as soil characteristics, plant species, Se availability in soils, Se chemical form and concentration, and the presence of competing ions (Renkema et al., 2012; Terry et al., 2000; Zhao et al., 2005). Traditionally, sodium selenate and sodium selenite are the most commonly used Se species for crops biofortification. It has been reported that selenite is accumulated by phosphate transporters whereas selenate through sulfate transporters and channels (Gupta and Gupta, 2017). Selenate is considered the most available Se species for plants due to its low affinity to soil particles (Eiche et al., 2015). Several studies have shown that organic species, SeMet and SeCys, are less toxic (Berntssen et al., 2017; Edens and Sefton, 2016; Hamilton, 2004) and they can also be absorbed and transported by plants more efficiently than inorganic species (Kikkert and Berkelaar, 2013). Regardless of the chemical form, once Se has been incorporated by the plant, it can be transformed into volatile organic species, such as dimethylselenium (DMSe) and dimethyldiselenium (DMDSe), and non-volatile species, such as Selenomethionine (SeMet), Se-methylselenocysteine (SeMetSeCys) and γ -glutamyl-Se-MetSeCys (Ogra et al., 2017; Ruszczyńska et al., 2017).

Over the last decade, a significant amount of research has been carried out on the use of nanotechnology for crop-based applications, especially as fertilizers. Nanofertilizers improve plant nutrient uptake as their low size (<100 nm) lead to an effective slow and sustained release of nutrients in soil, avoiding the problems of losses because of volatilization and leaching (Wang et al., 2018; Zhang et al., 2018; Monreal et al., 2016) occurring in conventional bulk fertilizer. However, the efficacy of these nanofertilizers will depend on plant species and physicochemical properties of nanoparticles (NPs) such as composition, size, shape and concentration. Despite this, nanofertilizers cause an increase of plant productivity, an improvement of drought and diseases resistance in crops plants and a decrease in the amount of fertilizer applied. In addition, due to their high area to volume ratio, they can be easily absorbed by plants without the need to perform a previous activation step since they can promote oxidation and recombination reactions to provide the required nutrients (Elemike et al., 2019). Recently, an eco-friendly nanofertilizer called "Nano-Leucite Fertilizer" has been developed and patented which offers an overall increase in crop and food production along with a reduction in the loss of nutrients. Research based on the use of TiO_2 NPs, CuONPs, ZnONPs, FeONPs or CeO_2 NPs as nanofertilizers, have shown that their application in crops offers more benefits than their corresponding bulks fertilizers (Elemike et al., 2019; Monreal et al., 2016).

The current work evaluates the transformation of Ch-SeNPs by two plants species: *Raphanus sativus* and *Brassica juncea*, hydroponically grown in a culture medium containing Ch-SeNPs. Radish, *R. sativus*, is a common choice for cultivation since it is an annual fast growing plant and easy to cultivate in hydroponic cultures and gardens. Moreover, radishes are highly consumed vegetables whose edible part is

the root. For its part, *B. juncea* is a plant species whose genome is fully sequenced (Yang et al., 2016) and it is able to incorporate high amounts of Se and to produce seleno-amino acids, potentially bioactive for nutrition purposes (Wiesner-Reinhold et al., 2017). For performing these studies, mass spectrometry techniques were applied to evaluate the Se species produced after Ch-SeNPs exposition. Among them, ICP-MS was used for total Se determination and mass balance calculations, HPLC-ICP-MS for Se speciation and HPLC-ESI-MS/MS for Se species confirmation. The effect of Ch-SeNPs on the content of essential metals was evaluated by Principal Component Analysis (PCA) and Multiple-way analysis of variance.

2. Material and methods

2.1. Synthesis and characterization of chitosan-modified Se nanoparticles (Ch-SeNPs)

NPs were prepared according to the procedure described by Bai et al. (2008). Firstly, ascorbic acid (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) was added slowly into an aqueous solution of chitosan (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and the mixture was kept under magnetic stirring at 250 rpm for 30 min at room temperature. Afterwards, sodium selenite (Merck, Madrid, Spain) was added dropwise to the ascorbic acid-chitosan mixture. The dispersion was then diluted to 250 mL to get a final composition of $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of Se as Ch-SeNPs, 0.054 M ascorbic acid and 0.1% (w/v) chitosan. Synthesized Ch-SeNPs were stored at 4°C up to two months in synthesis medium. Ch-SeNPs were purified through a dialysis process.

The amount of the dissolved Se in the NPs dispersion either in synthesis or Hoagland solution media was determined via centrifugal ultrafiltration followed by ICP-MS measurements. For this purpose, 3 mL of Ch-SeNPs dispersion was centrifuged during 30 min at room temperature at 6600 rpm with a 3 kDa molecular weight cut-off filter. The resulting filtrate was collected and analyzed by ICP-MS.

A JEOL JEM 2100 (USA) operated at 200 kV and equipped with an X-ray energy dispersive spectroscopy (EDX) microanalysis composition system (Oxford Inca, High Wycombe, UK) was used to characterize the Ch-SeNPs in terms of size, morphology and composition. A Malver Zetasizer Nano ZS (Malver Instrument LTD, Malvern UK) system equipped with a laser of 633 nm was utilized to determine the hydrodynamic diameter and size distribution of NPs. The scattering angle was 173° , the measuring position was 4.65 mm inside disposable plastic cuvettes and the mean of ten measurements was taken. A ZetaView Basic NTA-Nanoparticle Tracking Video Microscope PMX-220 (Particle Metrix GmbH, Germany) equipped with a CMOS camera (640×480 pixels) and software ZetaView 8.04.02 SP2, was used to measure zeta potential, hydrodynamic diameter and number-based concentration of Ch-SeNPs. In addition, Ch-SeNPs characterization was performed in presence of one-tenth strength Hoagland's nutrient solution and perlite in order to evaluate the effect of hydroponic medium composition on physicochemical properties of NPs after 1 week, in accordance with duration of treatment.

2.2. Plant growth

Seeds of *R. sativus* and *B. juncea* were germinated on filter paper moistened with Milli-Q water inside a polystyrene box during 3–5 days for *R. sativus* and 7–10 days for *B. juncea* at 25°C in darkness. After germination, 12 seedlings of each plant species were grown in parallel but independently in hydroponic culture using perlite as substrate in 7.5 L polypropylene vessels containing one-tenth strength Hoagland's nutrient solution (Palomo-Siguero et al., 2015; Pedrero et al., 2006; Ximénez-Embún et al., 2004) and perlite as substrate. The vessels were maintained under a metacrylate box (31 cm height $\times$ 28 cm width $\times$ 42 cm length) at a temperature of 25°C , and they were located at the same place with the aim of receiving similar solar radiation. Past 4 weeks for *R. sativus* and 5 weeks for *B. juncea*, Ch-SeNPs were supplied

in the medium at a concentration level of $5 \text{ mg Se} \cdot \text{L}^{-1}$ during one week of treatment. A group of each type of plants unexposed to selenium was grown in parallel as control. With the aim of comparing results between plant species, temperature was measured daily to keep this parameter under the same values (25°C) in all the vessels involved in the study. Plants growth took place in 2018 during the months of May and July under a 12/12 light cycle with a minimum solar radiation of $51 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ and maximum of $1023 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$. Hydroponic cultivation was selected as it enables a better control and standardization of the cultivation process. After 1 week of treatment (Brunetti et al., 2019; Iskandar et al., 2019), the plants were harvested, carefully washed with Milli-Q water and weighed in order to evaluate the short-term effect of Ch-SeNPs supplementation. Plants were then divided into root and aerial part, lyophilized and finely ground in liquid nitrogen with a pestle in an agate mortar. Samples were kept at room temperature in high-density polyethylene (HDPE) zip bag until the time of the analysis.

2.3. Determination of the total Se content by ICP-MS

Total Se determination in plants tissues and perlite was performed by using ICP-MS after acid digestion in a microwave oven (MSP 1000, CEM, Matheus, NC). About 0.1 g of freeze-dried plant tissues and perlite were weighted in an Xpress tube (volume 10 mL) and 2.5 mL of concentrated nitric acid (Merck, Madrid, Spain) and 1.0 mL of 30% (v/v) hydrogen peroxide (Panreac, Barcelona, Spain) were added. The mixture was held for 30 min at room temperature and then heated at maximum power 800 W, first at 130°C for 5 min, after a temperature ramp of $15^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, and finally at 160°C for 15 min increasing the temperature to $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$. After digestion, the mixture was diluted with Milli-Q water to 25 mL, filtered through a $0.22 \mu\text{m}$ syringe Nylon filter (Scharlab, Barcelona, Spain) and analyzed.

Se content in the digests was measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, Agilent 7700x, Agilent Technologies Inc., USA) by monitoring ^{76}Se , ^{77}Se , ^{78}Se and ^{80}Se isotopes under continuous acquisition mode. The experimental conditions were as follows: RF power of 1550 W, sample depth of 8 mm, plasma gas flow rate $15.0 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, auxiliary gas flow rate $0.90 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ and conical nebulizer with a flow rate $1.01 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$. Se quantification was performed by external calibration with the isotope ^{78}Se .

2.4. Extraction Se-species

To evaluate the capability of plant species to transform Ch-SeNPs into seleno-amino acids, HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS/MS analysis after extraction of Se species with enzymatic hydrolysis was performed. For this purpose, 0.1 g of freeze-dried plant tissues were treated with 20 mg of non-specific protease *Streptomyces griseus* (Protease XIV) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and 5 mL of $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) at pH 7.5 (adjusted with 0.05 M HCl) in a polypropylene tube for 24 h at 37°C and without shaking. The reaction mixture was then centrifuged at 11000 rpm for 15 min (Eppendorf 5804 F34-6-38 centrifuge, Hamburg, German), filtered through $0.22 \mu\text{m}$ syringe Nylon filter and analyzed by both ICP-MS to determine the total extracted Se content and HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS/MS to detect and identify the Se species. An evaluation of Se species in Protease XIV was also performed to check for impurities.

2.5. HPLC-ICP-MS analysis

Se species in different enzymatic extracts were analyzed by HPLC-ICP-MS after extraction of Se species with enzymatic hydrolysis. The HPLC unit consisted of a PU-2089 HPLC pump (JASCO, Tokyo, Japan) fitted with a six-port injection valve (model 7725i, Rheodyne Rohner Park, CA, USA) and with an injection loop whose volume varied depending on the chromatographic column employed. In order to get an unambiguous identification of the Se species, the extracts were run through two

different columns. First column was a Hamilton PRP-X100 ($250 \times 4.1 \text{ mm}$, $10 \mu\text{m}$) with an anion exchange mechanism and a $100 \mu\text{L}$ injection loop. The mobile phase for the chromatographic separation consisted of 10 mM citric acid at pH 5.0 adjusted with ammonia and 2% methanol (Scharlab, Barcelona, Spain). The elution mode was isocratic with a flow rate of $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The second column was a Phenomenex Kinetex EVO C18 ($150 \times 3.0 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) with a reversed phase mechanism and a $20 \mu\text{L}$ injection loop was employed. The mobile phase consisted of 0.1% formic acid at pH 3.2 and 0.5% methanol. The elution mode was also isocratic with a flow rate of $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The outlet of both columns was connected directly into the conical nebulizer of the ICP-MS with PEEK tubing. Analyses were performed by ICP-MS in time resolved analysis mode by monitoring ^{76}Se , ^{77}Se , ^{78}Se and ^{80}Se isotopes and by employing the operating conditions summarized in the Section 2.3.

After separation in both chromatographic columns, Se species were identified by comparing their retention time with those of standard solutions: Seleno-L-methionine (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and Selenomethylseleno-L-cysteine (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Se quantification was performed by external calibration with the isotope ^{78}Se .

2.6. HPLC-ESI-MS/MS analysis

The confirmation of the identity of Se species was carried out by HPLC-ESI-MS/MS. Analysis of enzymatic extracts was performed with a Phenomenex Kinetex EVO C18 column. A Shimadzu LC-MS-8030 triple quadrupole system (Shimadzu Scientific Instrument, Columbia, MD, USA) equipped with a Nexera LC-30AD solvent delivery unit, a Nexera SIL 30AC autosampler with temperature-controlled tray and a CTO-20AC column oven. The analyses were performed at room temperature, using a mixture of 0.1% formic acid aqueous solution at pH 3.2 and methanol as mobile phase. Isocratic elution was performed using 0.5% methanol, the flow rate was $0.30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and the injection volume was set at $10 \mu\text{L}$. The instrument operated in positive electrospray ionization (ESI) mode. Nitrogen was used as both nebulizing ($1.5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$) and drying ($15.0 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$) gas. Collision-induced dissociation was performed using argon as the collision gas at a pressure of 230 kPa in the collision cell and the collision energy voltage applied was in the range 10–33 eV. Ionization voltage for ESI was set at 4.5 kV; the interface current was fixed at $4.4 \mu\text{A}$ and the detector voltage at 2.10 kV.

Full-scan spectra and MS/MS spectra were acquired to obtain the available transitions for each Se species identified by ICP-MS. In the case of unknown species due to lack of standard, a bibliographical search was made with the aim of selecting the predominant Se species found in Se-enriched plants and the most common transitions. As precursor ion, $[\text{M} + \text{H}]^+$ was selected and the detection was carried out in multiple reaction monitoring (MRM) mode, with a dwell time of 100 ms, by monitoring three or four selective transitions for each species.

2.7. Effect of selenium supplementation on essential metals

The short-term effect of Ch-SeNPs supplementation on the accumulation of essential metals (Cu, Fe, Mo and Zn) was evaluated by a microwave digestion process, described in the Section 2.3. Afterwards, the digests were analyzed by ICP-MS for Cu and Mo determination and flame atomic absorption spectrometry (FAAS) for Fe and Zn determination. The operating conditions of the ICP-MS are described in the Section 2.3. For FAAS, the flame type was an air-acetylene mixture with a flow rate of $2.5/4.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, respectively. Fe and Zn were measured in continual with a band pass of 0.2 nm with lamp currents of 30 and 15 mA, and at wavelengths of 248.3 and 213.9 nm, respectively.

2.8. Statistical methodology

In order to evaluate the effect of Ch-SeNPs on the metals studied (Cu, Fe, Zn and Mo), a statistical analysis was carried out after determining their total content in the root and aerial part of both plant species.

Multiple-way ANOVA and PCA were selected since they are powerful multivariate statistical techniques that allow analyzing interrelationships among a large number of variables. Multiple-way ANOVA evaluated statistically if there were significant differences in the concentration of essential metals, in the presence and absence of Ch-SeNPs as well as, between root and aerial part.

PCA is a qualitative analysis that reduces to two or three principal components (PCs) the dimensionality of the multivariate data allowing their graphical visualization, with minimal loss of information. For this purpose, the data matrix is decomposed into matrices of loading (metals, Se content and its species) and scores (samples), providing information on variables and samples, respectively. The PCA compared the results obtained for plant species cultivated in the presence and absence of Ch-SeNPs.

The software package Statgraphics Centurion XVIII, running under Windows 10 was used for both the multifactorial ANOVA and PCA.

3. Results and discussion

3.1. Synthesis and characterization of Ch-SeNPs

An efficiency of NPs formation higher than 99% was obtained by employing 0.1% chitosan and 0.054 M ascorbic acid as optimal conditions. Moreover, the amount of the dissolved Se in the NPs dispersion was lower than 1%. The low amount of dissolved metalloid evidences that Se was added to the plants mostly as nanoparticulated form.

The core diameter, shape and composition of the synthesized NPs were measured by TEM and EDX, respectively. The Fig. 1a shows well-dispersed spherical NPs with an average diameter of (50 ± 5) nm and EDX analysis confirmed the presence of Se (K_{α} (1.0 keV), L_{α} (8.7 keV) and L_{β} (9.6 keV)) in the detected NPs.

The hydrodynamic diameter and polydispersity index (Pdl) were determined by DLS measurements. Representative diameter distribution graph for Ch-SeNPs, showed in Fig. 1b, provided an average hydrodynamic diameter of (196 ± 1) nm. The absence of tail on the distribution obtained together with a Pdl of 0.2 indicates that synthesized Ch-SeNPs were not aggregated suggesting a monodisperse sample with a narrow width distribution.

The hydrodynamic diameter, zeta potential and particle number concentration were measured by NTA. The size distribution shown in Fig. 1c, provided an average hydrodynamic diameter of (240 ± 50) nm which agreed well with data obtained by DLS measurements. The Fig. 1d shows the zeta potential graph whose average value was (-38 ± 1) mV therefore, Ch-SeNPs were stable in both media as this value is below the range between -30 and $+30$ mV. In addition, NTA technique enables counting NPs directly in solution, so it can be used for determining the number of particles per milliliter, as recommended by European Union (MEMO/11/704, Brussels, 18 October 2011). The concentration expressed as particles number per milliliter, in both synthesis medium and Hoagland's solution, was $(3.1 \pm 0.2) \cdot 10^{12}$ particles mL^{-1} corresponding to $5 \text{ mg Se} \cdot \text{L}^{-1}$. This Se concentration was supplemented to the plants *R. sativus* and *B. juncea* for performing the further studies. This level of Se supplementation did not affect plant productivity as

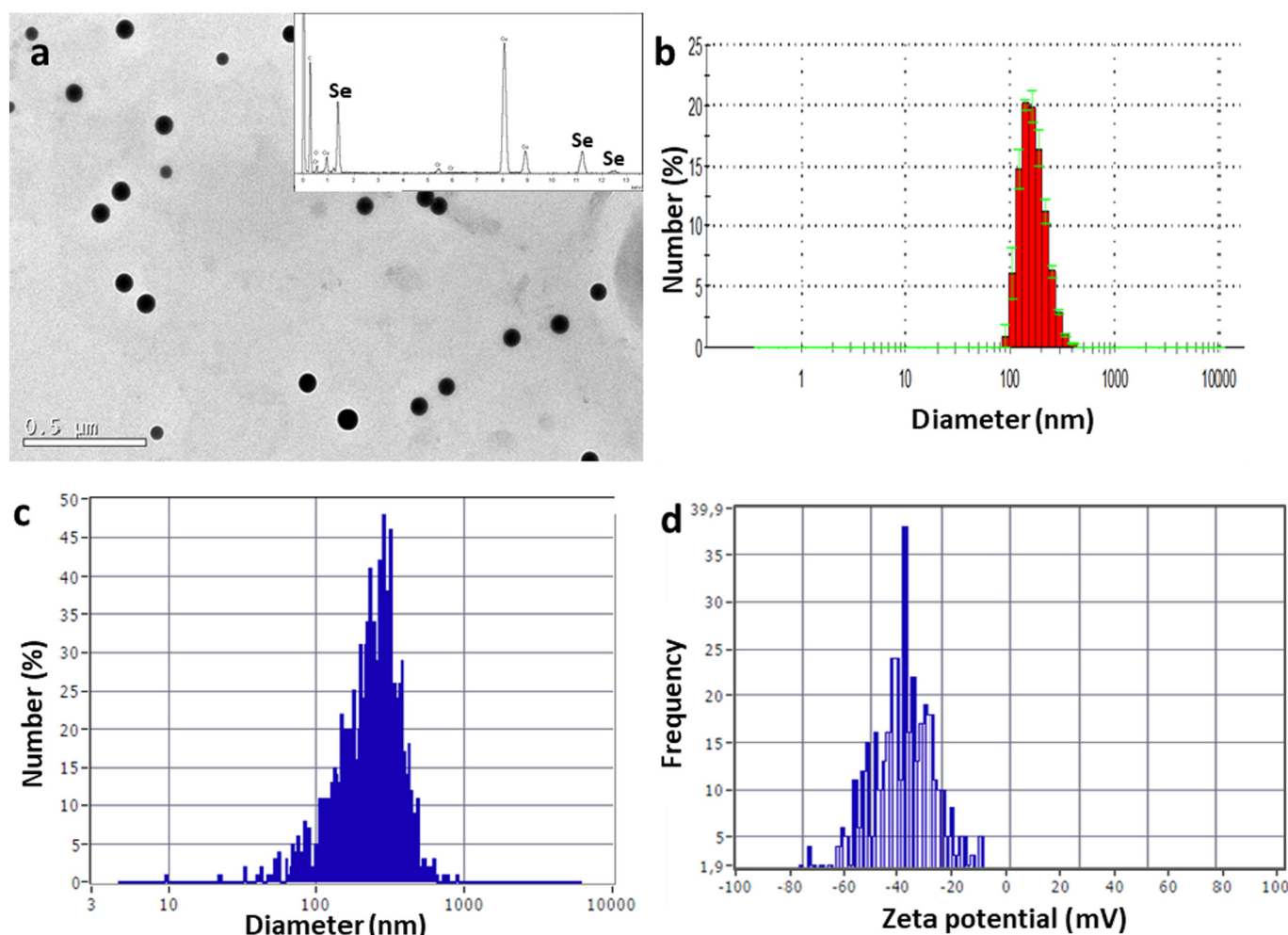


Fig. 1. Ch-SeNPs characterization in one-tenth strength Hoagland's nutrient solution by applying different techniques: (a) TEM image and EDX spectrum, (b) DLS measurements of size distribution, (c) size distribution and (d) Zeta potential, both obtained by NTA measurements.

only a 0.5% reduction in plant weight in presence of Ch-SeNPs was obtained. Therefore, no significant differences in plants weight were found among groups of control plants and those plants treated with Se.

3.2. Total Se and translocation

Total Se content was analyzed in root and aerial part of *R. sativus* and *B. juncea* by ICP-MS after microwave acid digestion (Table 1). In spite of the short interaction time between Se-enriched hydroponic solution and plants, the Se accumulation capability of these plants resulted to be relatively high as it can be observed in Table 1. A multiple-way ANOVA analysis was applied to evaluate statistically if there were significant differences between the content of total Se in root and aerial part of each type of plant either with or without applying short-term Ch-SeNPs supplementation. For *R. sativus* no significant differences in Se content were detected between the roots and aerial part either in control or in Se-enriched *R. sativus* (Fig. S1a of Supporting Information), and for a significance level of 95%. However, significant differences were detected in total Se content analysis between the control and Se-enriched parts of *R. sativus*. Similar behavior was observed for *B. juncea* (data not shown). Although the specie *R. sativus* showed greater Se accumulation capability than *B. juncea*, the concentration was in the same range of magnitude for root and aerial part in both plants. It should be noted that in this study the Se amount absorbed by the perlite, used as a substrate was also analyzed. The results evidenced that this substrate retained between 20 and 30% of Se added. However, hydroponic studies are considered as a first approach before performing soil experiments where Se accumulation is dependent of a greater number of factors (soil characteristics, Se availability in soils or the presence of competing ions) (Hyun et al., 2006; Nakamaru and Altansuvd, 2014; Rovira et al., 2008).

The accumulation of Se in plants depends not only on the type of plant but also on the species of Se supplemented. Most studies of Se in plants are based on the cultivation of different plant species in the presence of Se(IV) and Se(VI) (Schiavon and Pilon-Smits, 2017). Selenate tends to be more effective in the accumulation of Se than selenite, which many authors attribute to the active transport of this anion through the root membrane using the same mechanisms and channels as sulfate (Pedrero et al., 2007a; Terry et al., 2000; Ximénez-Embún et al., 2004). However, for selenite, there is no evidence of its absorption by membrane transporters. Translocation factor (TF) is usually employed to evaluate translocation of Se from root to aerial part and it is defined as the ratio of Se concentration in aerial part to that in root. In the current work and for both plants, the TF was lower than 1. At it was previously mentioned, the multiple-way ANOVA analysis shows that for a significance level of 95% and regardless of the treatment given to the plants, there are no significant differences in the concentration of Se between the root and the aerial part either for *R. sativus*

(Fig. S1a, SI) or *B. juncea*. It should be noted that the translocation of Se also depends on the chemical form in which it is supplemented, as other authors have reported (Eapen and D'Souza, 2005; Montes-Bayón et al., 2002; Ximénez-Embún et al., 2004), being the translocation lower for Se(IV) than for Se(VI). Although the present study was performed with Ch-SeNPs, the results obtained could indicate that NPs would show a behavior similar to that of selenite. However, in other study performed with wheat seedlings by Hu et al. differences in absorption and biotransformation between both Ch-SeNPs and Se(IV) were found, suggesting differences in the mechanism of absorption of both Se-species (Hu et al., 2018). The differences obtained were attributed by the authors to the metabolic inhibitor carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazine which inhibits the uptake of Se(IV). This finding may indicate that Se(IV) is incorporated to the plant by active diffusion while Ch-SeNPs by passive diffusion transport (Hu et al., 2018).

3.3. Ch-SeNPs transformation in Se species. HPLC-ICP-MS analysis

With the aim of determining the potential transformation of Ch-SeNPs by the plant metabolisms, the enzymatic extracts of root and aerial parts, after the proteolytic digestion, were measured by HPLC-ICP-MS to determine and quantify Se species. One of the most relevant steps when performing Se speciation is the extraction of different species. For the extraction of Se species, enzymatic hydrolysis with protease is the method of choice (Pyrzynska, 2009). Extraction efficiency is defined as the ratio of total Se content to the amount of Se extracted. Although many articles indicate that the use of the ultrasound probe increases the recovery and reduces the extraction time (Pedrero et al., 2007b; Seppänen et al., 2010), enzymatic incubation at 37 °C for 24 h not only provides good results in terms of extraction efficiency but also improves the chromatographic profile of Se species. As it is shown in Table 1, the extraction efficiency of the enzymatic extraction process employed with incubation at 37 °C for 24 h, was quantitative (90 ± 11 %), either for root or aerial part of both plant species. Once Se species were extracted quantitatively, the resulting extracts were analyzed by HPLC-ICP-MS. Since species identification by using a unique chromatography column should not be considered as conclusive, anion exchange (PRP-X100) and reversed phase (EVO-C18) columns were employed for this purpose. PRP-X100 was selected because of its widespread use in Se speciation (Huerta et al., 2003; McSheehy et al., 2002; Reyes et al., 2004) and EVO-C18 due to the compatibility of its mobile phase with HPLC-ESI-MS/MS analysis.

Fig. 2 shows the chromatograms of Se species obtained by anion exchange chromatography corresponding to both roots and aerial part from *R. sativus* (Fig. 2a and b) and *B. juncea* (Fig. 2c and d) grown in the Hoagland's solution modified with Ch-SeNPs. All of the chromatograms were run until the complete elution of all the Se species. Although SeMetSeCys and SeMet were the main Se species identified by comparing their retention times with the standards and by spiking experiments, other minor Se species were found. The first Se-containing peak eluted around 2 min could be identified as selenocystine ((SeCys)₂) or selenomethionine Se-oxide (SeMetO) since both species coelute when a PRP-X100 column is used (Pedrero et al., 2007a, 2007b). The next Se containing peaks found above 11–12 min could not be identified with this technique due to lack of standards. Consequently, a reversed-phase column (EVO-C18), compatible with HPLC-ESI-MS/MS technique, was first used in HPLC-ICP-MS in order to know the chromatographic profile of Se species.

Similar chromatographic profile in the root (Fig. 2e) and aerial part (Fig. 2f) was attained for *B. juncea* when analyzed by reversed phase (EVO-C18) column. SeMetSeCys and SeMet were again the main species found by comparing their retention times with the standards and by spiking experiments. With this separation mechanism, it was not possible to differentiate between (SeCys)₂ and SeMetO since both species also coelute in this column. Two unknown Se species appeared around 4 and 8 min. Therefore, the use of HPLC-ESI-MS/MS technique was

Table 1
Total Se concentration found in each part of *R. sativus* and *B. juncea* after acid digestion and enzymatic extraction.

	Total Se content (mg·kg ⁻¹)	
	5 mg Se·L ⁻¹ (Ch-SeNPs)	
	Acid digestion	Enzymatic extraction
<i>R. sativus</i>		
Control root	0.3 ± 0.2	0.7 ± 0.3
Root	52 ± 6	56 ± 2
Control aerial part	0.55 ± 0.01	0.92 ± 0.02
Aerial part	29.6 ± 0.7	24 ± 1
<i>B. juncea</i>		
Control root	0.4 ± 0.2	0.6 ± 0.2
Root	44 ± 2	36 ± 1
Control aerial part	0.15 ± 0.02	0.27 ± 0.01
Aerial part	14.5 ± 0.1	12.8 ± 0.2

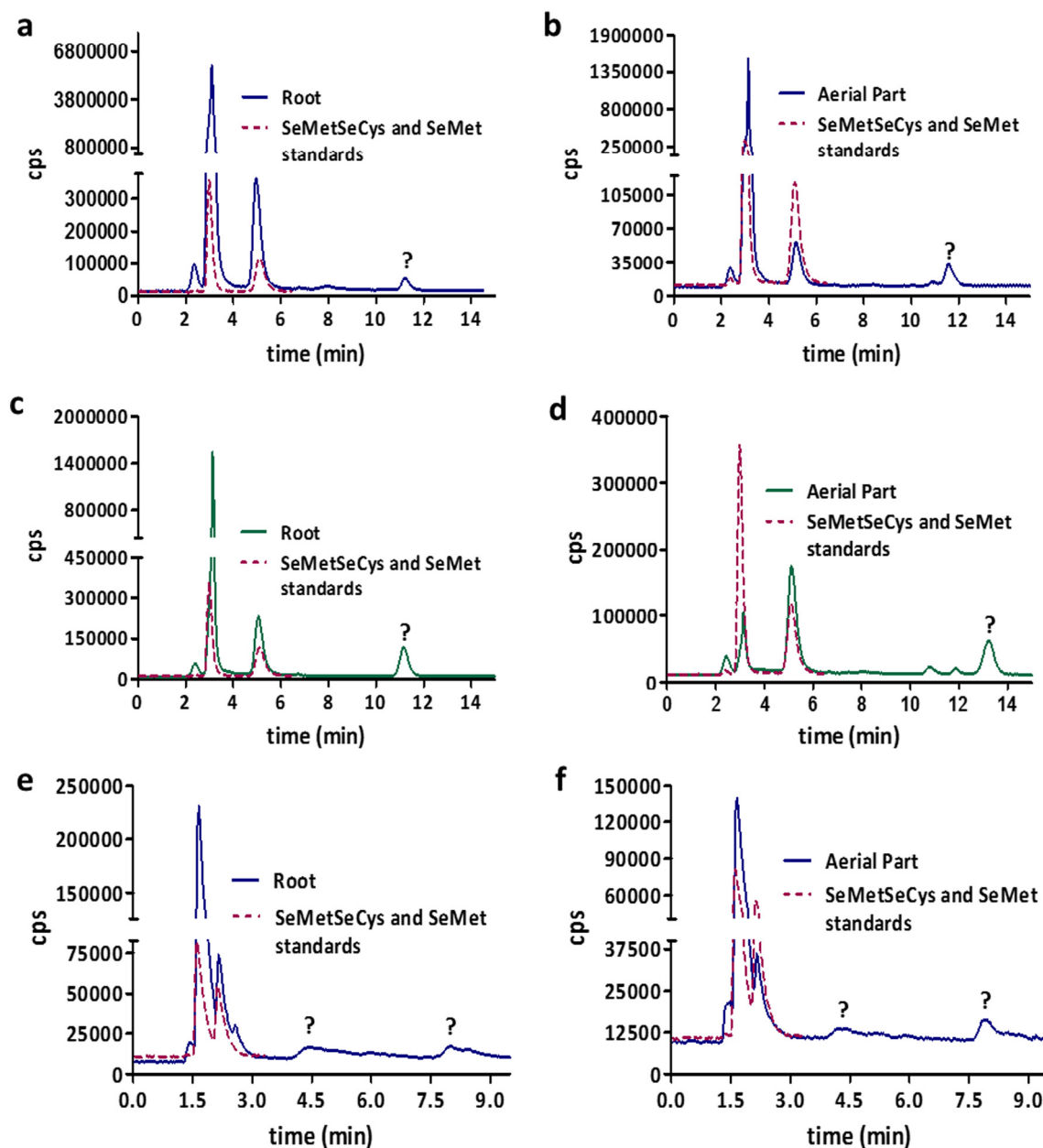


Fig. 2. Chromatographic profile obtained by anion-exchange HPLC-ICP-MS from (a) the root and (b) aerial part of Se-enriched *R. sativus*, and (c) the root and (d) aerial part of Se-enriched *B. juncea*. Chromatographic profile obtained by reversed phase HPLC-ICP-MS from (e) the root and (f) aerial part of Se-enriched *R. sativus*. In the chromatograms, the discontinuous lines correspond to a mixture of Se standards containing $100 \mu\text{g L}^{-1}$ of SeMetSeCys and $50 \mu\text{g L}^{-1}$ of SeMet. ? = unknown Se species.

mandatory to try to identify the unknown Se peaks and to confirm unambiguously the identified species.

The quantification of SeMet and SeMetSeCys was performed by using both chromatographic columns. An external calibration was selected since the samples did not present any matrix effect. The distribution of these species, calculated as the ratio of Se specie concentration to total Se extracted, was of the order of 60% for SeMetSeCys and 10% for SeMet, in both the root and the aerial part of *R. sativus* and *B. juncea*. The multiple-way ANOVA analysis of the concentration of SeMet (Fig. S1b, SI) and SeMetSeCys (Fig. S1c, SI) between the root and the aerial part indicates that there is no significant differences at a confidence level of 95%. Therefore, their translocation is not statistically different when applied the $5 \text{ mg Se} \cdot \text{L}^{-1}$, in form of Ch-SeNPs, used in this study. Studies based on the cultivation of plants in presence of selenium nanoparticles (SeNPs) are scarce. Hu et al., 2018 reported that wheat exposure to Se(IV) and SeNPs lead to the same Se-species but with a

different distribution. In presence of Se(IV) the main organic Se compound was SeMet in both the shoot and the stem whereas with SeNPs, (SeCys)₂, SeMet and Se(VI) were the most abundant species in the shoot and (SeCys)₂, SeMet, Se(IV) and Se(VI) in the root. In other study with *R. sativus*, Palomo-Siguero et al., 2015 showed that SeMetSeCys was the major species with a distribution >50% regardless of the exposure of radishes to Ch-SeNPs or Se(IV). On the other hand, Pedrero et al., 2006 proved that when radishes exposed to Se(IV) and Se(VI) were analyzed, SeMetSeCys and Se(VI) were the most abundant species. In *B. juncea*, foliar application of Se(IV) and Se(VI) resulted in high concentrations of SeMet both at the seeds and the meal (Seppänen et al., 2010). SeMetSeCys has been the main Se compound in the roots, leaves and flower structures of Se-enriched broccoli (*B. oleracea*) (Pedrero et al., 2008).

Recovery studies were carried out by analyzing the Se species separated in the chromatographic columns by calculating the ratio of the

sum of the concentrations of the Se species to the total extracted Se content was in the order of 70% for the anion exchange and reversed-phase columns. Although this value is good, it could increase if it is taken into account that only the species whose standards were available, were quantified. Finally, the analysis of protease XIV by both columns did not detect the presence of impurities of Se in the enzyme.

3.4. Confirmation/identification of Se species by HPLC-ESI-MS/MS

Although HPLC-ICP-MS is a sensitive technique for the detection of elemental Se, the confirmation of species identity is not entirely reliable. Therefore, root and aerial parts of both plant species were analyzed by HPLC-ESI-MS/MS using the reversed-phase column (EVO-C18). Analysis was performed by multiple reaction monitoring (MRM), in which the precursor ion and a product ion were selected.

Mass spectrum containing the isotopic Se pattern of the SeMet standard (Fig. 3a) along with the fragmentation of the chosen molecular ion (198.1) and a bibliographic search (Dumont et al., 2006; Gosetti et al., 2007; Zembruska et al., 2014) allowed us selecting the following transitions for the confirmation of this seleno-amino acid: 198.1–153.0, 198.1–135.0 and 198.1–109.0. Structures are given in Table 2. After Se species extraction, the analysis of the extracts of aerial part and root of both plant species, confirmed the presence of SeMet since a peak appeared at 3.25 min in all the previous transitions. The Fig. 4a shows the chromatograms obtained for the roots of *R. sativus* where peaks corresponding to the transitions of this seleno-amino acid appear at 3.25 min. The identification of this Se species confirmed, therefore, the transformation of Ch-SeNPs added to the culture medium. The formation of SeMet has a significant importance since it is the selenocompound that presents the highest rate of absorption and retention in tissues, and an elevated incorporation into enzymes and proteins (Ip, 1998; Waschulewski and Sunde, 1988).

The presence of SeMet in the sample can lead to the formation of SeMetO, an analytical artifact produced during sample storage and enzymatic extraction (Pedrero et al., 2007a). Because no standard was available for SeMetO, its synthesis was done in the laboratory according to the procedure described by Pedrero et al. (2007a). Through mass spectrum with the typical Se isotopic pattern, recorded by direct infusion (Fig. 3b), the molecular ion 196.0 was chosen due to its greater intensity. However, this molecular ion does not correspond to SeMetO, whose molecular mass is 219.9, but to dehydro-selenomethionine-oxide, which it has been identified as a metabolite in Se-enriched yeasts (Kieliszek and Błazejak, 2018; Preud'Homme et al., 2012). The fragmentation of this molecular ion allowed to select the transitions: 196.0–167.9, 196.0–121.9 and 196.0–94.9 whose structures are given in Table 2. The analysis of root and aerial part from *R. sativus* and *B. juncea*, after enzymatic digestion, confirmed the presence of SeMetO since one Se-containing peak could be observed in all chromatograms and in each transition at 2.75 min. The Fig. 4b shows the chromatograms corresponding to roots of *B. juncea*, where the peak of the SeMetO fragments is observed in each monitored transition and at the same retention time (2.75 min). Although at 3.25 min another peak appears in all transitions, it is not SeMetO but SeMet, as shown above, that due to the similarity in the structure has also these transitions. Therefore, detection of both SeMet and SeMetO involves transformation of Ch-SeNPs added to the plant culture medium into seleno-amino acids and could lead to their non-specific incorporation to proteins (Ellis and Salt, 2003).

The selection of transitions for the identification of SeMetSeCys was done by recording the mass spectrum of the commercial standard (Fig. 3c) and the fragmentation of the chosen molecular ion (184.1) along with a bibliographic search (Dumont et al., 2006; Gosetti et al., 2007; Zembruska et al., 2014). In this way, the transitions 184.1–166.9; 184.1–149.0; 194.1–139.0; and 184.1–73.0 whose structures are given in the Table 2, were selected. After enzymatic hydrolysis, the analysis of the extracts of root and aerial part of both plant species

allowed to confirm the presence of this seleno-amino acid by the peak found at 2.45 min in all the transitions. The Fig. 4c shows the chromatograms obtained for the root of *R. sativus* where it can be observed the peaks corresponding to SeMetSeCys transitions. Therefore, this means that *R. sativus* and *B. juncea* were also able to biotransform the Ch-SeNPs into SeMetSeCys, a non-proteinogenic seleno-amino acid. This seleno-amino acid has been identified in plants that exhibit a high tolerance to Se (Pedrero and Madrid, 2009) and its production has been related to a mechanism of Se-detoxification in those plants (Ximénez-Embún et al., 2004).

In order to identify the unknown Se species, which appeared at retention times around 4 and 8 min when the samples were analyzed by RP-HPLC-ICP-MS (Fig. 2e and f), a bibliographic search of the Se species most commonly described in plants under study was performed. γ -glutamyl-Se-MetSeCys and selenohomolanthionine (SeHLan) were the selected species. According to the literature, the former is one of the most found Se species in the *Brassica* family while the latter has been found in both *Brassica* and radishes (Ogra et al., 2017, 2007). Due to the lack of standards, transitions for the identification of these Se compounds were taken from the literature. Thus, 313.0–296.0; 313.0–250.0; 313.0–224.0; and 313.0–184.0 were selected for γ -glutamyl-Se-MetSeCys, while 285.0–268.0; 285.0–239.0; 285.0–222.0; and 285.0–183.9 were chosen for SeHLan (Bierla et al., 2017). When root and aerial parts of both plant species were analyzed, a chromatographic peak at a retention time, around 5.10 min appeared in all transitions of both Se species at the same retention time (Fig. 4d). However, the intensity of this peak was greater in transitions of γ -glutamyl-Se-MetSeCys than in transitions of SeHLan, which could be considered as instrumental noise. Therefore, the unknown Se specie was identified as a dipeptide in which the glutamyl moiety is linked to SeMetSeCys via its carboxylic acid group in the γ -position. Of all the γ -glutamyl-Se-MetSeCys transitions, whose structures appear in the Table 2, the most intense transition was 313.0–184.0, corresponding to the loss of the glutamyl moiety, which enabled the identification of γ -glutamyl-Se-MetSeCys (Fig. 4d). The mentioned procedure has been used by other authors with the aim of identifying this compound when the commercial pattern is not available. For the peak found at 8 min in the elution profiles, unfortunately we were not able to perform an unambiguous identification of the Se compound due to the lack of information.

3.5. Effect of Ch-SeNPs supplementation on essential metals

The multiple-way ANOVA analysis shows that short-term treatment of plants with 5 mg Se·L⁻¹, in the form of Ch-SeNPs, only significantly affects the incorporation of Zn (Fig. S2a, SI) and therefore its concentration. However, the remaining essential metals, Cu (Fig. S2b, SI), Fe (Fig. S2c, SI) and Mo (Fig. S2d, SI), are not altered by the presence of nanoparticles in the culture medium at a significance level of 95%. No significant differences in Zn, Cu and Fe content was observed between the root and the aerial part of both plants either in absence or presence of Ch-SeNPs. In contrast, the Mo content was significantly different between root and aerial parts, (Fig. S2d, SI).

Principal component analysis was also employed. The PCA compared the results obtained for plant species cultivated in the presence and absence of Ch-SeNPs. The PCA biplot shown in Fig. 5a includes the results from the concentration of essential metals, total Se, SeMet and SeMetSeCys found of the root and aerial part of *R. sativus*. Two PCs were enough to explain 94.1% of the cumulative variance. The graph evidences patterns and differences among root and aerial part cultivated with Ch-SeNPs and among these parts and their respective controls. Loadings explain the behavior of the variables and their correlations while scores show sample distributions. As it can be seen, the loading direction for Se total, SeMet and SeMetSeCys are the same, but opposite to the loading direction of Zn. This pattern suggests that an increase in Se content implies a reduction in the amount of Zn, as evidenced by

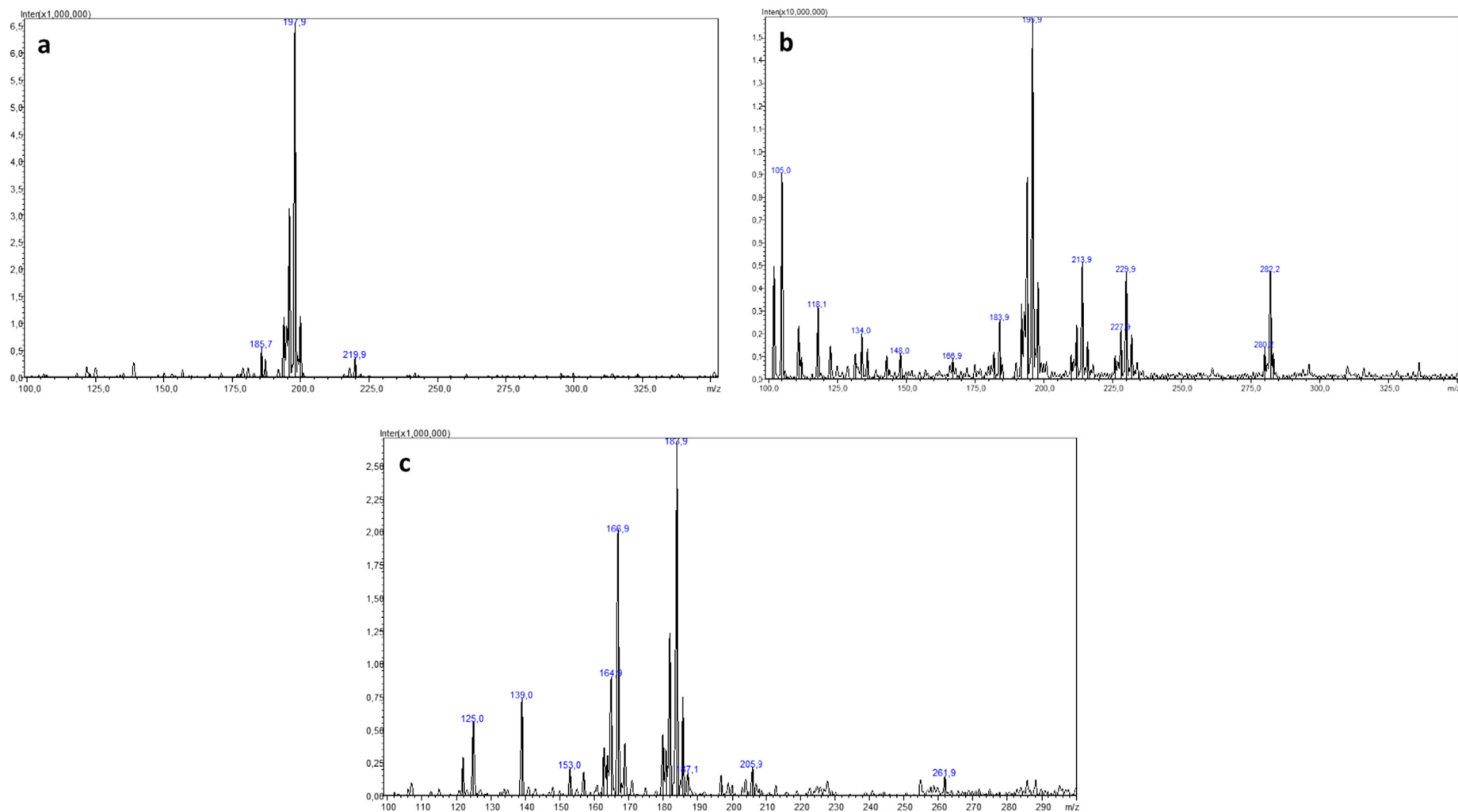
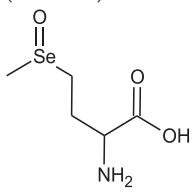
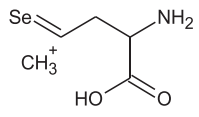
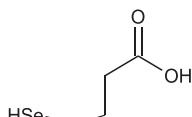
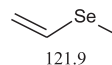
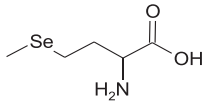
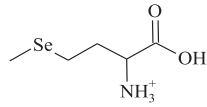
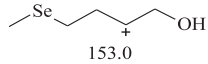
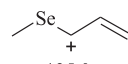
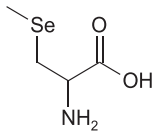
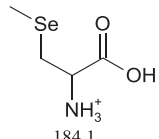
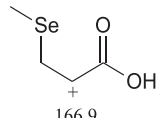
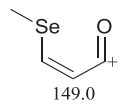
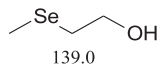
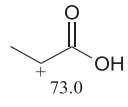
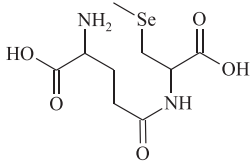
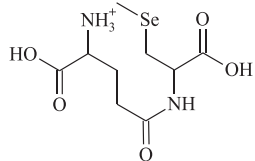
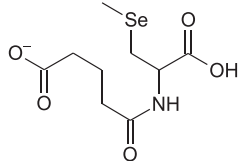
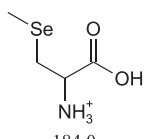


Fig. 3. Mass spectra with the isotopic selenium pattern of: (a) SeMet, (b) SeMetO and (c) SeMetSeCys standards.

Table 2

Fragmentation pattern of the organic Se species.

Analyte (exact mass)	Precursor ion ([M + H])	Fragments
Selenomethionine Se-oxide (212.9 amu) 	 196.0	 167.9  94.9  121.9
Seleno-L-methionine (196.9 amu) 	 198.0	 153.0  135.0  109.0
Selenomethylseleno-L-cysteine (182.9 amu) 	 184.1	 166.9  149.0  139.0  73.0
γ-Glutamyl-Se-methylselenocysteine (312.0 amu) 	 313.0	 296.0  184.0

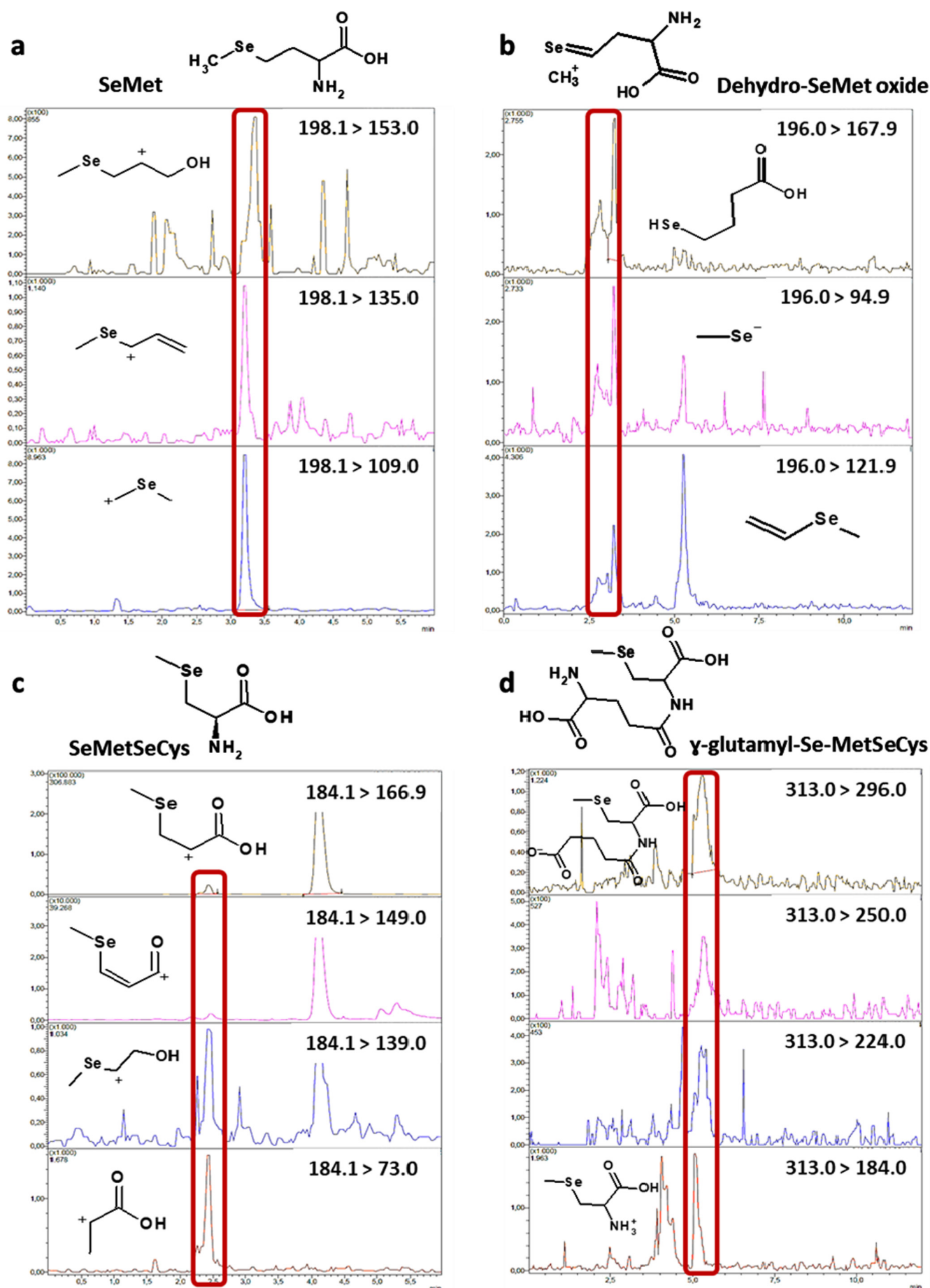


Fig. 4. HPLC-ESI-MS/MS analysis to confirm the presence of (a) SeMet in root of Se-enriched *R. sativus*, (b) dehydro-SeMet oxide in the root of *B. juncea*, and (c) SeMetSeCys in root of Se-enriched *R. sativus* and (d) γ-glutamyl-Se-MetSeCys was identified in the root of Se-enriched *B. juncea*. On each chromatogram, the peak corresponding to each transition is highlighted with a red square and the structure of each fragment is given. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

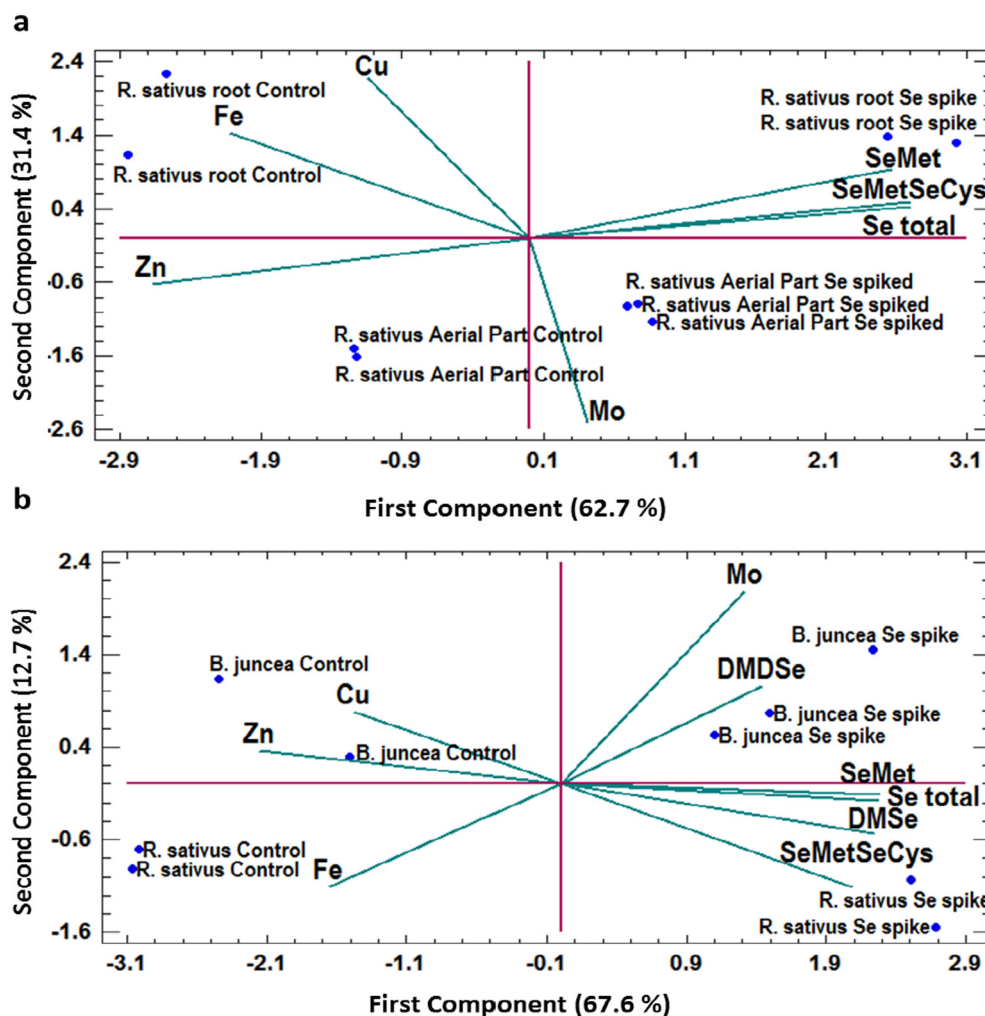


Fig. 5. (a) Biplot of the simultaneous evaluation of the relationship of scores (*R. sativus* root control and *R. sativus* root Se spike and *R. sativus* aerial part control and *R. sativus* aerial part Se spike) and loadings (Cu, Fe, Mo, Zn, Se total, SeMet and SeMetSeCys). (b) Biplot of the simultaneous evaluation of the relationship of scores (*B. juncea* control, *B. juncea* Se spike, *R. sativus* control and *R. sativus* Se spike) and loadings (Cu, Fe, Mo, Zn, Se total, SeMet, SeMetSeCys, DMSe and DMDSe).

Multiple-way ANOVA analysis. According to the way the subsamples are grouped and their position with respect to the loadings, it can be said that control root is rich in Fe and Cu, while control aerial part is characterized by its concentration in Mo suggesting a higher translocation of Mo to the aerial part in absence of Se, as demonstrated by Multiple-way ANOVA analysis. With respect to its analogues cultivated in the presence of Ch-SeNPs, while the root presents a low Zn content and a high Se content, SeMet and SeMetSeCys; the aerial part is characterized low levels of Fe and Cu. These results evidenced how the cultivation of *R. sativus* in the presence of Ch-SeNPs produced an impact only on the uptake of Zn.

A second PCA study was developed by considering the following factors: the two plants employed in the current study, the total concentration of Se, the essential element and Se species in the whole plant and the concentration of dimethyl selenide (DMSe) and dimethyl diselenide (DMDSe). The latter compounds were measured by the authors in a previous study (Moreno-Martin et al., 2019) performed with the same plants under the same level of Ch-SeNPs supplementation and by using the same hydroponic culture experimental set-up. Despite the increase in the number of loadings, again two PCs were enough to explain

80.3% of the cumulative variance. Fig. 5b shows the biplot obtained for objects (*R. sativus* and *B. juncea*) and the variables analyzed. Through the direction of the loading vectors, several conclusions can be drawn. Zn and Cu levels in plants decrease with increasing Se content which it is in agreement with the previously mentioned on the impact of Se fortification on essential elements uptake. Moreover, the production of DMSe and DMDSe is directly related to the formation of SeMet and SeMetSeCys as it has been indicated in several studies (Meija et al., 2002; Tagmount et al., 2002). It has been reported that the first step in Se accumulation is the conversion of inorganic Se to selenite. After entering into the plant, it is translocated and metabolized to SeCys or SeMet that can be used to form selenoproteins or proteins containing Se, methylated to SeMetSeCys or Me-SeMet, or volatilized to DMDSe and DMSe, respectively. In terms of sample groups, the control of *R. sativus* is characterized by a greater Fe content, while its cultivation in the presence of Ch-SeNPs causes a decrease in Cu and Zn levels. On the other hand, cultivation of *B. juncea* in the presence of Ch-SeNPs causes Mo levels to increase possibly at the expense of Fe reduction, while control plants have higher concentrations in Cu and Zn. Finally, comparing both plant species exposed to Ch-SeNPs it can be said that

R. sativus has a higher Se content, SeMetSeCys and DMSe than *B. juncea*, which is characterized by its concentrations in DMDSe and SeMet. These results are consistent because a high DMSe content implies a decrease in SeMet concentration, as well as a decrease in the amount of SeMetSeCys implies an increase in DMDSe levels. Moreover, DMDSe is mainly formed in hyperaccumulators plants as *Brassica juncea* which is in concordance with the data obtained in the current study.

Based on these results, the essential metals may interact at levels of absorption, retention and distribution. Supplementation or deficiency of one of them may adjust their balance and trigger the synergistic or antagonistic effect. The alteration of essential metals balance may also influence the antioxidant system, since several elements such as Se, Cu, Fe and Zn belong to various antioxidant enzymes. The influence of Se on essential metal distribution depends on the chemical form and the level of supplemented Se and plant species. Consequently, modification of one of essential trace elements could alter the concentration of the others with the aim of maintaining the balance of the redox system.

Few studies and with contradictory results are found on the literature regarding how Se fertilization affects the accumulation and translocation of essential elements by plants. It is worth noting that in most of reported studies Se was supplemented as Se(IV) and Se(VI). It has been reported that cultivation of radishes in the presence of Se(VI) caused a decrease in Zn accumulation, as in the present study, while the Fe content was increased (Nawaz et al., 2015). In contrast, in other study when Se was added to rape plant (*B. napus*) and wheat (*Triticum spp.*) an increase in the concentration of Zn and a decrease in the Fe content was reported (Zembala et al., 2010). It has been also indicated that the cultivation of different varieties of broccoli at different levels of Se(VI), showed that the effect of Se on essential metals (Fe, Cu, Zn, among others) accumulation in different parts of plants (root, leaf, head and stems) was dependent on the concentration of Se and the variety of broccoli (Šindelářová et al., 2015). Finally, it is important to mention that several authors have suggested that Fe uptake is enhanced only by high doses of Se, whereas it is reduced at low doses (Feng et al., 2009). In spite of the contradictory results on the literature, it is a matter of fact that fertilization of crops with Se either by using nanoselenium or bulk Se may have impact on the accumulation of essential trace elements that should be taken into account when applying this agronomic practice.

4. Conclusions

The obtained results revealed the transformation of Ch-SeNPs into selenomethionine, and non-proteinogenic seleno-amino acids such as Se-methylselenocysteine and γ -glutamyl-Se-methylselenocysteine by both plant species. Although the study was performed in hydroponic culture, it can be observed that plants were capable of accumulating SeNPs and transforming them to other Se species more bioavailable for plants and humans without impairing plant productivity. These findings suggest SeNPs as a good candidate to be used as nanofertilizer. The use of multiple-way ANOVA and PCA has allowed us to relate the application of Ch-SeNPs with the distributions of Se and Se species as well as with the uptake of essential elements. Regardless the plant species, short-term SeNPs supplementation had only a negative impact on the uptake of Zn.

CRedit authorship contribution statement

Gustavo Moreno-Martín: Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Jon Sanz-Landaluze:** Conceptualization, Investigation, Writing - original draft. **María Eugenia León-González:** Conceptualization, Investigation, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Yolanda Madrid:** Conceptualization, Investigation, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing, Funding acquisition, Project administration.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors thank the Spanish Commission of Science and Technology (CTQ2017-83569-C2-1-R), the Comunidad of Madrid and European funding from FSE and FEDER programs for financial support (project S2018/BAA-4393, AVANSECAL-II-CM); and the Complutense University through a pre-doctoral grant (CT42/18-CT43/18).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138453>.

References

- Alzate, A., Pérez-Conde, M.C., Gutiérrez, A.M., Cámara, C., 2010. Selenium-enriched fermented milk: a suitable dairy product to improve selenium intake in humans. *Int. Dairy J.* 20, 761–769. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.05.007>.
- Bai, Y., Wang, Y., Zhou, Y., Li, W., Zheng, W., 2008. Modification and modulation of saccharides on elemental selenium nanoparticles in liquid phase. *Mater. Lett.* 62, 2311–2314. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2007.11.098>.
- Berntssen, M.H.G., Sundal, T.K., Olsvik, P.A., Amlund, H., Rasinger, J.D., Sele, V., Hamre, K., Hillestad, M., Buttler, L., Ørnsrud, R., 2017. Sensitivity and toxic mode of action of dietary organic and inorganic selenium in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat. Toxicol.* 192, 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.09.014>.
- Bierla, K., Suzuki, N., Ogra, Y., Szpunar, J., Łobiński, R., 2017. Identification and determination of selenohomolanthionine – the major selenium compound in Torula yeast. *Food Chem.* 237, 1196–1201. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.042>.
- Boldrin, P.F., Faquin, V., Ramos, S.J., Boldrin, K.V.F., Ávila, F.W., Guilherme, L.R.G., 2013. Soil and foliar application of selenium in rice biofortification. *J. Food Compos. Anal.* 31, 238–244. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.06.002>.
- Brunetti, G., Traversa, A., De Mastro, F., Cocozza, C., 2019. Short term effects of synergistic inorganic and organic fertilization on soil properties and yield and quality of plum tomato. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 252, 342–347. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.04.002>.
- Dumont, E., Ogra, Y., Vanhaecke, F., Suzuki, K.T., Cornelis, R., 2006. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS): a powerful combination for selenium speciation in garlic (*Allium sativum*). *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 1196–1206. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-0272-6>.
- Eapen, S., D'Souza, S.F., 2005. Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. *Biotechnol. Adv.* 23, 97–114. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.10.001>.
- Edens, F.W., Sefton, A.E., 2016. Organic selenium in animal nutrition – utilisation, metabolism, storage and comparison with other selenium sources. *J. Appl. Anim. Nutr.* 4, 1–14. <https://doi.org/10.1017/jan.2016.5>.
- Eiche, E., Bardelli, F., Nothstein, A.K., Charlet, L., Göttlicher, J., Steininger, R., Dhillon, K.S., Sadana, U.S., 2015. Selenium distribution and speciation in plant parts of wheat (*Triticum aestivum*) and Indian mustard (*Brassica juncea*) from a seleniferous area of Punjab, India. *Sci. Total Environ.* 505, 952–961. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.080>.
- Elemike, E., Uzoh, I., Onwudiwe, D., Babalola, O., 2019. The role of nanotechnology in the fortification of plant nutrients and improvement of crop production. *Appl. Sci.* 9, 499. <https://doi.org/10.3390/app9030499>.
- Ellis, D.R., Salt, D.E., 2003. Plants, selenium and human health. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 273–279. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00030-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00030-X).
- Feng, R., Wei, C., Tu, S., Wu, F., 2009. Effects of Se on the uptake of essential elements in *Pteris vittata* L. *Plant Soil* 325, 123–132. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9961-9>.
- Gosetti, F., Frascarolo, P., Polati, S., Medana, C., Gianotti, V., Palma, P., Aigotti, R., Baiocchi, C., Gennaro, M.C., 2007. Speciation of selenium in diet supplements by HPLC-MS/MS methods. *Food Chem.* 105, 1738–1747. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.072>.
- Guan, B., Yan, R., Li, R., Zhang, X., 2018. Selenium as a pleiotropic agent for medical discovery and drug delivery. *Int. J. Nanomedicine*. 13, 7473–7490. <https://doi.org/10.2147/IJN.S181343>.
- Gupta, M., Gupta, S., 2017. An overview of selenium uptake, metabolism, and toxicity in plants. *Front. Plant Sci.* 7, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02074>.
- Hamilton, S.J., 2004. Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Sci. Total Environ.* 326, 1–31. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.01.019>.
- Hu, T., Li, H., Li, J., Zhao, G., Wu, W., Liu, L., Wang, Q., Guo, Y., 2018. Absorption and bio-transformation of selenium nanoparticles by wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Front. Plant Sci.* 9, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00597>.
- Huerta, V.D., Reyes, L.H., Marchante-Gayón, J.M., Sánchez, M.L.F., Sanz-Medel, A., 2003. Total determination and quantitative speciation analysis of selenium in yeast and

- wheat flour by isotope dilution analysis ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 18, 1243–1247. <https://doi.org/10.1039/b305827a>.
- Hyun, S., Burns, P.E., Murarka, I., Lee, L.S., 2006. Selenium (IV) and (VI) sorption by soils surrounding fly ash management facilities. *Vadose Zo. J.* 5, 1110–1118. <https://doi.org/10.2136/vzj2005.0140>.
- Ip, C., 1998. Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. *J. Nutr.* 128, 1845–1854. <https://doi.org/10.1093/jn/128.11.1845>.
- Iskandar, Andriani, Y., Zidni, I., 2019. Manganese (Mn) and lead (Pb) content in Lemna culture fertilized by bioslurry. *Asian Plant Res. J.* 3, 1–6. <https://doi.org/10.9734/APRJ/2019/v3i3-430068>.
- Kieliszek, M., Błazejak, S., 2018. Speciation analysis of selenium in *Candida utilis* yeast cells using HPLC-ICP-MS and UHPLC-ESI-Orbitrap MS techniques. *Appl. Sci.* 8, 1–14. <https://doi.org/10.3390/app8112050>.
- Kikkert, J., Berkelaar, E., 2013. Plant uptake and translocation of inorganic and organic forms of selenium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 65, 458–465. <https://doi.org/10.1007/s00244-013-9926-0>.
- McSheehy, S., Pannier, F., Szpunar, J., Potin-Gautier, M., Lobinski, R., 2002. Speciation of seleno compounds in yeast aqueous extracts by three-dimensional liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric and electrospray mass spectrometric detection. *Analyst* 127, 223–229. <https://doi.org/10.1039/b108680b>.
- Meija, J., Montes-Bayón, M., Le Duc, D.L., Terry, N., Caruso, J.A., 2002. Simultaneous monitoring of volatile selenium and sulfur species from se accumulating plants (wild type and genetically modified) by GC/MS and GC/ICPMS using solid-phase microextraction for sample introduction. *Anal. Chem.* 74, 5837–5844. <https://doi.org/10.1021/ac020285t>.
- Monreal, C.M., Derosa, M., Mallubhotla, S.C., Bindraban, P.S., Dimkpa, C., 2016. Nanotechnologies for increasing the crop use efficiency of fertilizer-micronutrients. *Biol. Fertil. Soils* 52, 423–437. <https://doi.org/10.1007/s00374-015-1073-5>.
- Montes-Bayón, M., LeDuc, D.L., Terry, N., Caruso, J.A., 2002. Selenium speciation in wild-type and genetically modified *Se* accumulating plants with HPLC separation and ICP-MS/ES-MS detection. *J. Anal. At. Spectrom.* 17, 872–879. <https://doi.org/10.1039/b202608m>.
- Moreno-Martin, G., Sanz-Landaluze, J., León-Gonzalez, M.E., Madrid, Y., 2019. In-vivo solid phase microextraction for quantitative analysis of volatile organoselenium compounds in plants. *Anal. Chim. Acta* 1081, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.06.061>.
- Nakamaru, Y.M., Altansuvd, J., 2014. Speciation and bioavailability of selenium and antimony in non-flooded and wetland soils: a review. *Chemosphere* 111, 366–371. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.04.024>.
- Natasha, Shahid, M., Niazi, N.K., Khalid, S., Murtaza, B., Bibi, I., Rashid, M.I., 2018. A critical review of selenium biogeochemical behavior in soil-plant system with an inference to human health. *Environ. Pollut.* 234, 915–934. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.019>.
- Nawaz, F., Ahmad, R., Ashraf, M.Y., Waraich, E.A., Khan, S.Z., 2015. Effect of selenium foliar spray on physiological and biochemical processes and chemical constituents of wheat under drought stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.jecoen.2014.12.003>.
- Ogra, Y., Kitaguchi, T., Ishiwata, K., Suzuki, N., Iwashita, Y., Suzuki, K.T., 2007. Identification of selenohomolanthionine in selenium-enriched Japanese pungent radish. *J. Anal. At. Spectrom.* 22, 1390–1396. <https://doi.org/10.1039/b707348h>.
- Ogra, Y., Ogihara, Y., Anan, Y., 2017. Comparison of the metabolism of inorganic and organic selenium species between two selenium accumulator plants, garlic and Indian mustard. *Metallomics* 9, 61–68. <https://doi.org/10.1039/c6mt00128a>.
- Palomo-Siguero, M., López-Heras, M.I., Cámara, C., Madrid, Y., 2015. Accumulation and biotransformation of chitosan-modified selenium nanoparticles in exposed radish (*Raphanus sativus*). *J. Anal. At. Spectrom.* 1237–1244. <https://doi.org/10.1039/C4JA00407H>.
- Pedrero, Z., Madrid, Y., 2009. Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: a review. *Anal. Chim. Acta* 634, 135–152. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.12.026>.
- Pedrero, Z., Madrid, Y., Cámara, C., 2006. Selenium species bioaccessibility in enriched radish (*Raphanus sativus*): a potential dietary source of selenium. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2412–2417. <https://doi.org/10.1021/jf052500n>.
- Pedrero, Z., Encinar, J.R., Madrid, Y., Cámara, C., 2007a. Identification of selenium species in selenium-enriched *Lens esculenta* plants by using two-dimensional liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and $[^{77}\text{Se}]$ selenomethionine selenium oxide spikes. *J. Chromatogr. A* 1139, 247–253. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.031>.
- Pedrero, Z., Ruiz Encinar, J., Madrid, Y., Cámara, C., 2007b. Application of species-specific isotope dilution analysis to the correction for selenomethionine oxidation in *Se*-enriched yeast sample extracts during storage. *J. Anal. At. Spectrom.* 22, 1061–1066. <https://doi.org/10.1039/b704807f>.
- Pedrero, Z., Madrid, Y., Hartikainen, H., Cámara, C., 2008. Protective effect of selenium in broccoli (*Brassica oleracea*) plants subjected to cadmium exposure. *J. Agric. Food Chem.* 56, 266–271. <https://doi.org/10.1021/jf072266v>.
- Peñas, E., Sánchez-Martínez, M.J., Martínez-Villaluenga, C., Frias, J., Madrid, Y., Pérez-Corona, M.T., Cámara, C., Vidal-Valverde, C., 2011. *Se* improves indole glucosinolate hydrolysis products content, *Se*-methylselenocysteine content, antioxidant capacity and potential anti-inflammatory properties of sauerkraut. *Food Chem.* 132, 907–914. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.064>.
- Preud'Homme, H., Far, J., Gil-Casal, S., Lobinski, R., 2012. Large-scale identification of selenium metabolites by online size-exclusion-reversed phase liquid chromatography with combined inductively coupled plasma (ICP-MS) and electrospray ionization linear trap-Orbitrap mass spectrometry (ESI-MSn). *Metallomics* 4, 422–432. <https://doi.org/10.1039/c2mt00172a>.
- Pyrzyska, K., 2009. Selenium speciation in enriched vegetables. *Food Chem.* 114, 1183–1191. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.026>.
- Renkema, H., Koopmans, A., Kersbergen, J., Kikkert, J., Hale, B., Berkelaar, E., 2012. The effect of transpiration on selenium uptake and mobility in durum wheat and spring canola. *Plant Soil* 354, 239–250. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1069-3>.
- Reyes, L.H., Sanz, F.M., Espílez, P.H., Marchante-Gayón, J.M., Alonso, J.I.G., Sanz-Meder, A., 2004. Biosynthesis of isotopically enriched selenomethionine: application to its accurate determination in selenium-enriched yeast by isotope dilution analysis-HPLC-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 19, 1230–1235. <https://doi.org/10.1039/b403662j>.
- Rovira, M., Giménez, J., Martínez, M., Martínez-Lladó, X., de Pablo, J., Martí, V., Duro, L., 2008. Sorption of selenium (IV) and selenium (VI) onto natural iron oxides: goethite and hematite. *J. Hazard. Mater.* 150, 279–284. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.04.098>.
- Ruszczyńska, A., Konopka, A., Kurek, E., Torres Elguera, J.C., Bulska, E., 2017. Investigation of biotransformation of selenium in plants using spectrometric methods. *Spectrochim. Acta-Part B At. Spectrosc.* 130, 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2017.02.004>.
- Schiavon, M., Pilon-Smits, E.A.H., 2017. Selenium biofortification and phytoremediation phytotechnologies: a review. *J. Environ. Qual.* 46, 10–19. <https://doi.org/10.2134/jeq2016.09.0342>.
- Seppänen, M.M., Kontturi, J., Heras, I.L., Madrid, Y., Cámara, C., Hartikainen, H., 2010. Agronomic biofortification of Brassica with selenium-enrichment of SeMet and its identification in Brassica seeds and meal. *Plant Soil* 337, 273–283. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0523-y>.
- Šindelářová, K., Száková, J., Tremlová, J., Mestek, O., Praus, L., Kaňa, A., Najmanová, J., Tlustoš, P., 2015. The response of broccoli (*Brassica oleracea* convar. *italica*) varieties on foliar application of selenium: uptake, translocation, and speciation. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 32, 2027–2038. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1099744>.
- Tagmount, A., Berken, A., Terry, N., 2002. An essential role of S-adenosyl-L-methionine: L-methionine S-methyltransferase in selenium volatilization by plants. Methylation of selenomethionine to selenium-methyl-L-selenomethionine, the precursor of volatile selenium. *Plant Physiol.* 130, 847–856. <https://doi.org/10.1104/pp.001693>.
- Terry, N., Zayed, A.M., de Souza, M.P., Tarum, A.S., 2000. Selenium in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 401–432.
- Wang, D., Dinh, Q.T., Anh Thu, T.T., Zhou, F., Yang, W., Wang, M., Song, W., Liang, D., 2018. Effect of selenium-enriched organic material amendment on selenium fraction transformation and bioavailability in soil. *Chemosphere* 199, 417–426. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.007>.
- Waschulewski, I.H., Sunde, R.A., 1988. Effect of dietary methionine on tissue selenium and glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) activity in rats given selenomethionine. *Br. J. Nutr.* 60, 57–68. <https://doi.org/10.1079/bjn19880076>.
- Wiesner-Reinhold, M., Schreiner, M., Baldermann, S., Schwarz, D., Hanschen, F.S., Kipp, A.P., Rowan, D.D., Bentley-Hewitt, K.L., McKenzie, M.J., 2017. Mechanisms of selenium enrichment and measurement in brassicaceous vegetables, and their application to human health. *Front. Plant Sci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01365>.
- Ximénez-Embún, P., Alonso, I., Madrid-Albarrán, Y., Cámara, C., 2004. Establishment of selenium uptake and species distribution in lupine, Indian mustard, and sunflower plants. *J. Agric. Food Chem.* 52, 832–838. <https://doi.org/10.1021/jf034835f>.
- Yang, J., Liu, D., Wang, X., Ji, C., Cheng, F., Liu, B., Hu, Z., Chen, S., Pental, D., Ju, Y., Yao, P., Li, X., Xie, K., Zhang, J., Wang, J., Liu, F., Ma, W., Shopan, J., Zheng, H., Mackenzie, S.A., Zhang, M., 2016. The genome sequence of allopolyploid Brassica juncea and analysis of differential homoeolog gene expression influencing selection. *Nat. Genet.* 48, 1225–1232. <https://doi.org/10.1038/ng.3657>.
- Zembala, M., Filek, M., Walas, S., Mrowiec, H., Kornaś, A., Miszański, Z., Hartikainen, H., 2010. Effect of selenium on macro- and microelement distribution and physiological parameters of rape and wheat seedlings exposed to cadmium stress. *Plant Soil* 329, 457–468. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0171-2>.
- Zembrzuska, J., Matusiewicz, H., Polkowska-Motrenko, H., Chajduk, E., 2014. Simultaneous quantitation and identification of organic and inorganic selenium in diet supplements by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 142, 178–187. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.004>.
- Zhang, G., Zhou, L., Cai, D., Wu, Z., 2018. Anion-responsive carbon nanosystem for controlling selenium fertilizer release and improving selenium utilization efficiency in vegetables. *Carbon N. Y.* 129, 711–719. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2017.12.062>.
- Zhao, C., Ren, J., Xue, C., Lin, E., 2005. Study on the relationship between soil selenium and plant selenium uptake. *Plant Soil* 277, 197–206. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-7011-9>.

Supplementary data

Insights into the accumulation and transformation of Ch-SeNPs by *Raphanus sativus* and *Brassica juncea*: Effect on essential elements uptake.

Gustavo Moreno-Martín, Jon Sanz-Landaluze, María Eugenia León-González* and Yolanda Madrid*

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, España

Corresponding Authors:

Prof. Yolanda Madrid Albarrán (E-mail: ymadrid@quim.ucm.es)
Prof. Maria Eugenia de León- Gonzalez (E-mail: leongon@ucm.es)
Dept. of Analytical Chemistry
Faculty of Chemistry
Universidad Complutense de Madrid
E-28040 Madrid, Spain
Phone: ++0034913945145/4196
Fax: ++0034913944329

Summary of contents

Multiple-way analysis of variance

Fig. S1 Multiple-way ANOVA about the influence of treatment and part of plant on (a) Se total, (b) SeMet and (c) SeMetSeCys in *R. sativus*.

Fig. S2 Multiple-way ANOVA about the influence of treatment and part of plant on (a) Zn, (b) Cu, (c) Fe and (d) Mo in *R. sativus*.

Fig. S1 Multiple-way ANOVA about the influence of treatment and part of plant on (a) Se, (b) SeMet and (c) SeMetSeCys concentration in *R. sativus*.

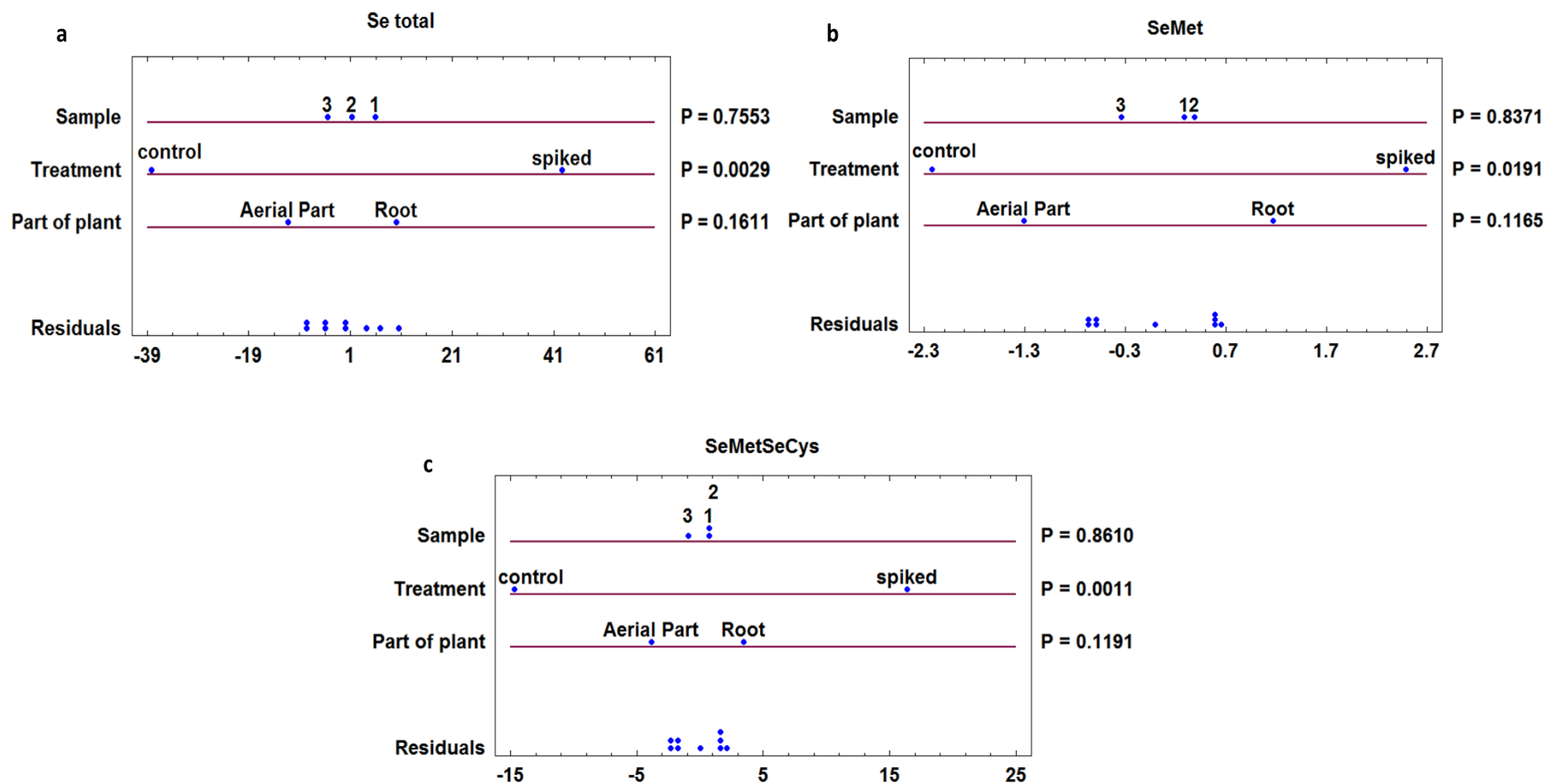
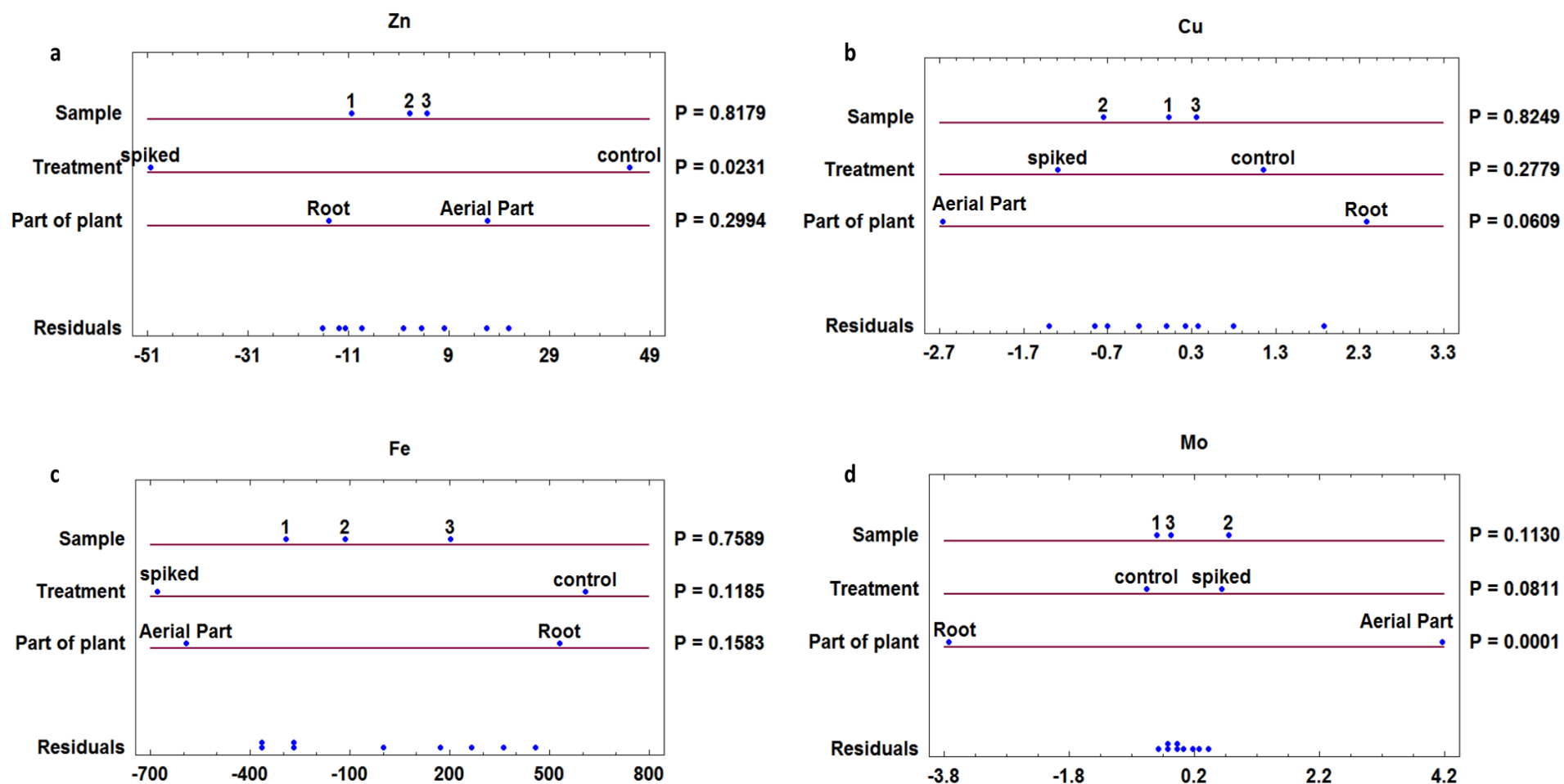


Fig. S2 Multiple-way ANOVA on the influence of treatment and part of plant on (a) Zn, (b) Cu, (c) Fe and (d) Mo concentration in *R. sativus*.



2.3. Determinación del tamaño y de la concentración en masa y en número de las SeNPs biogénicas sintetizadas por bacterias del ácido láctico mediante un enfoque multimétodo

Determination of size and mass-and number-based concentration of biogenic SeNPs synthesized by lactic acid bacteria by using a multimethod approach

Gustavo Moreno-Martín, Micaela Pescuma, Teresa Pérez-Corona, Fernanda Mozzi, Yolanda Madrid

Analytica Chimica Acta 992 (2017) 34-41



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Determination of size and mass-and number-based concentration of biogenic SeNPs synthesized by lactic acid bacteria by using a multimethod approach



Gustavo Moreno-Martin ^a, Micaela Pescuma ^{a, b}, Teresa Pérez-Corona ^a, Fernanda Mozzi ^b, Yolanda Madrid ^{a, *}

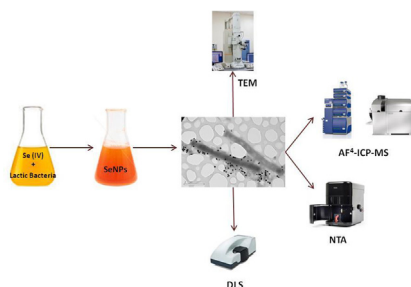
^a Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain

^b Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA)-CONICET, Chacabuco 145, 4000 Tucumán, Argentina

HIGHLIGHTS

- Monodispersed and spherical SeNPs were synthesized by using lactic acid bacteria.
- A procedure based on the use of SDS and NaOH was employed to isolate SeNPs from bacteria cells.
- SeNPs were characterized by TEM, DLS, NTA, AF⁴-ICP-MS and AF⁴ off line coupled to DLS.
- Number-based concentration data obtained experimentally by NTA and by theoretical calculations were in good agreement.
- Data obtained by independent techniques were in good agreement.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 June 2017

Received in revised form

18 September 2017

Accepted 19 September 2017

Available online 28 September 2017

Keywords:

Lactic acid bacteria

Selenium nanoparticles

Asymmetrical flow-field flow fractionation

Nanoparticle tracking analysis

Dynamic light scattering

Inductively coupled plasma mass spectrometry

ABSTRACT

Selenium nanoparticles (SeNPs) were synthesized by a green technology using lactic acid bacteria (LAB, *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. reuteri*). The exposure of aqueous sodium selenite to LAB led to the synthesis of SeNPs. Characterization of SeNPs by transmission electron microscopy with energy dispersive X-ray spectrum (EDXS) analysis revealed the presence of stable, predominantly monodispersed and spherical SeNPs of an average size of 146 ± 71 nm. Additionally, SeNPs hydrodynamic size was determined by dispersive light scattering (DLS) and nanoparticle tracking analysis (NTA). For this purpose, a methodology based on the use of surfactants in basic medium was developed for isolating SeNPs from the bacterial pellet. The hydrodynamic size values provided by DLS and NTA were 258 ± 4 and 187 ± 56 nm, respectively. NTA measurements of number-based concentration reported values of $(4.67 \pm 0.30) \times 10^9$ SeNPs mL⁻¹ with a relative standard deviation lower than 5% ($n = 3$). The quantitative results obtained by NTA were supported by theoretical calculations. Asymmetrical flow field flow fractionation (AF⁴) on line coupled to the inductively couple plasma mass spectrometry (ICP-MS) and off-line coupled to DLS was further employed to characterize biogenic SeNPs. The distribution of the particle size for the Se-containing peak provide an average size of (247 ± 14) nm. The data obtained by independent techniques were in good agreement and the developed methodology

* Corresponding author. Dept. of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain.
E-mail address: ymadrid@quim.ucm.es (Y. Madrid).

could be implemented for characterizing NPs in complex matrices such as biogenic nanoparticles embedded inside microbial material.

© 2017 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

The synthesis of nanoparticles (NPs) of different sizes, morphologies, compositions, shapes and controlled dispersions is a topic of interest in nanotechnology. Currently, nanoparticles are prepared by means of chemical reactions which imply the use in many cases of hazardous chemicals and harsh conditions. During many years, biotechnology has employed microorganisms for the remediation of toxic metals. However, it has been recently when microorganism along with plants and fungi are used for preparing nanoparticles.

The biogenic synthesis of metallic and non-metallic NPs by using biological systems such as microorganisms and plant extracts has gained in acceptance in the last years due to its simplicity, low cost and biocompatibility of the resulting nanostructures with biomedical applications [1–3]. Other advantages over synthetic nanoparticles have been claimed for biogenic ones; for example, it has been reported that biogenic nanoparticles are more stable, do not need the addition of coating agents, and could have an enhanced antimicrobial effect comparing to their synthetic counterparts due to the presence of bacterial membrane components in the nanoparticles [4]. Bacteria have been used for the biogenic synthesis of silver nanoparticles [5], tellurium nanoparticles [6,7] and selenium nanoparticles [4,8], among others. Among bacteria tested for producing biogenic nanoparticles, lactic acid bacteria (LAB) have the advantage of possessing the GRAS (Generally Recognized As Safe) and Qualified presumption of safety (QPS) status for which they are commonly used in food fermentations. Therefore, these bacteria are cheap and easy and safety to handle making them very interesting from producing metallic and non-metallic nanoparticles. It has been reported that some lactobacilli are able to produce titania [9] and silver nanoparticles [10].

In the last few years, selenium nanoparticles (SeNPs) have grown in interest due to their antioxidant and antimicrobial properties [4]. SeNPs can be chemically synthesized by a reaction between a selenium compound and a reducing agent: selenite is usually employed as selenium source, and among reducing agents glutathione peroxidase (GSH) [11] and ascorbic acid are the most widely used [11]. The stability of SeNPs is an important factor to be considered, as their dispersion is normally unstable in absence of stabilizing agents, leading to aggregation. In this regard, proteins such as bovine serum albumin (BSA) [12], monosaccharides (glucose) [13], oligosaccharides (sucrose) [13] and polysaccharides (chitosan, CS) [13] are commonly used to modify the surface of the SeNPs and to control their diameter. As alternative to chemical procedures, SeNPs have been also synthesized using plants, fungi and bacteria. Many bacteria are known to exhibit Se resistance and one of the mechanisms of Se detoxification is the production of elemental selenium as SeNPs [8,14]. Synthesis of these NPs can be extracellular, intracellular, or membrane bound. Characterization of NPs requires multi-method approaches to provide information especially in complex matrices. Such approaches provide information on properties that need to be measured for characterizing nanoparticles. The most commonly methods are based on light scattering measurements such as Dynamic Light Scattering (DLS), Multiangle Light Scattering (MALS) and Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), classical electron microscopy (TEM/SEM) and

separation techniques such as ultrafiltration and Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation (AF⁴) [15–22]. Characterization of biogenic nanoparticles, especially for those nanoparticles without magnetic properties, is not an easy task and implies a careful separation of biogenic NPs from the bacterial pellet. The presence of microorganisms in the NPs dispersions could alter size measurements when using light scattering techniques.

This work investigated the biogenic synthesis of SeNPs by using LAB and their further characterization in terms of size and morphology, and quantification in terms of number and mass-based NPS by using a multitechnique platform. For this purpose, several sample treatments for isolating biogenic SeNPs from bacteria pellet along with a plethora of techniques including TEM (size and morphology) DLS (hydrodynamic size), NTA (hydrodynamic size and number of nanoparticles) and AF⁴ on line coupled to the ICP-MS (particle mass concentration and composition) were applied.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and solutions

The strains *Lactobacillus acidophilus* CRL 636, *L. reuteri* CRL 1101, and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 656 used in this work were obtained from the Culture Collection of the Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA, San Miguel de Tucumán, Argentina). Sodium selenite (Na₂SeO₃) and concentrated nitric acid (HNO₃) were obtained from Merck (Madrid, Spain); 30% (v/v) hydrogen peroxide (H₂O₂) and 99% (w/w) sodium hydroxide (NaOH) were obtained from Panreac (Barcelona, Spain); sodium dodecyl sulfate (SDS) was purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, USA) and MRS broth was acquired from Scharlab (Barcelona, Spain). All chemicals were of analytical grade and were used without further purification except MRS-broth and Na₂SeO₃ solutions, which were sterilized with an autoclave and 0.22 µm nylon filters, respectively. All aqueous solutions were prepared with ultrapure water (Milli-Q water, 18 MΩ cm⁻¹) from a Milli-Q water purification system unit (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2. Synthesis of selenium nanoparticles using *Lactobacillus* sp

The *Lactobacillus* sp. strains were previously activated in sterile MRS broth and incubated at 37 °C in a thermostated bath. Bacterial cells were transferred twice in fresh MRS and further cultured in the absence (control) and the presence of 25 mg Se L⁻¹ as Na₂SeO₃ during 24 h at 37 °C. During incubation, the color medium changes from yellow towards red as a result of the synthesis of SeNPs.

2.3. Determination of total selenium in bacterial pellet

Bacterial cells exposed to selenite were separated from the culture medium by centrifugation (5000 rpm, 5 min) at room temperature. The resulting bacterial pellet was washed twice with Milli-Q water. Then, 100 mg of bacterial pellet were submitted to acid digestion in a 1000 W microwave oven with 1 mL of concentrated HNO₃ and 0.5 mL of 30% (v/v) H₂O₂. The resulting solutions were diluted with Milli-Q water to 10 mL. Finally, selenium concentration was measured by using an Agilent 7700-collision/

reaction cell ICP-MS and employing H₂ as collision gas. The equipment measuring conditions are listed in Table 1.

2.4. Separation of biogenic SeNPs from culture medium

Separation of biogenic SeNPs from culture medium was achieved by applying the procedure developed by Torres et al. [23] with several modifications. Briefly, portions of the bacterial cultures were collected, submitted to ultrasound for 2 min using an ultrasonic bath and finally centrifuged (9449 rpm, 10 min) at room temperature. The resulting bacterial pellet containing nanoparticles was re-suspended in 0.1% SDS (w/v)/1 M NaOH and subjected to ultrasound and centrifugation as mentioned above. Finally, the bacterial pellet was re-suspended in distilled water and the resulting solution was filtered through 0.45 µm and 0.22 µm nylon filters to isolate the biogenic SeNPs.

Mass balances were calculated to evaluate the performance of the process in terms of nanoparticles losses. For this purpose, fractions collected after the first and second filtration step were subjected to an acid digestion following the procedure described in section 2.3. Selenium concentration in the different fractions was measured by ICP-MS following the conditions given in Table 1.

2.5. Characterization of biogenic SeNPs by transmission electron microscopy (TEM) and X-Ray Energy Dispersive Spectroscopy (XEDS) detection

TEM data from both isolated biogenic SeNPs suspensions and bacteria containing-SeNPs were obtained using high resolution Transmission Electron Microscope (TEM) (JEOL JEM 2100, USA) equipped with an X-Ray Energy Dispersive Spectroscopy (XEDS) microanalysis composition system (Oxford Inca, city). Briefly, biogenic SeNPs suspensions were sonicated during 2 min and the solution was dropped into copper grid and dried in clean air for TEM observation operated at an accelerating voltage of 200 kV. More than 1500 SeNPs dispersed in about 20 TEM photos were viewed to measure the size distribution.

2.6. Characterization of biogenic SeNPs by dynamic light scattering (DLS)

The hydrodynamic diameters of the NPs under investigation were measured using a Malver Zetasizer Nano ZS (Malver Instrument LTD, Malvern UK) system equipped with a laser of 633 nm. The scattering

angle was 173°, the measuring position was 4.65 mm inside disposable plastic cuvettes, and the mean of ten measurements was taken. The hydrodynamic diameter was given as the average size obtained from a number distribution of NPs. All samples were diluted to a suitable concentration using deionized water prior to analysis.

2.7. Characterization of biogenic SeNPs by nanoparticle tracking analysis (NTA)

The samples were analyzed by a NanoSight NS300 (Iesmat, Spain) using a laser-illuminated microscope, and Brownian motion was recorded in real-time using a CCD (charge-coupled device) camera. Each particle was simultaneously, but separately, visualized and tracked using image-analysis software. Thus, samples were sonicated and diluted again with deionized water to reach a concentration suitable for the analysis. All measurements were taken on an instrument manufactured by Nanosight (Salisbury, UK). The diluted sample was injected into the sample chamber fitted with a 640 nm diode laser. The software used for capturing and analyzing the data was the NTA 2.0 Build 127. The samples were measured for 60 s with manual shutter and gain adjustments. For each sample the measurement was repeated 10 times. After capturing the size, diffusion coefficient and track lengths for the individual particles were determined using the NTA software.

2.8. SeNPs analysis by AF⁴-DAD-ICP-MS

An AF2000 system (Postnova Analytics, Landsberg and Lech, Germany) equipped with a regenerated cellulose ultrafiltration membrane of 10 kDa molecular weight mass cut-off and a spacer of 500 µm, was used in this work. A 300 µL injection loop was employed for performing sample injection into the AF⁴ system via a Rheodyne valve. The AF⁴ system was connected on line to an ICPMS (Agilent HP-7700 Series collision/reaction cell, Santa Clara, CA, USA) and DAD detector set at 369 nm. For accurate characterization of biogenic SeNPs, fraction containing NPs were collected and analyzed by DLS (described above).

3. Results and discussion

3.1. Biogenic synthesis of SeNPs

It has been reported that elemental selenium production by LAB is associated with alcohol dehydrogenase or glutathione reductase

Table 1
ICP-MS and AF⁴ operating parameters.

ICP MS	
RF-Power (kW)	1.55
Plasma gas flow rate (l min ⁻¹)	15.0
Carrier gas flow rate (l min ⁻¹)	0.30
Nebulizer flow rate (l min ⁻¹)/type	0.75/Conikal
Spray chamber	Scott
Isotopes monitored	⁷⁶ Se, ⁷⁷ Se, ⁷⁸ Se, ⁸⁰ Se
Adquisition mode	Continuous
Reaction gas	H ₂
Reaction gas (ml H ₂ min ⁻¹)	6
AF⁴	
Carrier	Ultrapure water at pH 5.0
Membrane type	Regenerated cellulose: 10 kDa cut-off filter
Channel thickness (µm)	500
Injection volume (µl)	300
Injection flow (mL min ⁻¹)	0.1
Focus flow (mL min ⁻¹)	3.2
Cross flow (mL min ⁻¹)	3.0
Detector flow (mL min ⁻¹)	0.3
Gradient mode	Linear
Wavelength	369 nm

activities [24,25]. Glutathione reductase could reduce selenite by glutathione (GSH) oxidation. However, the capacity of LAB to transport GSH inside the cell and reduce it is variable between LAB strains [26]. In addition, the ability of LAB to resist Se is strain-dependent [24,27]. Consequently, and due to the heterogeneity of LAB metabolism and capacity to resist Se, two homofermentative LAB strains (*L. acidophilus* CRL 636 and *L. bulgaricus* CRL 656) and the heterofermentative strain (*L. reuteri* CRL 1101) were selected for this study.

After exposing the *Lactobacillus* strains to Na_2SeO_3 (25 mg Se L^{-1}) and incubating in the culture medium at 37 °C, the reaction solution displayed a time dependent color change as shown in Fig. 1. At the beginning of the reaction, the solution was clear light-yellow, and it became light red after 24 h of reaction. The appearance of the red color indicated the occurrence of the reaction and the formation of elemental selenium in solution. The bacteria pellet collected from the culture media was examined by TEM. Fig. 2 shows the presence of SeNPs with spherical shapes among the LAB. Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDXS) analysis confirmed the presence of Se ($\text{K}\alpha$ (1.0 keV), $\text{L}\alpha$ (8.7 keV) and $\text{L}\beta$ (9.6 keV) in these nanoparticles.

Despite their similarity in morphology, biogenic SeNPs size distribution was different depending on the *Lactobacillus* species involved. Histograms of particle size distribution show a size average of biogenic SeNPs of (176 ± 13 nm), (160 ± 24 nm) and (130 ± 23 nm) when prepared in presence of *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* and *L. reuteri*, respectively. From the experimental data, it was observed that particle size distribution and shape was also dependent on the initial selenite concentration employed for preparing SeNPs. The use of 100 ppm of sodium selenite provides spherical SeNPs with a diameter size of around 300 nm except for those generated by using *L. bulgaricus* which showed a star shape morphology (Fig. 2d).

The TEM micrographs also evidence bacterial cell wall damage either in *L. acidophilus* or *L. bulgaricus*, whereas the presence of selenium produces the excretion of exopolymeric substances (polysaccharides) in *L. reuteri*. It has been reported that some bacteria are able to excrete exopolymers to produce biofilms as a defense mechanisms to enhance their ability to survive in presence of anti-microbial agents or under stress conditions [28]. Regarding the amount of selenium accumulated by the *Lactobacillus* strains after 24 h of incubation, the highest percentages values were found in *L. reuteri* (79 ± 3) followed by *L. acidophilus* (41.2 ± 0.6), and finally the *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (28 ± 2) strain. These results are in line with the observed resistance of *L. reuteri* to the presence of

selenium by producing an exopolymer. Because of its greatest ability to survive at high levels of selenium and to accumulate the highest amount of selenium, *L. reuteri* was considered as the most suitable *Lactobacillus* specie for producing biogenic SeNPs.

3.2. Determination of size and number and mass-based concentration of biogenic SeNPs by using, TEM, AF^4 -ICP-MS, NTA and AF^4 off-line coupled to DLS

The accurate characterization of biogenic SeNPs implies their previous separation from the bacterial pellet. The presence of bacteria with a size much larger than SeNPs could hinder proper NPs characterization when applying techniques such as DLS. Separation of SeNPs from bacteria is not an easy task. First, SeNPs are located inside bacteria therefore a bacteria cell wall lysis step is required, and second the large size of bacteria makes difficult their separation from nanoparticles by filtration. Several approaches were tested to separate SeNPs from bacteria pellet. No positive results were obtained when applied either autoclave sterilization or tip-sonication at pH 7.0 (Tris buffer), since NPs remained occluded inside the bacterial pellet and therefore retained in the filters. Subsequently the use of surfactants (Surfynol and SDS in basic medium) was tested as a way of permeabilizing bacterial cell wall. Best results, in terms of the amount of recovered NPs were attained when the mixture 0.1% SDS/1 M NaOH was employed. The fact that the amount of NPs recovery was higher with SDS than with Surfynol could be attributed to a better bacterial cell wall permeabilization when using SDS, thus allowing the easy release to the extracellular medium of the SeNPs entrapped in the bacterium. Additionally, the use of NaOH favored the release of the NPs to the culture medium by dehydrating the bacteria organelles. This pre-treatment (surfactant and NaOH) facilitated the subsequent separation of SeNPs from the bacterial pellet by filtration through 0.45 μm and 0.22 μm filters.

Separation and filter techniques may lead to SeNPs losses due to membrane filter adsorption. In order to calculate the amount of SeNPs retained in the filter, the total selenium content was determined after acid digestion of the filtrates collected from the 0.45 μm filter. The resulting digests were analyzed by ICP-MS using the conditions given in Table 1. The selenium concentrations in the filtrates evidenced the low yield of the separation process with recovery percentages as low as only a (11.6 ± 0.6 %) and (12.8 ± 0.2 %) after the first and second filtration step, respectively suggesting that the first filtration through 0.45 μm nylon filters as the limiting step of the process.



Fig. 1. Color changes in the culture medium as a function of the incubation time of *L. reuteri* CRL 1101 in the presence of selenite. Left to right 0, 4, 6 and 24 h of incubation time. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

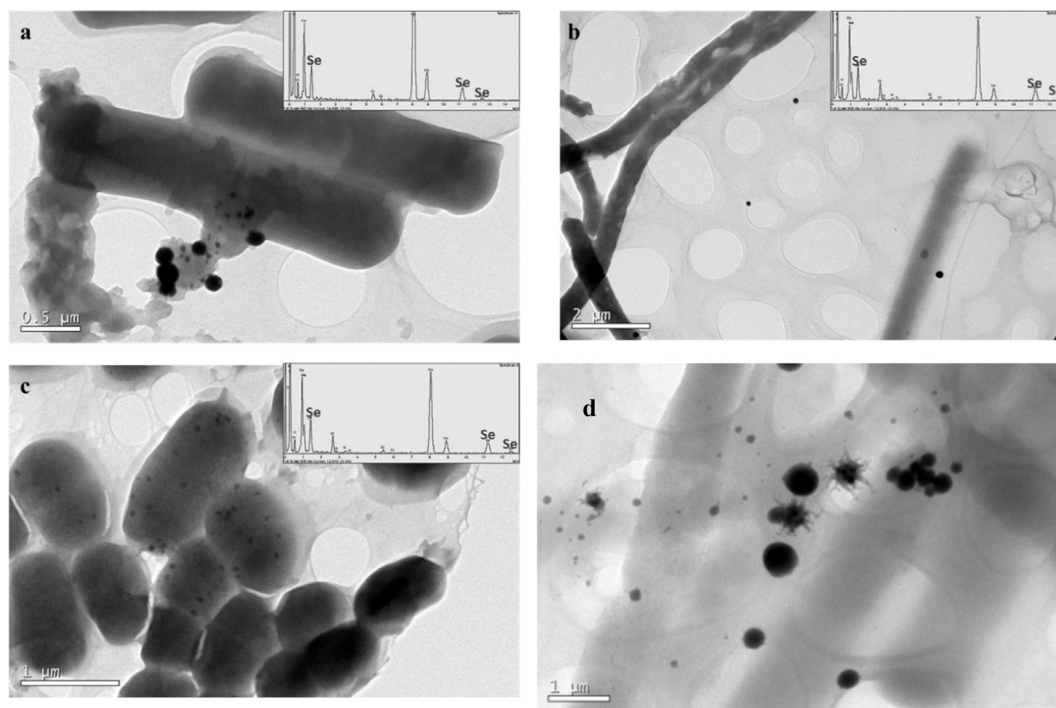


Fig. 2. TEM images and XDS spectra of biogenic SeNPs synthesized by: *L. acidophilus* CRL 636 (a), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 454 (b), and *L. reuteri* CRL 1101 (c) for a concentration of Se of 25 mg L⁻¹, (d) biogenic SeNPs synthesized by *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 454 for a concentration of Se of 100 mg L⁻¹.

The isolated SeNPs were characterized in terms of size by using both single particle (transmission electron microscopy) and ensemble methods (DLS and nanoparticle tracking (NTA)). The TEM images (Fig. 3a, b, c, d) of the SeNPs synthesized by *L. reuteri* CRL 1101 and released by the above-given procedure showed spherical NPs in the range of 50–200 nm (Fig. 3e) with an average size of (146 ± 71) nm. No significant differences in sizes and morphologies

were observed when comparing isolated and non-isolated biogenic SeNPs suggesting the stability of the biogenic SeNPs during the isolation processes. Additionally, the electron diffraction pattern (Fig. 3f) confirmed the non-microcrystalline structure of the synthesized SeNPs.

When using microscopy techniques special care must be focused on selecting the number of particles to be measured.

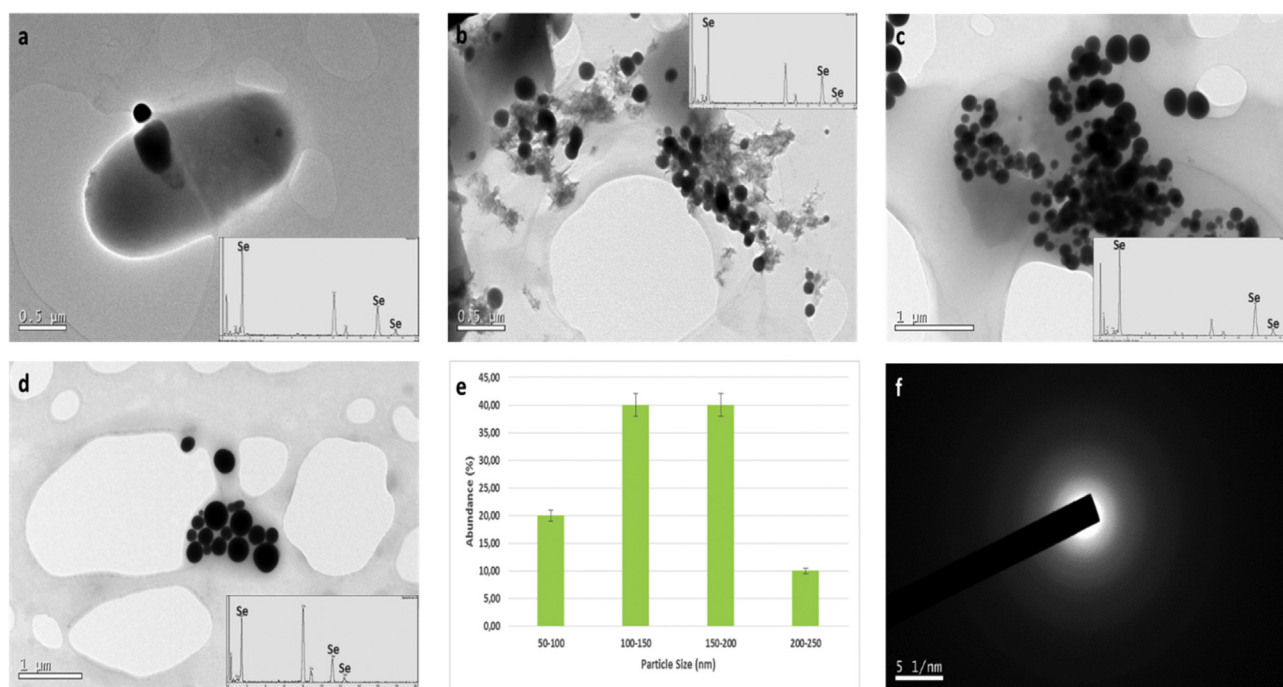


Fig. 3. a) Effect of SDS/NaOH on the bacterial cell wall lysis. b, c, d) TEM images and XDS spectra of biogenic SeNPs synthesized by *L. reuteri* CRL 1101 after isolating from the cell pellet. e) Particle size distribution and f) Diffraction pattern of nanoparticles.

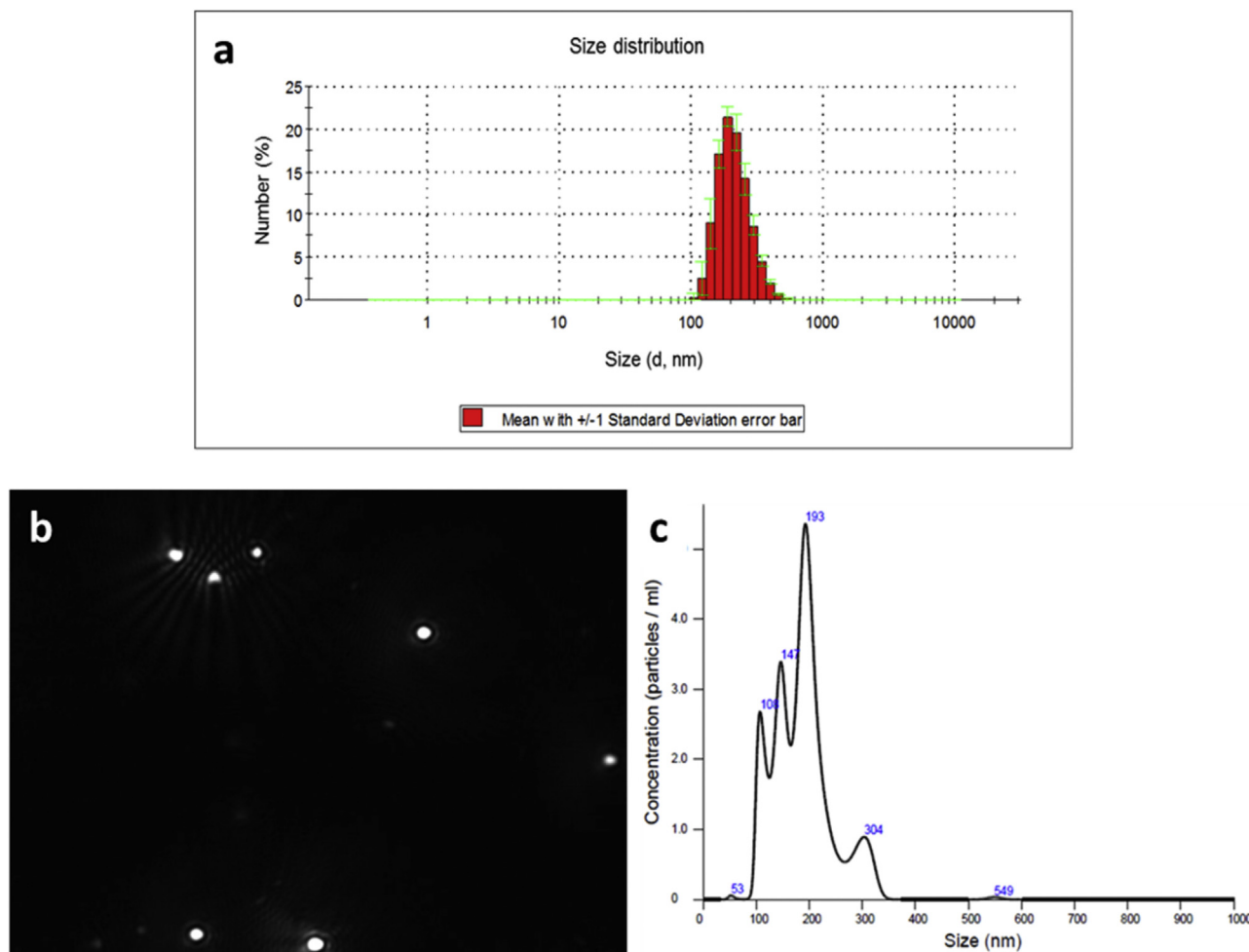


Fig. 4. a) DLS measurements. Size distribution of SeNPs synthesized by *L. reuteri* CRL 1101 with the mean (red) and standard deviation (green). b) NTA measurements. Fragment of the video obtained by NTA for the biogenic SeNPs and size distribution of biogenic SeNPs considering the Stokes-Einstein equation. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Typically 200–1000 particles are sampled from a total size of many millions which could lead to inaccurate measurements. Ensemble NPs measurements are techniques where information from many thousands of NPs are obtained. DLS is one of the most frequently used methods to obtain an average diameter of nanoparticles dispersed in liquids providing reasonably accurate results for strictly monodisperse NPs. However, DLS is unable to distinguish between nanoparticles with slight differences in diameter or to precisely resolve polydisperse samples. In the current work the presence of larger NPs as for instance bacterial debris accompanying to SeNPs may cause biased results impairing the validity of the obtained data. Representative diameter distribution graph for SeNPs as obtained by DLS is shown in Fig. 4a. The average hydrodynamic size of nanoparticles was (258 ± 4) nm with a polydispersity index (PDI) of 0.2. The absence of the tail in the distribution obtained along with a low PDI value (PDI must be smaller than 0.6–0.7 to have a reliable measurement, at least for the Zetasizer); indicate that the biogenic NPs are mostly not aggregated suggesting a monodisperse sample with a very narrow width distribution.

Nanoparticle tracking analysis (NTA) which combines single particle and ensemble approach, is based on the ability to detect individual particles using optical methods via scattered laser light. Fig. 4b displays a frame capture from the NTA instrument where the individual SeNPs are highlighted as monodisperse white spheres.

Analysis of the tracked movement using the Stokes–Einstein equation provides a size distribution shown in Fig. 4c. The NPs showed an average size of (187 ± 56) nm. The size obtained agreed well with data provided by DLS measurements (258 ± 4) nm. However, the standard deviation was lower when using DLS since the average is obtained from a large number of identical particles that make accurate and repeatable measurements. In case of NTA, the distribution of a smaller particle population (thousands rather than hundreds of thousands as in DLS) may provide results less statistically robust than with DLS.

NTA enables counting nanoparticles directly in solution, therefore it can be used for determining the number of nanoparticles present. In this study, NTA measurements of biogenic SeNPs obtained after the incubation of the strain with 100 mg L^{-1} selenium and subsequent isolation from the culture medium gave us a concentration value of $(4.67 \pm 0.30) \times 10^9$ biogenic SeNPs mL^{-1} with a relative standard deviation lower than 5%. The use of ICP-MS was employed for confirmatory measurements of the quantification data provided by NTA. It is worth noting that ICP-MS is a mass detector, therefore quantification results are provided as mass fraction of NPs. Only for those NPs with spherical morphology, uniform and of known density it is possible to directly transform quantities which are expressed in units of mass into number of nanoparticles units and vice versa. Based on that, the experimental value provides by NTA was compared with the

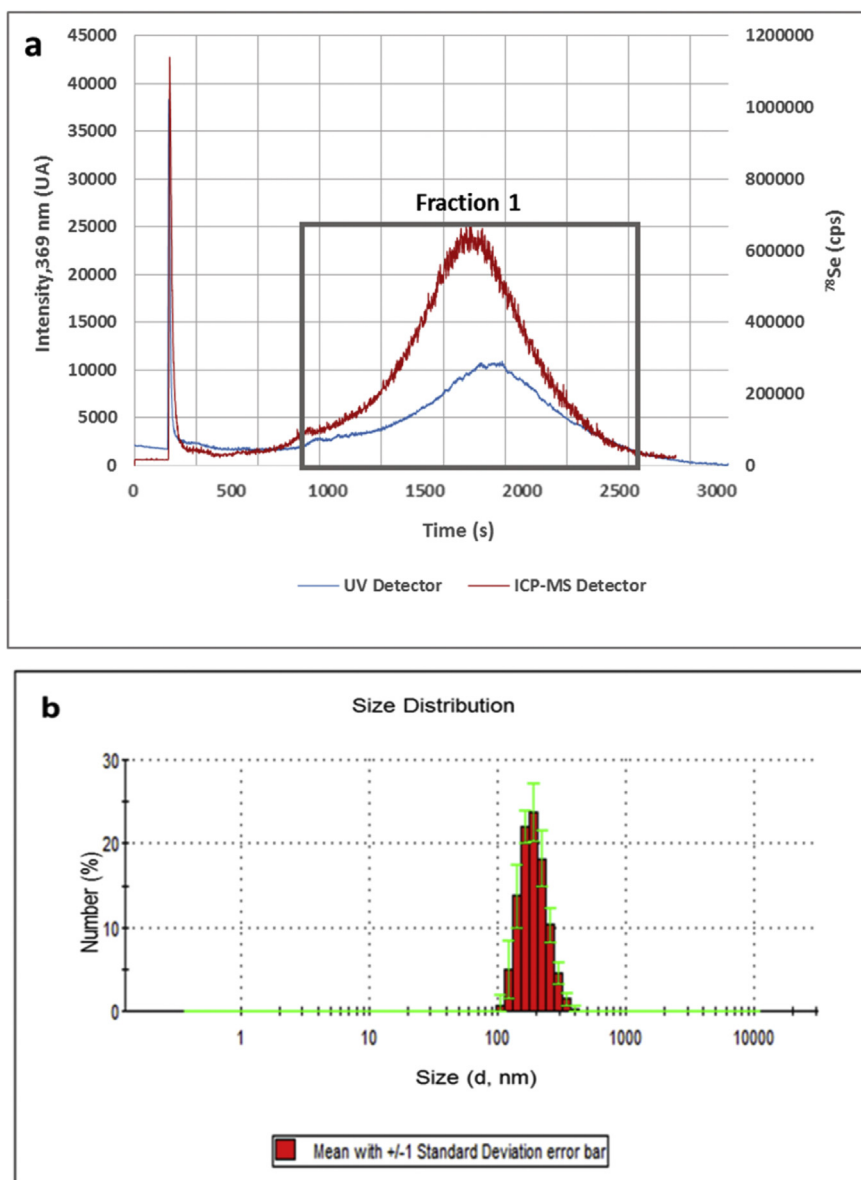


Fig. 5. a) AF⁴-DAD-ICP-MS fractograms corresponding to biogenic SeNPs isolated from the bacterial pellet. b) Size distribution found in fraction 1 collected from the fractogram and measured by DLS.

equivalent number of particles in the sample which was theoretically calculated taking into account the selenium amount obtained after digestion and analysis by ICP-MS, the density of this metal (4.79 g cm^{-3}) and the radius of nanoparticles obtained by TEM ($146 \pm 71 \text{ nm}$). In this way, the theoretical concentration of SeNPs obtained for the initial culture was $(5.10 \pm 0.08) \times 10^9 \text{ particles mL}^{-1}$. These results show a good correlation with the experimental results provided by NTA.

The isolated biogenic SeNPs were also characterized in terms of size, composition and mass fraction by AF⁴-DAD-ICP-MS and AF⁴ off line coupled to DLS following the optimized conditions listed in Table 1. A selenium -containing peak well separated from the void -volume peak appeared in the fractogram at 29 (Fig. 5). To determine the hydrodynamic size of the fractionated NPs, the fraction was collected and then analyzed by DLS. The distribution of the particle size for the Se-containing peak is shown in Fig. 5b, with an average size and a Pdl of $(247 \pm 14) \text{ nm}$ and 0.239, respectively. The results are comparable with those obtained by DLS without using

AF⁴ where an average size of $(258 \pm 4) \text{ nm}$ and a Pdl value of 0.2 was found, however an increase in the standard deviation and Pdl values was observed suggesting certain agglomeration of biogenic selenium nanoparticles during AF⁴ separation. The off-line coupling AF⁴ to ICP-MS was also used for determining the mass concentration fraction of biogenic SeNPs. For this purpose, fractions were collected from the AF⁴ system followed by ICP-MS detection. The results obtained were in line with those provided when using ICP-MS suggesting no significant losses of SeNPs in the AF⁴-ICP-MS system.

4. Conclusions

A green technology for producing selenium nanospheres homogeneous in form and size has been developed by using LAB. Among LAB species tested, *L. reuteri* was the most suitable one because of its greatest ability to survive at high levels of selenium and to accumulate the highest amount of this metalloid. The

generated SeNPs were characterized in terms of size, morphology and quantified as mass and number-based concentration by using a plethora of techniques. Characterization of SeNPs by light dispersion techniques was challenging since nanoparticles were mainly located inside bacteria cell requiring the development of a separation step that implies lysis and permeabilization of the bacterial cell wall. The size and number-based concentration data obtained by independent techniques were in good agreement. The developed methodology could be implemented for characterizing NPs in complex matrices such as biogenic nanoparticles embedded inside microbial material. This paper clearly express the need of using a multiple phasic approach for a full characterization of nanomaterials and shows a technology for producing SeNPs which combines simplicity rapidity along with the safety of the employed strains. The applicability of the proposed methodology could be extended to synthesize other metallic/non metallic nanoparticles. The biogenic SeNPs can be used isolated from the matrix or included in SeNPs enriched probiotics. The effect of SeNPs produced by lactobacilli and SeNPs-enriched probiotics on cancer metastasis prevention have been reported [29]. However, separation is always required for SeNPs characterization in order to confirm their applicability or for other SeNPs uses where SeNPs need to be isolated.

Acknowledgement

The authors thank the Spanish Commission of Science and Technology (CTQ2014-54801-C2-1-R) and the Community of Madrid/FEDER programme (S2013/ABI-3028, AVANSECAL-CM) for funding.

References

- [1] P. Mohanpuria, N.K. Rana, S.K. Yadav, Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications, *Nanopart. Res.* 10 (2008) 510–517.
- [2] K.S. Kavitha, S. Baker, D. Rakshith, H.U. Kavitha, H.C. Yashwantha Rao, B.P. Harini, S. Satish, Plants as green source towards synthesis of nanoparticles, *Int. Res. J. Biol. Sci.* 2 (2013) 66–76.
- [3] A.G. Ingale, A.N. Chaudhari, Biogenic synthesis of nanoparticles and potential applications: an eco-friendly approach, *J. Nanomed. Nanotechnol.* 4 (2013) 2.
- [4] E. Cremonini, E. Zonaro, M. Donini, S. Lampis, M. Boaretti, S. Dusi, P. Melotti, M.M. Lleo, G. Vallini, Biogenic selenium nanoparticles: characterization, antimicrobial activity and effects on human dendritic cells and fibroblasts, *Microb. Biotechnol.* 9 (6) (2016) 758–771.
- [5] A.M. Fayaz, K. Balaji, M. Girial, R. Yadav, P.T. Kalaichelvan, R. Venkatesan, Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria, *Nanomedicine* 6 (1) (2010) 103–109.
- [6] B. Zare, M.A. Faramarzi, Z. Sepehrizadeh, M. Shakibaie, S. Rezaie, A.R. Shahverdi, Biosynthesis and recovery of rod-shaped tellurium nanoparticles and their bacterial activities, *Mater. Res. Bull.* 47 (2012) 3719–3725.
- [7] E. Zonaro, S. Lampis, R.J. Turner, S.J.S. Qazi, G. Vallini, Biogenic selenium and tellurium nanoparticles synthesized by environmental microbial isolates efficaciously inhibit bacterial planktonic cultures and biofilms, *Front. Microbiol.* 6 (2015) 1–11.
- [8] S.A. Wadhvani, U.U. Shedbalkar, R. Singh, B.A. Chopade, Biogenic selenium nanoparticles: current status and future prospects, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (2016) 2555–2566.
- [9] A.K. Jha, K. Prasad, A.R. Kulkarni, Synthesis of TiO₂ nanoparticles using microorganisms, *Colloids Surfaces B Biointerface* 71 (2009) 226–229.
- [10] L. Sintubin, W. De Windt, J. Dick, J. Mast, D. van der Ha, W. Verstraete, N. Boon, Lactic acid bacteria as reducing and capping agent for the fast and efficient production of silver nanoparticles, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84 (4) (2009) 741–749.
- [11] Y. Bai, Y. Wang, Y. Zhou, W. Li, W. Zheng, Modification and modulation of saccharides on elemental selenium nanoparticles in liquid phase, *Mater. Lett.* 62 (2008) 2311–2314.
- [12] S.V. Valueva, L.N. Borovikova, V.V. Koreneva, Y.I. Nazarkina, A.I. Kipper, V.V. Kopeikin, Structural-morphological and biological properties of selenium nanoparticles stabilized by bovine serum albumin, *Russ. J. Phys. Chem. A* 81 (2007) 1170–1173.
- [13] Z. Shen-Yi, J. Zhang, H.-Y. Wang, H.-Y. Chen, Synthesis of selenium nanoparticles in the presence of polysaccharides, *Mater. Lett.* 58 (2004) 2590–2594.
- [14] O.V. Kharisova, H.V.R. Dias, B.I. Kharisov, B.O. Pérez, V.M.J. Pérez, The greener synthesis of nanoparticles, *Trends Biotechnol.* 31 (2013) 240–248.
- [15] T.P.J. Linsinger, Q. Chaudhry, V. Dehalu, P. Delahaut, A. Dudkiewicz, R. Grombe, Validation of methods for the detection and quantification of engineered nanoparticles in food, *Food Chem.* 138 (2013) 1959.
- [16] S. Wagner, S. Legros, K. Loeschner, J. Liu, J. Navratova, R. Grombe, T.P.J. Linsinger, E.H. Larsen, F. von der Kammer, T. Hofmann, First step towards a generic sample preparation scheme for inorganic engineered nanoparticles in complex matrix for detection, characterization and quantification by AF⁴ coupled to MALS and ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 30 (2015) 1286.
- [17] V. Filipe, A. Hawe, W. Jiskoot, Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates, *Pharm. Res.* 27 (5) (2010) 796–810.
- [18] D. Bartczak, P. Vincent, H. Goenaga-Infante, Determination of size- and number-based concentration of silica nanoparticles in a complex biological matrix by online techniques, *Anal. Chem.* 87 (2015) 5482–5485.
- [19] T. Linsinger, G. Roebben, D. Gilliland, L. Calzolari, F. Rossi, N. Gibson, C. Klein, JRC Reference Report EUR 25404 EN; EUR – Scientific and Technical Research Series, European Union, Luxembourg, 2012. ISSN 1831–9424, <https://doi.org/10.2787/63490>.
- [20] S. Mohammad, M. Hian, K. Lee, Recent advances in the separation and quantification of metallic nanoparticles and ions in the environment, *TRAC* 75 (2016) 183–196.
- [21] F. Laborda, E. Bolea, G. Cepri_a, M.T. Gomez, M.S. Jimenez, J. Perez-Arategui, J.R. Castillo, Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: a review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex sample, *Anal. Chim. Acta* 904 (2016) 10–32.
- [22] J. Heroult, V. Nischwitz, D. Bartczak, H. Goenaga-Infante, The potential of asymmetric flow field-flow fractionation hyphenated to multiple detectors for the quantification and size estimation of silica nanoparticles in a food matrix, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 3919–3927.
- [23] S.K. Torres, V.L. Campos, C.G. León, S.M. Rodríguez-Llamazares, S.M. Rojas, M. González, C. Smith, M.A. Mondaca, Biosynthesis of selenium nanoparticles by pantoea agglomerans and their antioxidant activity, *J. Nanoparticle Res.* 14 (2012) 1–9.
- [24] T. Pusztahelyi, S. Kovács, I. Pócsi, J. Prokisch, Selenite-stress selected mutant strains of probiotic bacteria for Se source production, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 30 (2015) 96–101.
- [25] S. Lampis, E. Zonaro, C. Bertolini, D. Cecconi, F. Monti, M. Micaroni, G. Vallini, Selenite biotransformation and detoxification by *Stenotrophomonas maltophilia* SeTeE02: novel clues on the route to bacterial biogenesis of selenium nanoparticles, *J. Hazard. Mater.* 324 (2017) 3–14.
- [26] S.D. Pophaly, R. Singh, J.K. Kaushik, S.K. Tomar, Current status and emerging role of glutathionein food grade lactic acid bacteria, *Microb. Cell Factories* 11 (2012) 114.
- [27] K. Saini, S.K. Tomar, V. Sangwan, B. Bhushan, Evaluation of Lactobacilli from human sources for uptake and accumulation of selenium, *Biol. trace Elem. Res.* 160 (3) (2014) 433–436.
- [28] G. Caggianiello, M. Kleerebezem, G. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (9) (2016) 3877–3886.
- [29] M.H. Yazdi, M. Mahdavi, E. Kheradmand, A.R. Shahverdi, The preventive oral supplementation of a selenium nanoparticle-enriched probiotic increases the immune response and lifespan of 4T1 breast cancer bearing mice, *Arzneimittelforschung* 62 (2012) 525–531.

2.4. Cuantificación *in vivo* de compuestos orgánicos volátiles de selenio liberados por bacterias expuestas a selenio con HS-SPME-GC-MS. Efecto del selenito y de las nanopartículas de selenio

In vivo quantification of volatile organoselenium compounds released by bacteria exposed to selenium with HS-SPME-GC-MS. Effect of selenite and selenium nanoparticles

Gustavo Moreno-Martín, Jon Sanz-Landaluze, María Eugenia León-González,
Yolanda Madrid

Talanta 224 (2021) 121907

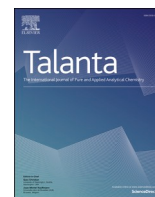
Parte de los resultados de esta investigación se presentaron en:

“XXII REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA ANALÍTICA”. Determinación y cuantificación *in vivo* de compuestos volátiles de selenio producidos por *Escherichia coli* tras su exposición a Cs-SeNPs. Valladolid, España, julio 2019. Tipo de comunicación: póster.



Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

In vivo quantification of volatile organoselenium compounds released by bacteria exposed to selenium with HS-SPME-GC-MS. Effect of selenite and selenium nanoparticles

Gustavo Moreno-Martin, Jon Sanz-Landaluze, María Eugenia León-González **, Yolanda Madrid *

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

In vivo headspace solid-phase microextraction
Selenium nanoparticles
Bacteria metabolisms
Volatile organoselenium compounds
Selenium biotransformation
Volatile mixed sulfur/selenium compound

ABSTRACT

Quantification of volatile organoselenium species released by *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), after their growth in the presence of 1 and 2 mg Se·L⁻¹ as both selenite and chitosan-modified selenium nanoparticles (Ch-SeNPs), was achieved by the application of a method based on headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and in-fiber internal standardization, combined with gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). This method consisted of an initial extraction of the released volatile organoselenium compounds on the SPME fiber, followed by the extraction of internal standard (IS), deuterated dimethyl sulfide (d⁶-DMS), on the same fiber before its desorption at the injection port of GC-MS. The results showed that the biotransformation of selenite and Ch-SeNPs into volatile organoselenium compounds was dependent on both the type of bacterial species and the chemical form of selenium (Se) administered. In this sense, *E. coli* was able to biotransform both selenite and Ch-SeNPs into dimethylselenium (DMSe) and dimethyldiselenium (DMDSe) while *S. aureus*, biotransformed selenite into DMSe and DMDSe and, Ch-SeNPs only into DMDSe. Additionally, the formation of a volatile mixed sulfur/selenium compound, dimethyl selenenyl sulfide (DMSeS), from Se in nanoparticulated form has been detected for the first time.

1. Introduction

Se is a micronutrient which plays an important role for life when present as seleno-amino acids [1,2]. In addition, Se behaves as a double-edged sword in biological systems, due to its narrow concentration range between its toxicity and essentiality [2,3]. Moreover, Se toxicity not only depends on its concentration but also on its chemical form. Among Se species, inorganic forms are more toxic than organic ones, being selenite the most toxic species [1,4,5].

Se is released into environment mainly as inorganic species, through the weathering of Se-rich rocks or anthropogenic activities like mining, smelting or agricultural irrigation [6]. However, the presence of microorganisms can alter the chemical form of selenium originally released by the above-mentioned processes as they play an important role in the morphological transformation and geochemical cycle of Se [1,2,7]. In this sense, bacterial cells are closely linked to this metalloids as they employ selenium for energy generation functions and nutritional

requirements [8]. For instance, in presence of high Se levels, bacteria through specific scavenger, uptake, storage and removal systems [3] are able to reduce Se oxyanions (selenite and selenate) to elemental selenium, and/or volatile (non)methylated Se compounds [1,2].

To date, most of the studies based on exposure of bacteria to inorganic Se species, mainly selenite, have focused on two aspects: 1) screening of the volatile Se compounds released (hydrogen selenide, methanselenol, DMSe, DMDSe or dimethyl triselenide) and/or volatile mixtures of Se-S (DMSeS, dimethyl selenenyl disulfide or dimethyl diselenenyl sulfide) [9,10] and 2) elucidation of the metabolic pathways ruling volatile selenium compounds formation [11]. Among the studies mentioned above, direct exposure of bacteria to SeNPs along with their possible transformations has been less explored. Previous studies have shown that SeNPs are biotransformed into non-volatile organoselenium compounds in lactic acid bacteria, but the volatile fraction has not been investigated yet [12,13].

HS-SPME has gained increased popularity within the analytical

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: leongon@ucm.es (M.E. León-González), ymadrid@quim.ucm.es (Y. Madrid).

community to monitor *in vivo* volatile and semi-volatile compounds released from metabolic processes [14–16]. In addition to their unique characteristics that allow a simple, efficient and fast extraction of the analytes in a wide variety of matrices and its coupling to GC-MS [17], SPME enables the extraction of low-molecular-weight compounds and short-lived, unstable and small-sized metabolites in living organisms [16,18,19]. Therefore, these features make SPME as the analytical method of choice to monitor the fate of volatile pollutants in living organisms and to investigate the accumulation and distribution of these pollutants within an individual organism as response to its exposure [17].

Among SPME headspace modalities, static mode is usually preferred instead of dynamic mode for sampling volatile compounds from living organisms as dynamic mode use a purge gas which it could alter the growing conditions of the organisms [20]. Screening of volatile organoselenium released from living systems is usually conducted in headspace mode (e.g. in plants [21,22] and yeast [23]) due to the complexity of samples [24].

SPME quantification is usually achieved by applying methodologies exclusively developed for this technique such as equilibrium extraction, exhaustive extraction and diffusion-based calibration [25]. However, the modification of traditional calibration methods based on internal calibration has enabled the *in vivo* quantification of volatiles, where the addition of the standard to the matrix is very challenging [26]. In this modification, established by Pawliszyn's group [27], the IS is pre-loaded into the SPME fiber before performing the extraction of the analytes of interest. In a previous study, Moreno-Martin et al. [20] optimized a new calibration method by modifying the method proposed by Pawliszyn's group. The method was based on HS-SPME and internal standardization in-fiber combined with GC-MS to quantify volatile organoselenium compounds released by plants exposed Ch-SeNPs.

Therefore, in this work and for first time, the quantification of volatile organoselenium compounds released *in vivo* by *E. coli* and *S. aureus* supplemented with selenium compounds (Ch-SeNPs and selenite) has been achieved. The bacterial cells selected have a great environmental interest as they are among the most prevalent species of Gram-negative and Gram-positive bacteria, respectively. For this purpose, a method optimized in a previous work [20], which is based on HS-SPME-GC-MS and internal standardization in-fiber with a deuterated standard has been applied. Furthermore, the bacterial viability in the presence of selenite and Ch-SeNPs has been also investigated.

2. Materials and methods

2.1. Synthesis and characterization of Ch-SeNPs

The synthesis and characterization of Ch-SeNPs was carried out according to a previous published report [28]. Briefly, nanoparticles were produced by chemical reduction of sodium selenite (Merck, Madrid, Spain) with ascorbic acid (Merck, Madrid, Spain) and by employing chitosan (Merck, Madrid, Spain) as coating agent. Synthesized Ch-SeNPs were purified through a dialysis process and stored in synthesis medium at 4 °C. Under these storage conditions, nanoparticles were stable up to two months. The efficiency of nanoparticle formation was calculated by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) measurements and Ch-SeNPs were characterized by transmission electron microscopy (TEM), X-ray energy dispersive spectroscopy (EDX), dynamic light scattering (DLS) and nanoparticle tracking analysis (NTA).

TEM images and DLS measurements were also performed to characterize Ch-SeNPs dispersion in bacterial culture medium Luria-Bertani broth (LB) in order to evaluate the effect of the culture medium on the morphology, size distribution and stability of Ch-SeNPs after 24 h at 37 °C and 120 rpm, in accordance with the duration of treatment. In this case, the samples were appropriately diluted in LB broth before the analysis by DLS.

2.2. Bacterial strain culture and Se supplementation. Bacterial cell viability in presence of selenium

Escherichia coli (ATCC 25922) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) (Colección Española de Cultivo Tipo (CECT), Valencia, Spain) were used to perform Se assays. The cultures were maintained on a LB agar plate at 4 °C. For inoculum preparation, a loop of culture was inoculated into 5 mL sterile LB broth in a 10 mL centrifuge tube and incubates overnight at 37 °C under stirring (120 rpm). For the Se assays, bacterial cells were diluted with sterile LB broth to reach an optical density (OD) value of 0.1 at 620 nm and inoculated into 50 mL sterile LB broth containing 0, 1 and 2 mg Se·L⁻¹, as selenite and Ch-SeNPs, in 100 mL Erlenmeyer flask. Once inoculated with Se, Erlenmeyer flasks were sealed with sterile rubber septa and bacteria were kept at 37 °C in a shaking incubator at 120 rpm for 24 h. The experimental set-up is illustrated in Fig. 1.

Bacterial viability was evaluated by the widely used method of colonies forming units (CFU·mL⁻¹) counting on plates in sterile LB agar at different levels of Se exposure (0, 1 and 2 mg Se·L⁻¹), for both selenite and Ch-SeNPs, after 24 h of cultivation. Plates were incubated at 37 °C for 24 h.

2.3. Total Se determination in bacterial cell pellet and culture medium

Total Se determination in bacterial cells supplemented with selenium and in the culture medium was performed by ICP-MS measurements after acid digestion in a 1000 W MSP microwave oven (CEM, Matthews, NC, USA). Bacterial cells were separated from the culture medium by centrifugation in an Eppendorf 5804 F34-6-38 ultracentrifuge tube at 5000 rpm for 5 min at room temperature and washed twice with Milli-Q water. Then, about 100 mg of bacterial pellet and/or 0.5 mL of culture medium were placed in an Xpress tube (volume 10 mL) and 1.0 mL of concentrated nitric acid (Merck, Madrid, Spain) and 0.5 mL of 30% (v/v) hydrogen peroxide (Panreac, Barcelona, Spain) were added. The resulting microwave digests were cooled, diluted with Milli-Q water to a 10 mL final volume, filtered through a 0.22 µm syringe Nylon filter (Scharlab, Barcelona, Spain) and analyzed. Selenium content in the control group of each bacterial species unexposed to Se was also determined. Three independent biological replicates for each concentration were made and considered in the final expression of the results.

Se content in the digests was measured by ICP-MS (Agilent 7700x, Agilent Technologies Inc., USA) by monitoring ⁷⁶Se, ⁷⁷Se and ⁷⁸Se isotopes under continuous acquisition mode. The experimental conditions were as follows: RF power of 1550 W, sample depth of 8 mm, plasma gas flow rate 12.0 L min⁻¹, Ar auxiliary gas flow rate 0.90 L min⁻¹, Micromist nebulizer with a flow rate 1.10 L min⁻¹ and a Scott type spray chamber. Se quantification was performed by external calibration with the isotope ⁷⁸Se.

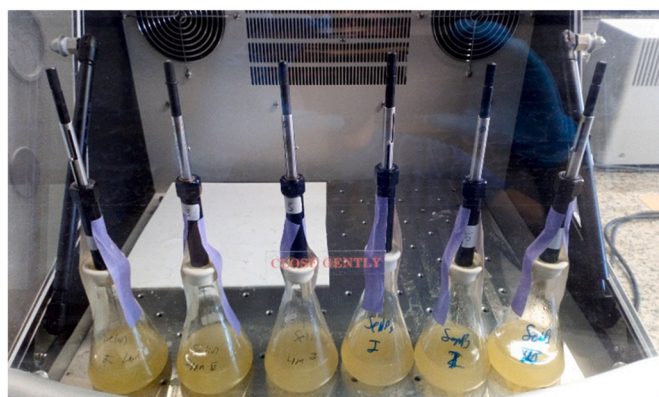


Fig. 1. HS-SPME experimental set-up for extracting volatile organoselenium compound released from *E. coli* and *S. aureus* exposed to selenite and Ch-SeNPs.

2.4. Determination of volatile organoselenium compounds by HS-SPME-GC-MS. Application to volatile organoselenium compounds released by *E. coli* and *S. aureus*

Separation and determination of DMSe, diethylselenium (DESe) and DMDSe (all of them supplied from Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) using d⁶-DMS (Merck, Madrid, Spain), as internal standard (IS), was accomplished by an analytical procedure consisting of three stages, whose optimization study is described elsewhere [20]. In this case, due to the growing conditions of *E. coli* and *S. aureus*, the extraction stage of both IS and volatile Se standards/compounds was modified and carried at 37 °C and 120 rpm, using LB broth culture medium as solvent. Briefly, in the first stage, the extraction by HS-SPME, using a 75 µm fiber coated with Carboxen/PDMS (Supelco, Bellefonte, PA, USA) of 2 mL of a standard solution prepared in LB broth and containing the three volatile organoselenium compounds during 26 min in 4 mL screw-capped vials (sealed with Teflon-lined silicon septum) (Scharlab, Barcelona, Spain) on a heating plate. Then, in the second stage, the extraction by HS-SPME of 2 mL of a standard solution containing IS at a concentration level of 10 ng S was performed using the fiber of the first stage for another 26 min on a heating plate. Finally, in the last stage, the desorption, separation and analysis of the compounds was carried out by an Agilent 7890A/5975C GC-MS (Agilent Technologies S.A., Madrid, Spain) instrument, using a polydimethylsiloxane (95%) cross linked ZB-5MS (Zebtron, Phenomenex, Madrid, Spain) capillary column (30 m × 0.25 mm ID, 0.25 µm d_i) and a temperature gradient that starts at 40 °C and reaches 200 °C. For analytes quantification, their respective response factors (RF) were calculated by considering the ratio between the chromatographic peak high of the analyte and the IS concentration with respect to the IS peak high and the analyte concentration (Eq. (1)). Besides, in SIM mode, the following fragments, referred to the mass to charge ratio (*m/z*), were employed: *m/z* 50 and 68 for d⁶-DMS, *m/z* 80, 95 and 110 for DMSe, *m/z* 80, 95, 110 and 138 for DESe and *m/z* 95, 160, 175 and 190 for DMDSe. Data were acquired using MSD ChemStation software and analyzed in a MSD ChemStation Data analysis application (Agilent Technologies S.A., Madrid, Spain). The compounds were identified through the NIST 2011 library along with the corrected retention times and fragmentation standard

$$RF = \frac{h_{\text{analyte}} \times C_{\text{IS}}}{h_{\text{IS}} \times C_{\text{analyte}}} \quad (1)$$

where *h* is the high of the chromatographic peak and *C* is the concentration.

Extraction and determination of volatile organoselenium compounds released by bacterial cells was performed after their growth in the presence of selenite and Ch-SeNPs as described above. For this purpose, the analytical procedure described above. was applied but with slightly differences in the first extraction stage. In this case, volatile organoselenium compounds released by bacteria were extracted by the fiber exposed to the headspace of the Erlenmeyer flask after 24 h of cultivation as it is shown in Fig. 1. In order to prevent memory effect from previous extractions or condensation of large analytes inside the pores of Carboxen phase, the fiber was conditioned between runs for ~5 min at 300 °C in the injection port of GC-MS. Three independent biological replicates for each concentration were made on three consecutive days.

2.5. Method validation

Validation of method performance was assessed for standard solutions, prepared in LB broth medium, considering the linearity range, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), and precision. Validation was accomplished under optimum experimental conditions described in Section 2.4.

Linear range (*n* = 6) were set at concentration between 6 and 40 ng Se for DMDSe. RF values were analyzed by least squares linear

regression, and linearity was evaluated in term of R² values. Calibration based on internal standardization in-fiber was used for quantifying the volatile organoselenium compounds in *E. coli* and *S. aureus*. However, DMSe could not be quantified as both bacteria produced a very low amount of this Se compound.

LODs were estimated at six concentration levels between 2.0 y 4.0 ng Se for DMSe and four concentration levels between 3.0 and 5.4 ng Se for DMDSe. RF values were analyzed by least squares linear regression, and LODs were determined by interpolation the *y*_{LOD} values obtained from Eq. (2) on these calibration curves while LOQs were obtained as 3.3LODs.

$$y_{\text{LOD}} = \bar{y}_b + 2t_{\alpha, \nu(1 \text{ tail})} S_{y/x} \quad (2)$$

where *y*_{LOD} is LOD signal, $\bar{y}_b$ is the intercept of calibration curve, *t*_{α,ν(1 tail)} is Student's t-test value for one tail, a probability level of 0.05 (α) and (*N* - 2) degrees of freedom (ν) and *S*_{*y/x*} is the typical error of the calibration graph.

Precision was estimated from standard solutions at different concentration levels, depending on the volatile organoselenium compound: 1 ng Se for DMSe and 10 ng Se for DMDSe while the IS concentration level was maintained at 10 ng S. Intra-day variation was evaluated by analyzing three standard solutions (*n* = 3) on the same day. Inter-day precision was similarity calculated from three successive days, by performing three injections per day (*n* = 9). Relative standard deviation (RSD, %) was taken as a measure of repeatability and intermediate precision, and it was calculated for RF of each volatile organoselenium compound.

2.6. Statistical packages

The software packages GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and Statgraphics Centurion 18 (Statgraphics Technology, The Plains, VA, USA) running under Windows 10 were employed for the statistical data evaluation.

3. Results and DISCUSSION

3.1. Synthesis and characterization of Ch-SeNPs

The synthesis of Ch-SeNPs using 0.1% chitosan and 0.054 M ascorbic acid as optimal conditions, showed a formation efficiency ≥99%. TEM analysis evidenced the presence of spherical and monodisperse nanoparticles with a mean core diameter of (50 ± 5) nm and EDX analysis confirmed the presence of Se (L_α (1.37 keV), K_α (11.22 keV), and K_β (12.49 keV)) in the detected NPs (Fig. 2a and c). DLS analysis provided an average hydrodynamic diameter of (196 ± 1) nm and a polydispersity index of 0.2 suggesting a monodisperse sample with a narrow width distribution. Finally, NTA analysis supplied an average hydrodynamic diameter of (240 ± 50) nm which agreed with DLS measurements, an average zeta potential of (−38 ± 1) mV indicating the Ch-SeNPs stability in the synthesis medium and a concentration expressed as particle number per milliliter of (3.1 ± 0.2) 10¹² corresponding to 5 mg Se·L^{−1}.

Ch-SeNPs dispersed in LB broth were also characterized by TEM and DLS to detect potential changes in their properties when they come into contact with bacterial culture medium. In TEM analysis, although the concentration of Ch-SeNPs was 5 mg Se·L^{−1} and not all of the concentration levels used in this study were tested due to the resolution of the instrument for this metalloid, no significant differences were found in terms of size, shape and agglomeration degree between synthesis medium (Fig. 2a) and LB broth (Fig. 2b). However, in DLS analysis, the complexity of the culture medium interfered in the measurements of size. Three distributions of (266 ± 10), (410 ± 9) and (621 ± 9) nm were found and an average zeta potential of (−11.4 ± 0.8) mV. Therefore, although the TEM and DLS provide complementary information, in the case of complex matrices, such as this case study, the DLS does not give

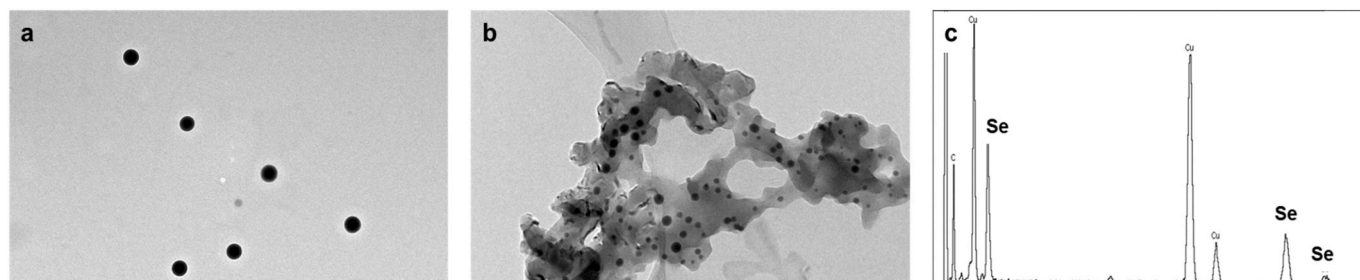


Fig. 2. TEM images of Ch-SeNPs dispersed in (a) synthesis medium and (b) LB broth culture medium after 24 h of exposure at 37 °C and 120 rpm. (c) EDX spectrum of Ch-SeNPs showing the Se absorption peaks corresponding to SeL_{α} (1.37 keV), SeK_{α} (11.22 keV), and SeK_{β} (12.49 keV).

consistent results due to matrix interference of the culture medium.

3.2. Behavior of selenium in exposed *E. coli* and *S. aureus*. Viability and accumulation

With the aim of gaining a better insight into the biotransformation of Ch-SeNPs into volatile compounds in bacteria, the accumulation of Se and the effect of this metalloid on the growth of *E. coli* and *S. aureus* was evaluated by growing both bacteria in the presence of Ch-SeNPs and selenite, for comparison purposes. First, the effect of Ch-SeNPs and selenite concentration levels on the bacterial growth was evaluated at 24 h by colony forming unit assay in plate. The data collected by colony counting, expressed as $\log(\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1})$, from both bacteria in absence and presence of Se (as Ch-SeNPs and selenite) at two levels of exposure (1 and 2 $\text{mg Se}\cdot\text{L}^{-1}$) are shown in Fig. 3a and b. For both *E. coli* and *S. aureus*, Fig. 3a evidence that there were no statistically significant differences in bacterial cell viability between bacteria exposed to selenium (1 and 2 $\text{mg Se}\cdot\text{L}^{-1}$, either for selenite or Ch-SeNPs) and control bacteria (unexposed to selenium). Therefore, the viability of *E. coli* and *S. aureus* was not affected by the Se concentration levels tested, either in the form of selenite or Ch-SeNPs. In contrast, significant differences

were found between bacterial species regardless of whether they were grown in presence or absence of selenium (Fig. 3b). These differences found in the viability between *E. coli* and *S. aureus*, may be related to the characteristic of the bacterial species tested as they are Gram-negative and Gram-positive bacteria, respectively.

Se accumulation capability of *E. coli* and *S. aureus*, after their growth in the presence of Ch-SeNPs and selenite, at two concentration levels, is shown in Fig. 3c. When both bacteria were cultured with 1 $\text{mg Se}\cdot\text{L}^{-1}$, accumulation percentages in the bacterial cell pellet of $(49.7 \pm 0.8) \%$ and $(35 \pm 5) \%$ for *E. coli* and $(39 \pm 1) \%$ and $(15 \pm 1) \%$ for *S. aureus*, were obtained by adding Se as Ch-SeNPs and selenite, respectively, being this accumulation significantly greater ($\alpha = 0.05$) when Se was added in nanoparticulated form. An increase in the concentration to 2 $\text{mg Se}\cdot\text{L}^{-1}$, caused an increment ($\alpha = 0.05$) in the percentages of accumulation in *S. aureus*, both for Ch-SeNPs ($55 \pm 3) \%$) and selenite ($(45 \pm 3) \%$), while for *E. coli* an increase was only observed in selenite ($(58.3 \pm 0.8) \%$). Moreover, this Fig. 3c shows how the accumulation of Se is also affected by the type of bacterial species and not only on the concentration of Se and its chemical form. It is important to mention that in all cases, the sum of Se concentration in the bacterial cell pellet and the culture medium was practically equal to the Se concentrations levels

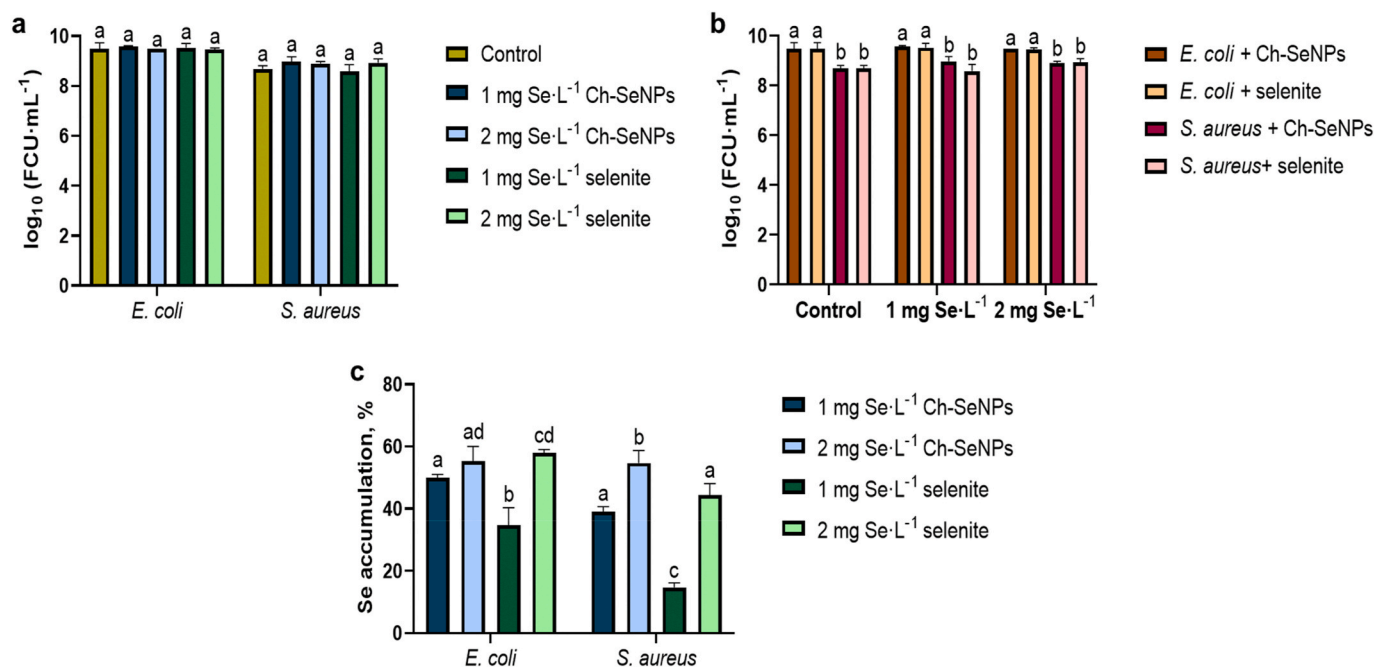


Fig. 3. Effect of selenite and Ch-SeNPs on bacterial viability and Se accumulation. Comparison of viability assays for *E. coli* and *S. aureus* after 24 h of growth in presence of 1 and 2 $\text{mg Se}\cdot\text{L}^{-1}$ (as selenite and Ch-SeNPs) depending on (a) the bacterial species and (b) Se treatments. Comparison of Se accumulation depending on (c) bacterial species after 24 h of growth with 1 and 2 $\text{mg Se}\cdot\text{L}^{-1}$ (as selenite and Ch-SeNPs). Data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation, $n = 3$. Different lowercase letters in columns indicate a statistical difference within the same group according to Multi-way ANOVA (Turkey's multiple comparisons test) ($p < 0.05$).

administered confirming that except for the production of volatile organoselenium compounds, no losses of this element occurred during sample treatment and analysis. Therefore, these results showed that after 24 h of incubation, both *E. coli* and *S. aureus* were able to accumulate a fairly high amount of Se without their viability being affected.

3.3. Validation of HS-SPME-GC-MS method

Due to the growth conditions of *E. coli* and *S. aureus*, some preliminary studies were carried out for the re-optimization of the method, already described in a previous work [20]. On the one hand, the volatile compounds released by the LB broth culture medium itself were analyzed in order to determine possible interferences with the volatile organoselenium compounds (DMSe, DESe and DMDSe) and the IS. For this purpose, SPME fiber was exposed in the headspace of an Erlenmeyer flask containing 50 mL of LB broth for 26 min at 37 °C and 120 rpm and subsequently injected into the GC-MS. Sulfur compounds such as dimethyl sulfide (DMS) and dimethyl disulfide (DMDS) were detected and identified among the compounds released from the culture medium. Moreover, another compound, which could not be identified, interfered with IS. This interference was checked by adding the IS to the LB broth medium resulting in an unresolved peak, even in the SIM analysis mode. Therefore, for the quantification of the Se compounds, as the interference mentioned above did not modify the height of the chromatographic peak of the IS, results expressed as peak height were used as shown in Eq. (1) for RF calculation. On the other hand, the compounds released by both bacteria after their growth in the absence of Se did not show any additional interference different from those described above. In addition, as in the previous work [20] and according to Pawliszyn's work [29], the quantification of the analytes released by *E. coli* and *S. aureus* was performed through a mass calibration.

Method validation was performed according to the procedure described in Section 2.5. The quality parameters for quantification of the two volatile organoselenium compounds found, including linear range, LOD, LOQ, intra-day variation and inter-day precision, are shown in Table 1. The linear range was determined by internal standard calibration and good linearity was observed for DMDSe at concentrations within the tested interval, with a determination coefficient (R^2) of 0.998. On the other hand, acceptable detection limits of 0.54 and 0.42 ng and quantification limits of 1.77 and 1.40 ng were obtained for DMSe and DMDSe respectively. Good intra-day variation was obtained for RF values, as it can be seen in Table 1. RSD values of 12 and 21% were estimated for DMSe and DMDSe in the inter-day variation, respectively. It should be noted that in order to determine each of these parameters, two holders were used with one Carboxen/PDMS fiber each. Therefore, these results also include the variability between fibers.

3.4. In vivo SPME analysis of volatile organoselenium compounds from *E. coli* and *S. aureus*

Before exposure of *E. coli* and *S. aureus* to 1 and 2 mg Se·L⁻¹ in form of selenite and Ch-SeNPs, analysis of a bacterial cell control group, grown in the absence of Se, was run by exposing the fiber for 26 min to the headspace of Erlenmeyer flasks. In both cases, apart from the interference previously indicated in Section 3.3., due to the LB broth medium, neither signals of organoselenium compounds nor the

deuterated sulfur standard were obtained. Further studies were conducted by increasing the concentration of Se exposure to 5 mg Se·L⁻¹, however quantification provided irreproducible results due to an oversaturation of the SPME fiber. This oversaturation, possibly due to an increase in the concentration of volatile compounds released by the bacteria, affected the subsequent extraction of IS and therefore the overall quantification.

Identification of organoselenium compounds released by *E. coli* and *S. aureus* in the experiments stated in Section 2.4 was based on retention time and m/z ratios. During exposure, the presence of DESe was not detected in any bacteria, regardless of the Se form and the concentration level supplemented, the DMSe production was observed in both bacteria and the formation of DMDSe was dependent on the type bacteria and Se form supplemented. Regarding the quantification process, the DMSe released by both *E. coli* and *S. aureus* after growing for 24 h in the presence of selenite and Ch-SeNPs could not be quantified since in all cases its signal was below LOD range. In contrast, the DMDSe species was quantified (from the RF and the corresponding calibration curve) in both bacteria after being exposed to different Se treatments for 24 h, as shown in Fig. 4. Fig. 4a shows how the formation of DMDSe by *E. coli* took place in the presence of both selenite and Ch-SeNPs. In addition, production levels of this organoselenium compound remains almost constant (10 ± 3) to (15 ± 3) ng Se when the concentration of Ch-SeNPs was raised from 1 to 2 mg Se·L⁻¹, respectively and remains also constant in (11 ± 1) ng Se when the Se concentration in the form of selenite was increased. In contrast, *S. aureus* only produced DMDSe when it was grown in the presence of selenite since the formation of this compound with Ch-SeNPs was not detected. In this case, the rise in the selenite concentration from 1 to 2 mg Se·L⁻¹ significantly increased the levels of this organoselenium compound from (8.5 ± 0.3) to (22.9 ± 0.1) ng Se, respectively. In addition, Fig. 4b shows how DMDSe, for the same Se concentration level, was produced in different amounts depending on the bacteria. The application of multi-way ANOVA for DMDSe formation showed significant differences between *E. coli* and *S. aureus* ($P = 0.0146$), between selenite and Ch-SeNPs ($P = 0.0000$) and between 1 and 2 mg Se·L⁻¹ ($P = 0.0001$). Therefore, all these results confirm that DMDSe production is dependent on both the Se form and the concentration level used for the culture as well as the bacterial species. The formation of DMSe and DMDSe has been investigated by other authors, in different types of bacteria exposed to selenium, from a qualitative point of view but never in a quantitative way and in none of the cases using selenium nanoparticles as selenium source. Burra et al. [2] identified these organoselenium compounds in a Gram-positive bacteria identified as *Bacillus* sp, after its growth with 96 mg L⁻¹ selenite and selenate during 48 h and its later analysis by HS-SPME-GC-MS. For their part, Eswayah et al. [10] detected the formation of DMSe and DMDSe when they analyzed by HS-GC-MS the culture of methane-oxidizing bacteria exposed to selenite (20 and 40 mg L⁻¹) and SeNPs. Finally, Swearingen et al. [9] also identified these two compounds after analyzing by HS-SPME-GC-MS the volatile fraction released by *E. coli* JM109 strain when it was grown in the presence of 19.2 mg L⁻¹ selenite and selenate.

Qualitative analysis of the sulfur compounds released by *E. coli* and *S. aureus* after 24 h of growth with Se (both with selenite and Ch-SeNPs) showed that although DMS and DMDS were released from the culture medium in the absence of bacteria, the presence of these two bacteria increased the signal ratio between DMS and DMDS with the internal

Table 1

Quality parameters of HS-SPME-GC-MS employed for determination of volatile organoselenium compounds.

Compound	LOD Linear range (ng)	LOD Calibration equation $y = ax + b$			LOD (ng)	LOQ (ng)	Linear range (ng)	Calibration equation $y = ax + b$			Intra-day variation RSD (%)	Inter-day precision RSD (%)
		a	b	R^2				a	b	R^2		
DMSe	2.0–4.0	–0.1	0.78	0.986	0.54	1.77					6	12
DMDSe	3.0–5.4	–0.18	0.080	0.997	0.42	1.40	6–40	–0.24	0.0410	0.998	6	21

^a Values obtained for 1 and 10 ng Se in form of DMSe and DMDSe, respectively.

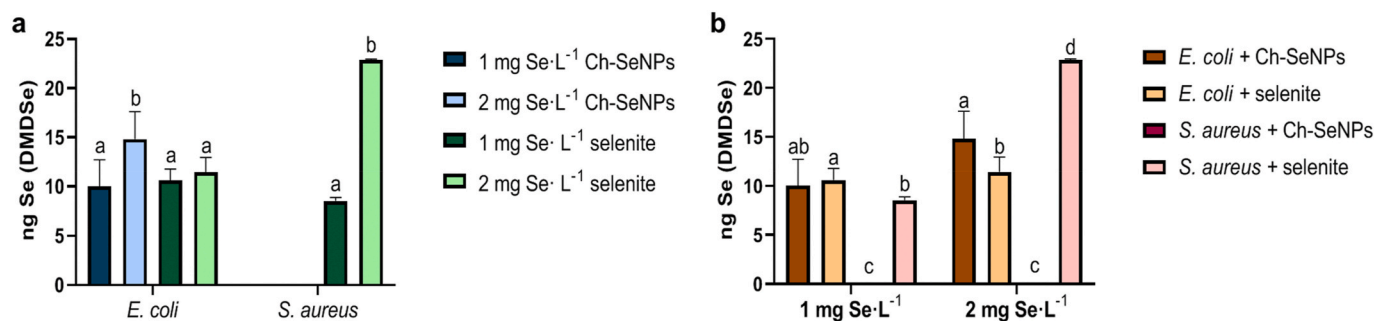


Fig. 4. Comparison of the amount of DMDSe produced by *E. coli* and *S. aureus* depending on (a) the bacterial species and (b) Se treatment, after 24 h of growth in the presence of 1 and 2 mg Se·L⁻¹, as selenite and Ch-SeNPs. Data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation, $n = 9$. Different lowercase letters in columns indicate a statistical difference within the same group according to Multi-way ANOVA (Turkey's multiple comparisons test) ($p < 0.05$).

standard, indicating that both bacteria were capable of producing both sulfur compounds. In addition, the compound dimethyl trisulfide, already found in different bacteria [30,31], was identified in *E. coli* and *S. aureus* through the analysis of its mass spectrum together with the NIST 2011 library. Many authors have shown that the culture of bacteria in the presence of Se can lead to the formation of volatile mixed sulfur/selenium compounds [9,11]. In this study both bacteria produced the compound DMSeS when they were cultured with both selenite and Ch-SeNPs. The identification of this compound is shown in Fig. 5, where the m/z ratios of the mass spectrum have been related to the corresponding DMSeS fragments.

Based on the results, both bacteria are able to incorporate the Se and transform it into volatile organoselenium compounds. These data are of interest from the environmental point of view and the obtained results opens new insights into the role of bacteria on the Se geochemical cycle, especially on the formation of less known volatile compounds. Although it is well known that bacteria are involved in the Se biogeochemical

cycle [8], until now, SeNPs have been considered only as a detoxification product when bacteria cells were grown in a media with high selenium content (mainly as selenite). However, this study shows that SeNPs are incorporated and transformed by bacteria and clearly stated that SeNPs effect on bacteria highly depends on the type of bacteria. Therefore, SeNPs can be considered as another chemical form of selenium able to enter into the bacteria as well as Se oxyanions (selenite and selenate). SeNPs naturally present in the environment could also be incorporated and biotransformed by bacteria in the same way that Ch-SeNPs, but taking into account that the coating agent that stabilizes SeNPs, both natural and engineering SeNPs, plays an important role in their further metabolism. In a previous reported work [13], the effect of three types of SeNP with different coating agents (chitosan (Ch-SeNPs), hydroxyethyl cellulose (HEC-SeNPs) and a non-ionic surfactant, surfynol (ethoxylated-SeNPs suspensions toward *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB-12 was evaluated. Negligible damage was detected by flow cytometry when bacteria were exposed to

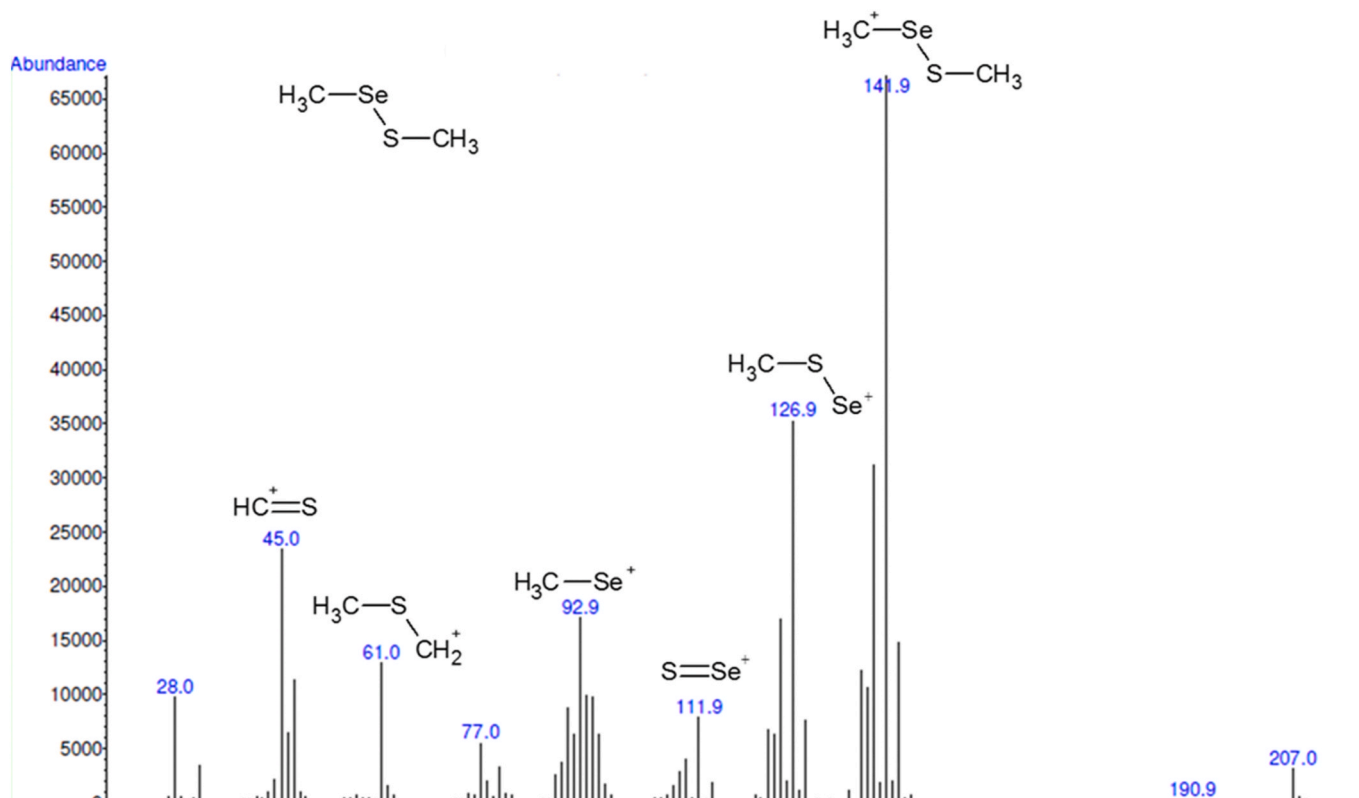


Fig. 5. Mass spectrum of DMSeS produced by *E. coli* grown with 1 mg Se·L⁻¹, as selenite, from a GC-MS chromatographic peak eluting at 6.46 min.

HEC-SeNPs or Ch-SeNPs whereas ethoxylated-SeNPs were found to be harmful nanoparticles toward bacteria [13].

4. Conclusions

This study confirms the potential of the method based on HS-SPME-GC-MS to carry out the *in vivo* quantification of volatile organoselenium compounds released by organisms that are grown in presence of different chemical forms of Se. In addition, the low levels of detection achieved with this method, makes it an appropriate analytical tool to elucidate the mechanism of Se detoxification in different organisms, such as bacteria. In the formation of these volatile species by *E. coli* and *S. aureus*, a dependence on both the bacterial species and the chemical form of selenium supplemented in the culture medium was observed. Proof of this is that *E. coli* was able to biotransform both selenite and Ch-SeNPs, at 1 and 2 mg Se-L⁻¹, into DMSe and DMDSe while *S. aureus*, under the same conditions, biotransformed selenite into DMSe and DMDSe and, Ch-SeNPs only into DMDSe. Furthermore, for the first time, not only the biotransformation of Ch-SeNPs, by *E. coli* and *S. aureus*, into volatile organoselenium compounds and their subsequent quantification has been demonstrated, but also the formation of DMSeS, a volatile mixed sulfur/selenium compound when bacteria were exposed to Se in nanoparticulated form and selenite.

Credit author statement

Gustavo Moreno Martin: Conceptualization, Methodology, Investigation, Validation Writing – original draft, Writing – review & editing; Jon Sanz- Landaluze; Conceptualization, Methodology, Supervision. Maria Eugenia de Leon-Gonzalez: Conceptualization, Methodology, Validation, Supervision, Writing – review & editing, Yolanda Madrid: Conceptualization, Methodology, Validation, Supervision, Resources, Writing – review & editing, Funding acquisition.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors thank the Spanish Commission of Science and Technology (CTQ2017-83569-C2-1-R), the Comunidad of Madrid and European funding from FSE and FEDER programs for financial support (project S2018/BAA-4393, AVANSECAL-II-CM); and the Complutense University through a pre-doctoral grant (CT42/18-CT43/18).

References

- [1] X. Zhang, W. Fan, M. Yao, C. Yang, G. Sheng, Redox state of microbial extracellular polymeric substances regulates reduction of selenite to elemental selenium accompanying with enhancing microbial detoxification in aquatic environments, *Water Res.* 172 (2020) 115538, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115538>.
- [2] R. Burra, G.A. Pradenas, R.A. Montes, C.C. Vázquez, T.G. Chasteen, Production of dimethyl triselenide and dimethyl diselenenyl sulfide in the headspace of metalloids-resistant *Bacillus* species grown in the presence of selenium oxyanions, *Anal. Biochem.* 396 (2010) 217–222, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.09.026>.
- [3] R.J. Turner, J.H. Weiner, D.E. Taylor, Selenium metabolism in *Escherichia coli*, *Biometals* 11 (1998) 223–227, <https://doi.org/10.1023/A:1009290213301>.
- [4] M.H.G. Berntsen, T.K. Sundal, P.A. Olsvik, H. Amlund, J.D. Rasinger, V. Sele, K. Hamre, M. Hillestad, L. Buttle, R. Ørnsrud, Sensitivity and toxic mode of action of dietary organic and inorganic selenium in Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Aquat. Toxicol.* 192 (2017) 116–126, <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.09.014>.
- [5] F.W. Edens, A.E. Sefton, Organic selenium in animal nutrition – utilisation, metabolism, storage and comparison with other selenium sources, *J. Appl. Anim. Nutr.* 4 (2016) 1–14, <https://doi.org/10.1017/jan.2016.5>.
- [6] K.L. Leblanc, D. Wallschlager, Production and release of selenomethionine and related organic selenium species by microorganisms in natural and industrial waters, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 6164–6171, <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05315>.
- [7] Q. Liao, P. Liang, Y. Xing, T. Huang, Y. Liu, Z. Jiang, Isolation and identification of selenium-tolerant strains from selenium-rich soil in Guangxi, *Agric. Biotechnol.* 7 (2018) 122–125.
- [8] L. C. Staicu, R.S. Oremland, R. Tobe, H. Mihara, Bacteria versus selenium: a view from the inside out, in: E.A.H. Pilon-Smits, L.H.E. Winkel, Z.-Q. Lin (Eds.), *Selenium in Plants: Molecular, Physiological, Ecological and Evolutionary Aspects*, Springer Nature, Switzerland, 2017, pp. 79–108.
- [9] J.W. Swearingen, D.P. Frankel, D.E. Fuentes, C.P. Saavedra, C.C. Vázquez, T. G. Chasteen, Identification of biogenic dimethyl selenodisulfide in the headspace gases above genetically modified *Escherichia coli*, *Anal. Biochem.* 348 (2006) 115–122, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.10.007>.
- [10] A.S. Eswayah, T.J. Smith, A.C. Scheinost, N. Hondow, P.H.E. Gardiner, Microbial transformations of selenite by methane-oxidizing bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101 (2017) 6713–6724, <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8380-8>.
- [11] A.S. Eswayah, N. Hondow, A.C. Scheinost, M. Merroun, M. Romero-González, T. J. Smith, P.H.E. Gardiner, Methyl selenol as a precursor in selenite reduction to Se/S species by methane-oxidizing bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 85 (2019) 1–13, <https://doi.org/10.1128/AEM.01379-19>.
- [12] M. Palomo-Siguero, A.M. Gutiérrez, C. Pérez-Conde, Y. Madrid, Effect of selenite and selenium nanoparticles on lactic bacteria: a multi-analytical study, *Microchem. J.* 126 (2016) 488–495, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.01.010>.
- [13] M. Palomo-Siguero, Y. Madrid, Exploring the behavior and metabolic transformations of SeNPs in exposed lactic acid bacteria. Effect of nanoparticles coating agent, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017), <https://doi.org/10.3390/ijms18081712>.
- [14] E.A. Souza Silva, S. Risticvic, J. Pawliszyn, Recent trends in SPME concerning sorbent materials, configurations and *in vivo* applications, *TrAC Trends Anal. Chem. (Reference Ed.)* 43 (2013) 24–36, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.10.006>.
- [15] É.A. Souza-Silva, E. Gionfriddo, J. Pawliszyn, A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices II. Food analysis, *TrAC Trends Anal. Chem. (Reference Ed.)* 71 (2015) 236–248, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.018>.
- [16] É.A. Souza-Silva, N. Reyes-Garcés, G.A. Gómez-Ríos, E. Boyaci, B. Bojko, J. Pawliszyn, A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices III. Bioanalytical and clinical applications, *TrAC Trends Anal. Chem. (Reference Ed.)* 71 (2015) 249–264, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.017>.
- [17] L. Bao, M. Yu, J. Pawliszyn, *In vivo* SPME for bioanalysis in environmental monitoring and toxicity, in: G. Jiang, X. Li (Eds.), *A New Paradigm for Environmental Chemistry and Toxicology*, Springer Nature Singapore Pte Ltd, Singapore, 2020, pp. 23–32.
- [18] G. Ouyang, D. Vuckovic, J. Pawliszyn, Nondestructive sampling of living systems using *in vivo* solid-phase microextraction, *Chem. Rev.* 111 (2011) 2784–2814, <https://doi.org/10.1021/cr100203t>.
- [19] M. Lashgari, V. Singh, J. Pawliszyn, A critical review on regulatory sample preparation methods: validating solid-phase microextraction techniques, *TrAC Trends Anal. Chem. (Reference Ed.)* 119 (2019) 115618, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.07.029>.
- [20] G. Moreno-Martin, J. Sanz-Landaluze, M.E. León-González, Y. Madrid, *In-vivo* solid phase microextraction for quantitative analysis of volatile organoselenium compounds in plants, *Anal. Chim. Acta* 1081 (2019) 72–80, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.06.061>.
- [21] C. Dietz, J. Sanz Landaluze, P. Ximénez-Embún, Y. Madrid-Albarrán, C. Cámara, Volatile organo-selenium speciation in biological matter by solid phase microextraction-moderate temperature multicapillary gas chromatography with microwave induced plasma atomic emission spectrometry detection, *Anal. Chim. Acta* 501 (2004) 157–167, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.09.027>.
- [22] C. Dietz, T. Pérez-Corona, Y. Madrid-Albarrán, C. Cámara, SPME for on-line volatile organo-selenium speciation, *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 467–473, <https://doi.org/10.1039/b211460g>.
- [23] C. Dietz, J.S. Landaluze, P. Ximénez-Embún, Y. Madrid-Albarrán, C. Cámara, SPME-multicapillary GC coupled to different detection systems and applied to volatile organo-selenium speciation in yeast, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 260–266, <https://doi.org/10.1039/b308544a>.
- [24] B. Vriens, M. Mathis, L.H.E. Winkel, M. Berg, Quantification of volatile-alkylated selenium and sulfur in complex aqueous media using solid-phase microextraction, *J. Chromatogr., A* 1407 (2015) 11–20, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.06.054>.
- [25] G. Ouyang, J. Pawliszyn, A critical review in calibration methods for solid-phase microextraction, *Anal. Chim. Acta* 627 (2008) 184–197, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.08.015>.
- [26] W. Zhao, G. Ouyang, J. Pawliszyn, Preparation and application of in-fibre internal standardization solid-phase microextraction, *Analyst* 132 (2007) 256–261, <https://doi.org/10.1039/b612604a>.
- [27] Y. Wang, J. O'Reilly, Y. Chen, J. Pawliszyn, Equilibrium in-fibre standardisation technique for solid-phase microextraction, *J. Chromatogr., A* 1072 (2005) 13–17, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.12.084>.
- [28] G. Moreno-Martin, J. Sanz-Landaluze, M.E. León-González, Y. Madrid, Insights into the accumulation and transformation of Ch-SeNPs by *Raphanus sativus* and *Brassica juncea*: effect on essential elements uptake, *Sci. Total Environ.* 725 (2020) 138453, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138453>.

- [29] J. Pawliszyn, *Handbook of Solid Phase Microextraction*, first ed., Elsevier Inc., Waltham, 2012.
- [30] N. Zhao, C. Zhang, Q. Yang, B. Yang, W. Lu, D. Li, X. Liu, F. Tian, H. Zhang, W. Chen, Multiple roles of lactic acid bacteria microflora in the formation of marker flavour compounds in traditional Chinese paocai, *RSC Adv.* 6 (2016) 89671–89678, <https://doi.org/10.1039/c6ra12474g>.
- [31] I.A. Ratiu, T. Ligor, V. Bocos-Bintintan, H. Al-Suod, T. Kowalkowski, K. Rafińska, B. Buszewski, The effect of growth medium on an *Escherichia coli* pathway mirrored into GC/MS profiles, *J. Breath Res.* 11 (2017), <https://doi.org/10.1088/1752-7163/aa7ba2>.

2.5. Transformación metabólica del selenito y las nanopartículas de selenio por *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* utilizando técnicas basadas en HPLC/MS

Metabolic transformation of selenite and selenium nanoparticles by Escherichia coli and Staphylococcus aureus using HPLC/MS-based techniques

Gustavo Moreno-Martín, Elena Espada-Bernabé, María Eugenia León-González,
Yolanda Madrid

Analytica Chimica Acta (enviado)

Analytica Chimica Acta

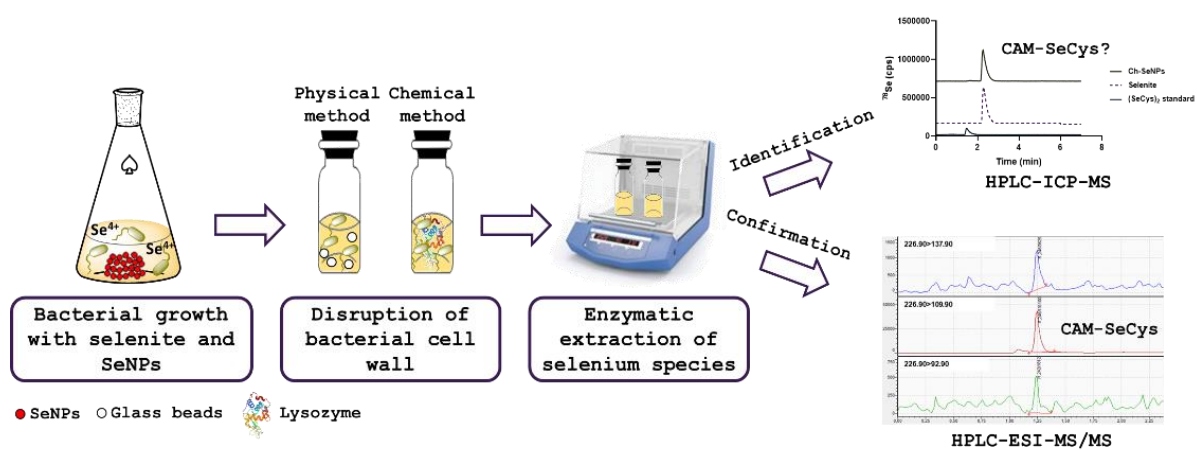
Metabolic transformation of selenite and selenium nanoparticles by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* using HPLC/MS-based techniques

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Full Length Article
Section/Category:	ATOMIC SPECTROMETRY
Keywords:	selenium nanoparticles; selenium speciation; selenium biotransformation; seleno-aminoacids; selenium metabolism in bacteria; selenocysteine
Corresponding Author:	Yolanda Madrid, Dr Complutense University, Faculty of Chemistry Madrid, SPAIN
First Author:	Gustavo Moreno-Martin
Order of Authors:	Gustavo Moreno-Martin Elena Espada-Bernabé Maria Eugenia León-González, Dr. Yolanda Madrid, Dr
Manuscript Region of Origin:	SPAIN
Abstract:	The application of selenium nanoparticles (SeNPs) in different sectors could lead to their presence in the environment and their subsequent interaction with living systems such as microorganisms. Due to the scarce knowledge about the impact of SeNPs on bacterial populations, the main objective of this work was focused on evaluating the transformations of SeNPs and selenite in <i>Escherichia coli</i> and <i>Staphylococcus aureus</i>, bacteria of environmental interest. For this purpose, an analytical methodology based on bacteria cell wall disruption, carbamidomethylation, enzymatic hydrolysis and HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS/MS measurements was developed. Once verified by transmission electron microscopy and dynamic light scattering measurements that the bacterial culture medium and the growth conditions did not affect the size, morphology, and aggregation state of these nanoparticles, both bacteria were cultured in the presence of chitosan modified SeNPs (Ch-SeNPs) and selenite at 0, 1 and 2 mg-Se L⁻¹ for 24 h at 37 °C and 120 rpm. Once incubated, selenium species were enzymatically extracted from bacteria by using protease after bacterial cell disruption. Two procedures to disrupt the bacterial cell wall, an enzymatic disruption employing lysozyme and a physical one using glass beads, and three incubation times with protease (24, 48 and 72 h) were tested. Enzymatic disruption followed by protease treatment was most effective by providing extraction percentages higher than 96% at 24 h of incubation whereas the mechanical disruption with glass beads gave percentages around 60%, but only at 72 h of incubation. Analysis of the extracts by HPLC-ICP-MS showed a strong influence of incubation time on selenium chromatographic profile. Selenocysteine was the only Se species identified in both bacteria representing a 80% of total selenium added. The confirmation of the Se species identity was carried out after cell wall disruption, carbamidomethylation, enzymatic hydrolysis with protease and HPLC-ESI-MS/MS measurements. No significant differences were found between the metabolic pathway of both forms of selenium.
Suggested Reviewers:	Zoyne Pedrero Zayas zoyne.pedrezayas@univ-pau.fr She has expertise in Se speciation Rosa Rodriguez Martin-Doimeadios RosaCarmen.Rodriguez@uclm.es She has expertise in nanoparticles characterization Heidi Goenaga-Infante Heidi.Goenaga-Infante@lgcgroup.com

	She has expertise in nanoparticles characterization and selenium speciation
	Josefa Barrero
	Josefa.BARRERO@ec.europa.eu She has expertise in nanoparticles characterization

Graphical Abstract



HIGHLIGHTS

- SeNPs in the environment could interact with bacterial populations.
- SeNPs transformation by bacteria was assessed by HPLC/MS- based techniques
- Lysozyme and protease incubation of 48- 72 h gave best Se species extraction.
- SeNPs and selenite are mostly transformed into SeCys by *E. coli* and *S. aureus*.
- SeNPs behave as Selenite in bacteria cells.

Metabolic transformation of selenite and selenium nanoparticles by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* using HPLC/MS-based techniques

Gustavo Moreno-Martín*, Elena Espada-Bernabé, María Eugenia León-González, Yolanda Madrid*

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, Spain

*Corresponding Authors:

Prof. Yolanda Madrid Albarrán (E-mail: ymadrid@ucm.es)

Gustavo Moreno Martín (E-mail: gusmoren@ucm.es)

Dept. of Analytical Chemistry

Faculty of Chemistry

Universidad Complutense de Madrid

E-28040 Madrid, Spain

Phone: ++0034913945145

Fax: ++0034913944329

ABSTRACT

The application of selenium nanoparticles (SeNPs) in different sectors could lead to their presence in the environment and their subsequent interaction with living systems such as microorganisms. Due to the scarce knowledge about the impact of SeNPs on bacterial populations, the main objective of this work was focused on evaluating the transformations of SeNPs and selenite in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, bacteria of environmental interest. For this purpose, an analytical methodology based on bacteria cell wall disruption, carbamidomethylation, enzymatic hydrolysis and HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS/MS measurements was developed. Once verified by transmission electron microscopy and dynamic light scattering measurements that the bacterial culture medium and the growth conditions did not affect the size, morphology, and aggregation state of these nanoparticles, both bacteria were cultured in the presence of chitosan modified SeNPs (Ch-SeNPs) and selenite at 0, 1 and 2 mg-Se L⁻¹ for 24 h at 37 °C and 120 rpm. Once incubated, selenium species were enzymatically extracted from bacteria by using protease after bacterial cell disruption. Two procedures to disrupt the bacterial cell wall, an enzymatic disruption employing lysozyme and a physical one using glass beads, and three incubation times with protease (24, 48 and 72 h) were tested. Enzymatic disruption followed by protease treatment was most effective by providing extraction percentages higher than 96% at 24 h of incubation whereas the mechanical disruption with glass beads gave percentages around 60%, but only at 72 h of incubation. Analysis of the extracts by HPLC-ICP-MS showed a strong influence of incubation time on selenium chromatographic profile. Selenocysteine was the only Se species identified in both bacteria representing a 80% of total selenium added. The confirmation of the Se species identity was carried out after cell wall disruption, carbamidomethylation, enzymatic hydrolysis with protease and HPLC-ESI-MS/MS measurements. No significant differences were found between the metabolic pathway of both forms of selenium.

Keywords: selenium nanoparticles, selenium speciation, selenium biotransformation, seleno-amino acids, selenium metabolism in bacteria, selenocysteine

1. Introduction

Selenium is considered an essential trace element for living organisms as it is required for the biosynthesis of selenoproteins [1,2]. However, it has a dual behavior in biological systems, as the concentration range between its toxicity and its essentiality is very narrow [3,4]. In addition, selenium toxicity is dependent on both its chemical form and its concentration level, being inorganic forms and in particular selenite more toxic than organics ones [5–7]. In recent years, selenium nanoparticles (SeNPs), considered as a new selenium specie, has increased their use for many applications such as fertilizer [8], nutraceutical [9], absorbent for the removal of heavy metals [10], among others. This growing interest is mainly due to their unique properties like high biological activity, bioavailability, high particle dispersion, large surface area, and lower toxicity than other organic and inorganic selenium species [11,12].

The main sources of Se in terrestrial and aquatic ecosystems are anthropogenic activities. Agricultural runoff, sewage water, uncontrolled and unmanaged mining procedures for phosphates and metal ores, and effluents from oil refineries are responsible for selenium contamination in the terrestrial and aquatic environment [13]. Moreover, the increasing applications of SeNPs can lead them to reach the environment, coexisting with the rest of the chemical forms of selenium and interacting with different biological systems [14]. On the other hand, SeNPs can also be formed in wastewater treatment plants. Inorganic selenium present in wastewater can be treated in activated sludge systems, where this element is removed by the formation of SeNPs, which are trapped in the biomass used later as fertilizer.

Among the different terrestrial and aquatic microorganisms with which selenium can interact, bacteria are of special interest as they greatly contribute to the interchange and formation of selenium species through the geochemical cycle of selenium [15,16]. For instance, in presence of high selenium concentration levels, bacteria can reduce selenite and selenate (selenium oxyanions) to elemental selenium nanoparticles and, volatile and non-volatile selenium compounds through specific scavenger, uptake, storage, and removal systems [3–5].

To date, most studies evaluating the effect of inorganic selenium, mainly selenite, on different bacterial species have been interested in determining parameters such as toxicity, accumulation, and biotransformation of these Se species [17–20]. Martínez et al. [21] reported that different species of lactic acid bacteria, exposed to selenite, were able to accumulate and biotransform selenium mainly into selenocysteine when exposed to selenite, without affecting bacteria viability.

According to the existing literature related to SeNPs and bacteria, studies have focused mainly on the biogenic synthesis of SeNPs as a detoxification mechanisms when bacteria are exposed to high levels of selenite [22–24]. However, very little data on the transformation of SeNPs when exposed to bacteria have been reported. In a previous work, we demonstrated that *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) were able to accumulate and transform SeNPs into volatile selenium compounds being these volatile compounds dependent on the chemical form of selenium supplemented and the bacterial species [25]. On the other hand, Palomo-Siguero et al. [26] found that *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB-12 was able to transform SeNPs stabilized with different coatings into selenocysteine (SeCys), selenite, selenomethionine (SeMet) and selenate.

Therefore, considering the increase presence of SeNPs in the environment and the scarce knowledge about their impact on bacterial species, the main goal of the current work was focused on evaluating the metabolic transformation of SeNPs when interact with *E. coli* and *S. aureus*. These bacteria cells were selected due to their environmental interest, since they are among the most prevalent species of Gram-negative and Gram-positive bacteria, respectively. For achieving this goal, a selenium species extraction procedure from the bacteria culture was developed followed by the application of different analytical techniques. Transmission electron microscopy (TEM) and dynamic light scattering (DLS) were used to characterize the size, shape and aggregation state of chitosan modified SeNPs (Ch-SeNPs) in the bacterial culture medium. The optimization of the enzymatic extraction of selenium species, employing two procedures of bacterial cell wall disruption, was performed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Selenium transformation was evaluated by using high performance liquid chromatography (HPLC) online coupled to ICP-MS (HPLC-ICP-MS) and HPLC- electrospray tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS).

2. Materials and methods

2.1. Synthesis and characterization of selenium nanoparticles modified with chitosan.

The synthesis and characterization of Ch-SeNPs was carried out according to a previous published report [25]. Briefly, nanoparticles were produced by reducing sodium selenite (Merck, Madrid, Spain) in the presence of ascorbic acid (Merck, Madrid, Spain) and employing chitosan (Merck, Madrid, Spain) as stabilizing agent. The Ch-SeNPs were then purified by dialysis and stored in the synthesis medium at 4 °C for up 2 months. The formation efficiency of nanoparticles was calculated by ICP-MS measurements and Ch-SeNPs were characterized by dynamic light scattering

(DLS), TEM, X-ray energy dispersive spectroscopy (EDX) and nanoparticle tracking analysis (NTA). Ch-SeNPs were dispersed in bacterial culture medium Luria-Bertani broth (LB) and characterized by TEM and DLS to evaluate the effects of LB and bacterial growth conditions (24 h at 37 °C and 120 rpm) on their size distribution, morphology and stability.

2.2. Bacterial strain growth in the presence of selenium.

E. coli (ATCC 25922) and *S. aureus* (ATCC 29213) (Colección Española de Cultivo Tipo (CECT), Valencia, Spain) were aerobically grown in LB broth at 37 °C in a shaking incubator at 120 rpm for 24 h in the presence of sodium selenite and Ch-SeNPs at 0, 1 and 2 mg Se·L⁻¹. Bacterial suspensions were diluted with sterile LB broth to reach an optical density value of 0.1 at 620 nm before their culture into 50 mL sterile LB broth containing the different chemical forms of selenium.

2.3. Enzymatic extraction of selenium species

To evaluate the capability of both bacterial species to transform selenite and Ch-SeNPs into seleno-amino acids, bacterial cell pellets were analyzed by HPLC-ICP-MS after enzymatic extraction of selenium species with protease and by using two different procedures of bacterial cell wall disruption. The composition of the buffer solution used to adjust the pH was dependent on the bacterial species: for Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli*, TAE buffer pH 7.0 (40 mM Tris; 20 mM acetic acid and 1 mM EDTA) was selected, while for Gram-positive bacteria like *Staphylococcus aureus*, Tris-HCl buffer pH 7.0 was chosen.

Two procedures to disrupt bacteria cell wall were employed before treatment with protease. In the first one, 0.050 g of bacteria cell pellet was mixed with 600 µL of 10 mg mL⁻¹ lysozyme (Merck, Madrid, Spain) in 40 mM Tris-HCl buffer or TAE buffer and incubated at 37 °C, 120 rpm for 3 h. Then, cell suspension was sonicated with an ultrasonic probe (Sonoplus ultrasonic homogenizer equipped with a 3 mm diameter titanium microtip, Berlin, Germany) using 6 cycles of 50 s at 60% of ultrasound amplitude. Afterwards, 400 µL of 2 mg mL⁻¹ non-specific protease *Streptomyces griseus* (Protease XIV) (Merck, Madrid, Spain) in 40 mM Tris-HCl buffer or TAE buffer was added and incubated for 24, 48 and 72 h at 37 °C and 120 rpm. Finally, mixture was centrifugated at 8700 rpm for 15 min and the supernatant was collected.

In the second one, bacterial cells were disrupted mechanically by using 0.5 mm glass beads (Merck, Madrid, Spain) and adapting the procedure described by Gomez-Gomez et al. [27]. In this sense, 0.050 g of bacteria cell pellet was mixed with 1 mL of 2 mg mL⁻¹ Protease XIV and 734 mg of

glass beads (500 μL of diameter) in 40 mM Tris-HCl buffer or TAE buffer and in an Eppendorf tube. Afterwards, the cell suspension was submitted to 5 min vortex agitation followed by 10 min of sonication by means of an ultrasonic bath (Elma, Frechen, Germany). The procedure was repeated twice for *Escherichia coli* and six times for *Staphylococcus aureus* to disrupt the bacterial cells. Then, the mixture was incubated for 24, 48 and 72 h at 37 °C and 120 rpm. Finally, cell debris and unbroken bacterial cell were removed by centrifugation at 8700 rpm for 15 min and the supernatant was collected.

Selenium concentration in the resulting extracts was determined by ICP-MS (Agilent 7700x, Agilent Technologies Inc., USA). Analyses were performed by monitoring ^{76}Se , ^{77}Se and ^{78}Se isotopes, and by employing RF power of 1550 W, sample depth of 8 mm, plasma gas flow rate 12.0 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, auxiliary gas flow rate 0.90 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ and micromist nebulizer with a flow rate 0.99 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Selenium quantification was performed by external calibration with the isotope ^{78}Se . Statistical analysis of data based on multifactorial ANOVA was performed to evaluate the influence of extraction procedure, chemical form of selenium supplemented, incubation times and bacterial species on the extraction efficiency of selenium species. The software package Statgraphics 19 running under Windows 10 was used for this statistical analysis.

Three biological replicates for each selenium concentration and chemical form were made and an evaluation of selenium species in lysozyme and Protease XIV was also performed to check impurities.

2.4. HPLC-ICP-MS analysis

Selenium species in different enzymatic extracts were analyzed by HPLC-ICP-MS after their extraction with the procedures above described. The HPLC unit consisted of a PU-2089 HPLC pump (JASCO, Tokyo, Japan) fitted with a six-port injection valve (model 7725i, Rheodyne Rohner Park, CA, USA) and with an injection loop whose volume varied depending on the chromatographic column selected. The extracts were run through a Hamilton PRP-X100 column (250 x 4.1 mm, 10 μm) with an anion exchange mechanism and a 100 μL injection loop. The mobile phase for the chromatographic separation consisted of 10 mM citric acid (Merck, Madrid, Spain) at pH 5.0 adjusted with ammonia and 2% methanol (Scharlab, Barcelona, Spain). The elution mode was isocratic with a flow rate of 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The outlet of the column was connected directly into the micromist nebulizer of the ICP-MS with PEEK tubing. Analyses were performed by ICP-MS in time resolved analysis mode by using the experimental conditions described in the Section 2.3.

After chromatographic separation, selenium species in samples were identified by comparing their retention time with the standard solutions: SeMet (Merck, Madrid, Spain), selenocystine ((SeCys)₂, Merck, Madrid, Spain), selenomethylselenocysteine (SeMetSeCys, Merck Madrid, Spain), sodium selenite and sodium selenate (Merck, Madrid, Spain). Selenium quantification was performed by external calibration with the isotope ⁷⁸Se.

2.5. Proteolytic digestion for SeCys extraction

A carbamidomethylation procedure was applied for preserving SeCys integrity [21,28] before enzymatic extraction. In this case, Tris-HCl buffer pH 7.5 or TAE buffer pH 7.0 were also used according to bacterial species. 0.050 g of bacteria cell pellet was suspended in 1 mL of 0.1 M Tris-HCl buffer or TAE buffer and incubated for 1 h at 37 °C without shaking. Then, 60 µL of 0.2 M dithiothreitol (DTT, Merck, Madrid, Spain) were added in the dark to break the Se-Se, S-S and Se-S bonds followed by alkylation of cysteine and selenocysteine residues with 100 µL of 0.5 M solution iodoacetamide (IAM, Merck, Madrid, Spain). In each step, the mixture was incubated for 1.5 h at 37 °C without shaking. Afterward, a fresh 400 µL aliquot of the DTT solution was added and the mixture was incubated at 37 °C, 120 rpm for 1.5 h to remove the excess of IAM. After carbamidomethylation, sample was submitted to the first enzymatic extraction procedure describe in the Section 2.3 (lysozyme plus protease). Finally, the extract obtained after enzymatic extraction was analyzed by HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS/MS Three biological replicates for each selenium concentration and chemical form were made and an evaluation of selenium species in DTT and IAM was also performed to check impurities.

2.6. Identification and confirmation of SeCys by HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS/MS

The formation of carbamidomethyl-SeCys (CAM-SeCys) was evaluated by HPLC-ICP-MS. Analysis of final extract was performed with a Phenomenex Kinetex EVO C18 column (150 x 3.0 mm, 5 µm) with a reversed phase mechanism and a 20 µL injection loop. The mobile phase consisted of 0.1% formic acid at pH 3.2 and 0.5% methanol. The elution mode was isocratic with a flow rate of 0.5 mL·min⁻¹. The outlet of the column was also connected directly into the micromist nebulizer of the ICP-MS with PEEK tubing. The operating and measurement conditions are described in the Section 2.4.

The confirmation of the identity of CAM-SeCys was carried out by HPLC-ESI-MS/MS. Analysis of final extract was performed with a Phenomenex Kinetex EVO C18 column. A Shimadzu LC-MS-8030

triple quadrupole system (Shimadzu Scientific Instrument, Columbia, MD, USA) equipped with a Nexera LC-30AD solvent delivery unit, a Nexera Sil 30 AC autosampler with temperature-controlled tray and a CTO-20AC column oven. The analyses were performed at room temperature, using a mixture of 0.1% formic acid aqueous solution at pH 3.2 and 0.5% methanol as mobile phase. Isocratic elution mode was performed applying a flow rate of 0.50 mL min⁻¹ and using a 10 µL injection loop. The rest of the operating conditions are described in Moreno-Martín et al. [29], setting in this case the collision energy voltage at 20 eV.

Multiple reaction monitoring (MRM) transition were acquired of fraction collected from the chromatographic column to obtain the available transitions for CAM-SeCys and confirm its formation by *E. coli* and *S. aureus* after their exposure to selenite and SeNPs. As precursor ion, [M + H]⁺ was selected and the detection was carried out in MRM mode, with a dwell time of 100 ms, by monitoring nine selective transition for this specie.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of selenium nanoparticles modified with chitosan

Nanoparticles, whose synthesis showed a formation efficiency $\geq 99\%$, were characterized by a wide variety of techniques. TEM images (Fig. 1a) evidence the presence of nanoparticles of spherical morphology with a mean core diameter of (50 ± 5) nm, calculated from > 300 particles observed from different micrographs. EDX analysis coupled to this microscope confirmed the presence of selenium (L_{α} (1.37 keV), K_{α} (11.22 keV) and K_{β} (12.49 keV)) in the nanoparticles. Analysis of hydrodynamic diameter by DLS and NTA showed no significant differences, providing mean values of (196 ± 1) nm and (250 ± 50) nm, respectively. Moreover, NTA analysis supplied an average zeta potential of (-38 ± 1) mV indicating the nanoparticles stability in the synthesis medium and a particle number concentration of $(3.1 \pm 0.2) \cdot 10^{12}$ particles mL⁻¹ corresponding to 5 mg Se L⁻¹.

Ch-SeNPs dispersed in LB broth were also characterized by TEM and DLS to detect potential changes in their properties when they are exposed to bacterial culture medium. No significant differences in size, shape and agglomeration degree between nanoparticles dispersed in LB broth (Fig. 1b) and pristine nanoparticles (Fig. 1a) were detected by TEM. However, three size distributions of (266 ± 10) , (410 ± 9) and (621 ± 9) nm and an average zeta potential of (-11.4 ± 0.8) mV were obtained by DLS analysis. The complexity of the culture medium greatly affects the measurements of size and stability when using DLS technique.

3.2. Selenium extraction and determination by ICPMS and HPLC-ICP-MS

The effect of selenite and Ch-SeNPs on the viability of *E. coli* and *S. aureus* and the accumulation of both chemical forms by these bacterial species were evaluated at 24 h in a previous publish report [25]. The growth of both bacteria in the absence of selenium showed no significant differences with respect to their culture in the presence of 1 and 2 mg-Se L⁻¹ added as selenite and Ch-SeNPs.

After proving that bacterial cells were able to accumulate selenium supplemented in ionic and nanoparticulate form without affecting their viability, we carried out selenium species extraction from bacterial cells. It is a matter of fact that the quantity of selenium obtained from the bacterial cells is greatly influenced by the extraction method selected [30]. Among different extraction procedures for selenium species, enzymatic hydrolysis has been proved to be more efficient than aqueous extraction and acid hydrolysis in terms of recovery [31–33]. Protease XIV is usually employed for performing the hydrolysis of peptide bonds as it is composed of at least three proteolytic active substances, such as extracellular serine protease [31]. However, different studies [26,31] have shown that in bacteria it is necessary to disrupt the bacterial cell wall before Se species extraction with protease. Consequently, in the current study two protocols enzymatic cell disruption using lysozyme and mechanical disruption with glass beads were tested. Lysozyme was selected for increasing selenocompound recovery through the hydrolysis of 1,4-betalinkages between N-acetylmuramic acid and N-acetyl-D-glucosamine residues in the peptidoglycan layer which is present in most bacterial extracellular cell wall. The results shown in Table 1 reveal that a mechanical disruption of the bacterial wall required an incubation time with Protease XIV of 72 h to achieve a selenium species extraction efficiency of 60% in both *E. coli* and *S. aureus*. Increasing the incubation time enhanced the extraction efficiency thirtyfold, from 2% (24 h) to 60% (72 h). However, when the disruption was performed with lysozyme, an extraction efficiency higher than 95% was obtained at all incubation times (24, 48 and 72 h) and for both bacteria. These results agree with the literature, where selenium-recovery efficiencies attained using this procedure were higher than 90% [26,30].

A multifactorial ANOVA analysis was performed to jointly evaluate the influence of extraction procedure, chemical form of selenium supplemented, incubation time and bacterial specie on extraction efficiency. Fig. 2a shows that the extraction of selenium species was only significantly affected (p-value less than 0.05) by the procedure extraction and the incubation time, both with a p-value 0.000. In addition, this statistical analysis also revealed the existence of a secondary effect,

i.e., statistically significant interactions (p-value less than 0.05) between both factors, showing that the relationship between incubation time and the process based on mechanical disruption in combination with protease was exponential, while with lysozyme and protease this relationship remained constant (Fig. 2b) which agree with the experimental results obtained.

These findings showed that the pre-treatment of the bacteria with lysozyme allowed a better performance of Protease XIV to extract selenium species in a faster and quantitative way compared to the treatment with beads. The extracts for both bacterial species grown with selenite and Ch-SeNPs at 0, 1 y 2 mg·Se L⁻¹ were further analyzed by HPLC-ICP-MS after 24, 48 and 72 h of incubation with protease. The separation of selenium species was carried out using the PRP-X100 column, an anion exchange chromatographic column widely used in the speciation of this element [34–37].

The chromatograms of selenium species extracted with the two extraction methods after 72 h of incubation with protease corresponding to *Escherichia coli* grown in the presence of 1 mg·Se L⁻¹ in form of selenite and Ch-SeNPs are shown in Figs. 3a and 3b. All these chromatograms were run until the complete elution of all the selenium species. Although the extraction of the species was quantitative from 24 to 72 h using the method based on the enzymatic disruption of the bacterial wall, the Fig. 3a show a variation of selenium chromatographic profile with the incubation time applied. Furthermore, this figure reveals that there were no significant differences between selenite and Ch-SeNPs, since the selenium species produced by *E. coli* were the same, regardless of the chemical form of selenium used for its growth. After 24 h of enzymatic incubation, the identification of selenium species was difficult to perform due to the complex chromatographic profile obtained. Among all the species shown in the chromatogram, only SeCys could be identified with the first selenium-containing peak eluted around 2 min by comparing its retention time with the (SeCys)₂ standard and by spiking experiments with this standard. However, at 48 and 72 h of enzymatic incubation the chromatographic profile of the extracted selenium species was simplified by obtaining 2 and 1 peak, respectively. In both cases the first peak was again identified with SeCys by matching its retention time with (SeCys)₂ and by performing spiking experiments. These variations of selenium species over time may be associated with the activity of the enzymes, which depending on the complexity of the matrix will require a determined optimum time of action.

Fig. 3b shows selenium speciation after mechanical disruption of the bacterial wall. No significant differences were observed between selenite and SeNPs with respect to selenium species and a variation of the selenium chromatographic profile was also observed. Although the extraction

was not quantitative, it was possible to identify the second peak with SeCys species. The increase in the extraction percentage from 24 to 72 h allowed a better identification of the species, as well as obtaining a better-resolved chromatographic profile but the identification of Se-containing-peaks was still difficult even at 72 h, being SeCys the only species identified with the third selenium-containing peak.

In the case of *S. aureus*, the chromatograms of the selenium species extracted with the two bacteria cell wall disruption protocols showed similar behavior to that observed for *E. coli*, as shown in Figs. 3c and 3d. The Se species formed by this bacterial species were independent of the chemical form of selenium present in the culture medium, selenite and Ch-SeNPs, and the chromatographic profile of the species changed with the incubation time employed. Moreover, extraction based on enzymatic disruption (Fig 3c) was more effective compared to mechanical disruption (Fig 3d) as chromatograms with a better resolved Se-containing peaks were obtained. With this method, 48 h of enzymatic incubation was sufficient to improve the chromatographic profile obtained at 24 h and establish that SeCys was the seleno-amino acid formed by coinciding its retention time with (SeCys)₂ and performing enrichment experiments. However, in mechanical disruption, although SeCys was also detected, the identification was much more difficult even after 48 h of incubation, possibly because it is a less effective method for the extraction of selenium species in this type of matrix.

Consequently, the method based on enzymatic bacterial cell wall disruption with lysozyme followed by enzymatic incubation with protease for 72 h (*E. coli*) and 48 h (*S. aureus*) provided the best results in terms of extraction efficiency, selenium containing proteins breakdown, artifacts formation and chromatographic resolution. Mass balance calculations were performed by using this protocol with recovery values in the order of $(85 \pm 5) \%$. Moreover, the analysis of control bacteria, lysozyme and Protease XIV by this column did not detect the presence of impurities of Se.

The results obtained demonstrate that both *E. coli* and *S. aureus* were able to biotransform selenite and Ch-SeNPs mainly into SeCys, a proteinogenic seleno-amino acid. Therefore, this result might indicate that the mechanism of transformation of both species could be the same. Other studies in the literature on selenium speciation in different bacterial species have reported the presence of SeCys, SeMet and SeMetSeCys as the main selenium species formed after their growth in the presence of the forms of selenium used in this work [21,28,38]. The results reported in this study highlighted the importance of the extraction procedure and incubation time on the speciation results. In this case an enzymatic disruption of bacterial wall together with an enzymatic incubation

with protease at 72 h (*E. coli*) and 48 h (*S. aureus*) provided the best results to achieve a correct interpretation on the metabolism of selenite and Ch-SeNPs by *E. coli* and *S. aureus*. Furthermore, the difference in the optimal time of enzymatic incubation between the two bacterial species (72 h for *E. coli* and 48 h for *S. aureus*) may be due to the different composition of the bacterial wall of Gram-negative and Gram-positive bacteria [39]. Under these optimal conditions, the quantification of SeCys was performed by an external calibration since the sample did not present any matrix effect.

3.3. Identification and confirmation of SeCys by HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS/MS

One of the main problems when identifying SeCys by anion exchange chromatography is that its identification is mainly related to (SeCys)₂ standard. Moreover, the decomposition of selenocysteine residues may occur during extraction procedure. To overcome these problems, SeCys residues were alkylated with iodoacetamide prior to enzymatic extraction with lysozyme and Protease XIV following the procedure described in Section 2.5. Carbamidomethylated extracts were analyzed by reversed phase chromatography coupled to ICP-MS to identify the presence of SeCys due to the compatibility of its mobile phase with the subsequent HPLC-ESI-MS/MS analysis. The chromatograms in Fig. 4 show a Se-containing peak at 2.3 min corresponding to *E. coli* grown in the presence of selenite and SeNPs at 1 mg·Se L⁻¹. This peak was related to CAM-SeCys and therefore to the SeCys selenocompound since its retention time was longer than (SeCys)₂ standard. Moreover, the difference between the retention times of both compounds indicated that the carbamidomethylation process was successful, otherwise their retention time would have been the same, as [21] observed when determining SeCys in lactic acid bacteria using EVO C18 column. These results were the same when the carbamidomethylated extracts corresponding to 2 mg·Se L⁻¹ were analyzed. The same protocol was applied for *S. aureus* cultivated in the presence of 1 and 2 mg·Se L⁻¹ in form of selenite and SeNPs, and again the appearance of a Se-containing peak at 2.3 min was associated with CAM-SeCys.

The lack of a commercial CAM-SeCys prevents the identification of this species by HPLC-ICP-MS. Therefore, the carbamidomethylated extracts were analyzed by HPLC-ESI-MS/MS using the reversed phase column to confirm the formation of SeCys by both bacterial species. Analyses were performed by multiple reaction monitoring (MRM), in which the precursor ion and a product ion were selected.

The selection of transitions for the identification of CAM-SeCys was performed through MRM transition of the fraction corresponding to CAM-SeCys along with a bibliographic search where the carbamidomethylation procedure was the same as the one used in this work [40,41]. In this way, 226.9 was chosen as precursor ion and the transitions 226.9-209.9; 226.9-180.9; 226.9-167.9; 226.9-163.9; 226.9-137.9; 226.9-121.9; 226.9-109.9; 226.9-92.9 and 226.9-74.0 were selected. The Fig. 5a shows the MRM transitions obtained for fraction of CAM-SeCys collected after analysis of the extract of *E. coli* cultivated with 2 mg·Se L⁻¹ as Ch-SeNPs, where 5 of the above transitions were recorded. Furthermore, after proteolytic digestion, the analysis of the extracts of *E. coli* and *S. aureus* corresponding to 1 and 2 mg·Se L⁻¹ in form of selenite and Ch-SeNPs confirmed the presence of CAM-SeCys by the peak found at 1.25 min in 5 of the transitions. The Fig. 5b shows the chromatograms obtained for *E. coli* cultured in the presence of 2 mg·Se L⁻¹ in form of Ch-SeNPs where it can be observed the peaks corresponding to CAM-SeCys transitions. Therefore, these results not only confirm the analyses performed by HPLC-ICP-MS with both chromatographic columns but also demonstrate the ability of *E. coli* and *S. aureus* to biotransform selenite and Ch-SeNPs into SeCys. On the other hand, although selenium speciation in *E. coli* and *S. aureus* grown in the presence of selenite and Ch-SeNPs has not been carried out to date, this seleno-amino acid has been identified in other bacterial species cultivated with both chemical forms of selenium.

4. Conclusions

The present study demonstrates that selenium nanoparticles can interact with bacterial populations in the same way as other chemical forms of selenium such as selenite. In fact, it has been demonstrated for the first time that the bacterial species *E. coli* and *S. aureus* could biotransform selenite and Ch-SeNPs into the proteinogenic seleno-amino acid SeCys, when both chemical forms of selenium were supplemented in the culture medium. Moreover, the formation of this selenocompound was independent of the bacterial species and the form of selenium used for their growth, which could indicate that the assimilation of SeNPs would follow a similar pathway to selenite assimilation. The optimization of the extraction conditions by including a carbamidomethylation process allowed us to identify and confirm by HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS/MS the presence of SeCys through the formation of CAM-SeCys.

Acknowledgments

The authors thank the Spanish Commission of Science and Technology (PID2020-114714RB-I00), the Comunidad of Madrid and European funding from FSE and FEDER programs for financial

support (S2018/BAA-4393, AVANSECAL-II-CM) and the Complutense University through a pre-doctoral grant (CTQ/18-CT43/18).

References

- [1] V.M. Labunskyy, D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev, Selenoproteins: Molecular pathways and physiological roles, *Physiol. Rev.* 94 (2014) 739–777. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2013>.
- [2] M.P. Rayman, The influence of Selenium to human health, *Lancet*. 356 (2000) 233–241. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02490-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02490-9).
- [3] R. Burra, G.A. Pradenas, R.A. Montes, C.C. Vázquez, T.G. Chasteen, Production of dimethyl triselenide and dimethyl diselenenyl sulfide in the headspace of metalloid-resistant *Bacillus* species grown in the presence of selenium oxyanions, *Anal. Biochem.* 396 (2010) 217–222. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.09.026>.
- [4] R.J. Turner, J.H. Weiner, D.E. Taylor, Selenium metabolism in *Escherichia coli*, *BioMetals*. 11 (1998) 223–227. <https://doi.org/10.1023/A:1009290213301>.
- [5] X. Zhang, W. Fan, M. Yao, C. Yang, G. Sheng, Redox state of microbial extracellular polymeric substances regulates reduction of selenite to elemental selenium accompanying with enhancing microbial detoxification in aquatic environments, *Water Res.* 172 (2020) 115538. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115538>.
- [6] M.H.G. Berntssen, T.K. Sundal, P.A. Olsvik, H. Amlund, J.D. Rasinger, V. Sele, K. Hamre, M. Hillestad, L. Buttle, R. Ørnsrud, Sensitivity and toxic mode of action of dietary organic and inorganic selenium in Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Aquat. Toxicol.* 192 (2017) 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.09.014>.
- [7] F.W. Edens, A.E. Sefton, Organic selenium in animal nutrition – utilisation, metabolism, storage and comparison with other selenium sources, *J. Appl. Anim. Nutr.* 4 (2016) 1–14. <https://doi.org/10.1017/jan.2016.5>.
- [8] S. V. Gudkov, G.A. Shafeev, A.P. Glinushkin, A. V. Shkirin, E. V. Barmina, I.I. Rakov, A. V. Simakin, A. V. Kislov, M.E. Astashev, V.A. Vodeneev, V.P. Kalinitchenko, Production and use of selenium nanoparticles as fertilizers, *ACS Omega*. 5 (2020) 17767–17774. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02448>.

- [9] F. Nabi, M.A. Arain, F. Hassan, M. Umar, N. Rajput, M. Alagawany, S.F. Syed, J. Soomro, F. Somroo, J. Liu, Nutraceutical role of selenium nanoparticles in poultry nutrition: a review, *Worlds. Poult. Sci. J.* 76 (2020) 459–471. <https://doi.org/10.1080/00439339.2020.1789535>.
- [10] R. Jain, D. Dominic, N. Jordan, E.R. Rene, S. Weiss, E.D. van Hullebusch, R. Hübner, P.N.L. Lens, Preferential adsorption of Cu in a multi-metal mixture onto biogenic elemental selenium nanoparticles, *Chem. Eng. J.* 284 (2016) 917–925. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.08.144>.
- [11] L. Gunti, R.S. Dass, N.K. Kalagatur, Phytofabrication of selenium nanoparticles from emblica officinalis fruit extract and exploring its biopotential applications: Antioxidant, antimicrobial, and biocompatibility, *Front. Microbiol.* 10 (2019) 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00931>.
- [12] A. Khurana, S. Tekula, M.A. Saifi, P. Venkatesh, C. Godugu, Therapeutic applications of selenium nanoparticles, *Biomed. Pharmacother.* 111 (2019) 802–812. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.146>.
- [13] S.J. Hamilton, Review of selenium toxicity in the aquatic food chain, *Sci. Total Environ.* 326 (2004) 1–31. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.01.019>.
- [14] A. Kumar, K.S. Prasad, Role of nano-selenium in health and environment, *J. Biotechnol.* 325 (2021) 152–163. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.11.004>.
- [15] H. Fernández-Llamosas, L. Castro, M.L. Blázquez, E. Díaz, M. Carmona, Speeding up bioproduction of selenium nanoparticles by using *Vibrio natriegens* as microbial factory, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16252-1>.
- [16] J.F. Stolz, P. Basu, R.S. Oremland, Microbial transformation of elements: The case of arsenic and selenium, *Int. Microbiol.* 5 (2002) 201–207. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0091-y>.
- [17] M. Palomo, A.M. Gutiérrez, M.C. Pérez-Conde, C. Cámara, Y. Madrid, Se metallomics during lactic fermentation of Se-enriched yogurt, *Food Chem.* 164 (2014) 371–379. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.007>.
- [18] E. Galano, E. Mangiapane, J. Bianga, A. Palmese, E. Pessione, J. Szpunar, R. Lobinski, A. Amoresano, Privileged incorporation of selenium as selenocysteine in *Lactobacillus reuteri*

- proteins demonstrated by selenium-specific imaging and proteomics, *Mol. Cell. Proteomics*. 12 (2013) 2196–2204. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.027607>.
- [19] K.X. Shu, L. Chen, Q.L. Jun, Enriched selenium and its effects on growth and biochemical composition in *Lactobacillus bulgaricus*, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 2413–2417. <https://doi.org/10.1021/jf062946j>.
- [20] L. Crespo, R. Gaglio, F.G. Martínez, G.M. Martin, E. Franciosi, Y. Madrid-Albarrán, L. Settanni, F. Mozzi, M. Pescuma, Bioaccumulation of selenium-by fruit origin lactic acid bacteria in tropical fermented fruit juices, *LWT-Food Sci. Technol.* 151 (2021) 112103. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112103>.
- [21] F.G. Martínez, G. Moreno-Martin, M. Pescuma, Y. Madrid-Albarrán, F. Mozzi, Biotransformation of Selenium by Lactic Acid Bacteria: Formation of seleno-nanoparticles and seleno-amino acids, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8 (2020) 1–17. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00506>.
- [22] M. Shakibaie, H. Forootanfar, Y. Golkari, T. Mohammadi-Khorsand, M.R. Shakibaie, Anti-biofilm activity of biogenic selenium nanoparticles and selenium dioxide against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Proteus mirabilis*, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 29 (2015) 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.07.020>.
- [23] D. Medina Cruz, G. Mi, T.J. Webster, Synthesis and characterization of biogenic selenium nanoparticles with antimicrobial properties made by *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Biomed. Mater. Res A*. 106 (2018) 1400–1412. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36347>.
- [24] S.A. Wadhwani, U.U. Shedbalkar, R. Singh, B.A. Chopade, Biogenic selenium nanoparticles: current status and future prospects, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (2016) 2555–2566. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7300-7>.
- [25] G. Moreno-Martin, J. Sanz-Landaluze, M.E. León-González, Y. Madrid, In vivo quantification of volatile organoselenium compounds released by bacteria exposed to selenium with HS-SPME-GC-MS. Effect of selenite and selenium nanoparticles, *Talanta*. 224 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121907>.
- [26] M. Palomo-Siguero, A.M. Gutiérrez, C. Pérez-Conde, Y. Madrid, Effect of selenite and

- selenium nanoparticles on lactic bacteria: A multi-analytical study, *Microchem. J.* 126 (2016) 488–495. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.01.010>.
- [27] B. Gomez-Gomez, M. Corte-Rodríguez, M.T. Perez-Corona, J. Bettmer, M. Montes-Bayón, Y. Madrid, Combined single cell and single particle ICP-TQ-MS analysis to quantitatively evaluate the uptake and biotransformation of tellurium nanoparticles in bacteria, *Anal. Chim. Acta.* 1128 (2020) 116–128. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.06.058>.
- [28] M. Palomo-Siguero, Y. Madrid, Exploring the behavior and metabolic transformations of SeNPs in exposed lactic acid bacteria. Effect of nanoparticles coating agent, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 1712. <https://doi.org/10.3390/ijms18081712>.
- [29] G. Moreno-Martín, J. Sanz-Landaluze, M.E. León-González, Y. Madrid, Insights into the accumulation and transformation of Ch-SeNPs by *Raphanus sativus* and *Brassica juncea*: Effect on essential elements uptake, *Sci. Total Environ.* 725 (2020) 138453. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138453>.
- [30] A. Alzate, B. Cañas, S. Pérez-Munguá, H. Hernández-Mendoza, C. Pérez-Conde, A.M. Gutiérrez, C. Cámara, Evaluation of the inorganic selenium biotransformation in selenium-enriched yogurt by HPLC-ICP-MS, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 9776–9783. <https://doi.org/10.1021/jf071596d>.
- [31] M. Kousha, S. Yeganeh, A. Keramat Amirkolaie, Effect of sodium selenite on the bacteria growth, selenium accumulation, and selenium biotransformation in *Pediococcus acidilactici*, *Food Sci. Biotechnol.* 26 (2017) 1013–1018. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0142-y>.
- [32] A. Alzate, A. Fernández-Fernández, M.C. Pérez-Conde, A.M. Gutiérrez, C. Cámara, Comparison of biotransformation of inorganic selenium by *Lactobacillus* and *Saccharomyces* in lactic fermentation process of yogurt and kefir, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 8728–8736. <https://doi.org/10.1021/jf8013519>.
- [33] E. Kurek, A. Ruszczynska, M. Wojciechowski, A. Łuciuk, M. Michalska-Kacymirow, I. Motyl, E. Bulska, Bio-transformation of selenium in Se-enriched bacterial strains of *Lactobacillus casei*, *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* 67 (2016) 253–262.
- [34] S. McSheehy, F. Pannier, J. Szpunar, M. Potin-Gautier, R. Lobinski, Speciation of seleno compounds in yeast aqueous extracts by three-dimensional liquid chromatography with

- inductively coupled plasma mass spectrometric and electrospray mass spectrometric detection, *Analyst*. 127 (2002) 223–229. <https://doi.org/10.1039/b108680b>.
- [35] D. Vicente-Zurdo, B. Gómez-Gómez, M.T. Pérez-Corona, Y. Madrid, Impact of fish growing conditions and cooking methods on selenium species in swordfish and salmon fillets, *J. Food Compos. Anal.* 83 (2019) 103275. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103275>.
- [36] D. Han, S. Xiong, W. Jia, S. Chen, Y. Wei, H. Shao, W. Huang, Separation of selenium species in plant tissues by high performance liquid chromatography-ultraviolet treatment-hydride generation atomic fluorescence spectrometry using various mobile phases, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 35 (2021) 812–820. <https://doi.org/10.1080/13102818.2021.1911682>.
- [37] K. Pyrzynska, A. Sentkowska, Liquid chromatographic analysis of selenium species in plant materials, *Trends Anal. Chem.* 111 (2019) 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.011>.
- [38] G. Krausova, A. Kana, I. Hyrslova, I. Mrvikova, M. Kavkova, Development of selenized lactic acid bacteria and their selenium bioaccumulation capacity, *Fermentation*. 6 (2020) 1–13. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION6030091>.
- [39] K. Sadhu, P.A.G. Domingue, A.W. Chow, J. Nelligan, N. Cheng, J.W. Costerton, *Gardnerella vaginalis* has a gram-positive cell-wall ultrastructure and lacks classical cell-wall lipopolysaccharide, *J. Med. Microbiol.* 29 (1989) 229–235. <https://doi.org/10.1099/00222615-29-3-229>.
- [40] M. Dernovics, R. Lobinski, Characterization of the selenocysteine-containing metabolome in selenium-rich yeast: Part II. on the reliability of the quantitative determination of selenocysteine, *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 744–751. <https://doi.org/10.1039/b716140a>.
- [41] M. Dernovics, R. Lobinski, Characterization of the selenocysteine-containing metabolome in selenium-rich yeast: Part 1. Identification of new species by multi-dimensional liquid chromatography with parallel ICP-MS and electrospray Q-TOFMS/MS detection, *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 72–83. <https://doi.org/10.1039/b708294k>.

FIGURE CAPTIONS

Fig.1. TEM analysis of Ch-SeNPs dispersed in (a) synthesis medium and (b) LB broth culture medium after 24 h of exposure at 37 °C and 120 rpm. (c) EDX spectrum of Ch-SeNPs showing the Se absorption peaks corresponding to SeL_α (1.37 keV), SeK_α (11.22 keV) and SeK_β (12.49 keV).

Fig.2. Multifactorial ANOVA test. (a) Influence of factors (selenium chemical form, bacterial species, extraction procedure and incubation time) on extraction efficiency of selenium species. (b) Secondary effect between incubation time and extraction procedure observed by multifactorial ANOVA test.

Fig. 3. Effect of incubation time on extraction of selenium species from *E. coli* and *S. aureus* grown in the presence of 1 mg·Se L⁻¹ as selenite and Ch-SeNPs. Anion-exchange HPLC-ICP-MS chromatograms for *E. coli* after extraction with (a) lysozyme + Protease XIV and (b) glass beads + Protease XIV and for *S. aureus* after extraction with (c) lysozyme+ Protease XIV and (d) beads + Protease XIV. In the chromatograms, the blue lines correspond to a mixture of Se standards containing 20 µg·Se L⁻¹ for (a) and (c) and 2 µg·Se L⁻¹ for (b) and (d) of (SeCys)₂, SeMetSeCys, selenite and SeMet and the dotted red lines indicate the coincidence between the peak of the sample corresponding to SeCys with the (SeCys)₂ standard.

Fig. 4. Reversed phase HPLC-ICP-MS chromatograms of enzymatic extracts of *E. coli* exposed to 1 mg·Se L⁻¹ as selenite and Ch-SeNPs obtained after carbamidomethylation procedure followed by enzymatic extraction (lysozyme + Protease XIV). In the chromatograms, the blue line corresponds to 10 µg·Se L⁻¹ of (SeCys)₂ standard and the dotted red line indicates the CAM-SeCys species.

Fig. 5. (a) MRM transitions obtained for fraction of CAM-SeCys collected after analysis of the extract of *E. coli* cultivated with 2 mg·Se L⁻¹ as Ch-SeNPs. The structure and chemical formula of CAM-SeCys are included. (b) HPLC-ESI-MS/MS chromatograms corresponding to CAM-SeCys species obtained after proteolytic digestion (lysozyme+protease XIV) of *E. coli* cultivated with 2 mg·Se L⁻¹ in form of Ch-SeNPs.

TABLES

Table 1. Efficiency of selenium extraction from bacterial pellet after using two extraction procedures and 3 enzymatic incubation times. The selenium exposure level of bacterial species was 2 mg-Se L⁻¹.

Bacterial specie	Se form	Total Se (μg)	Enzymatic extraction procedure											
			Lysozyme + Protease XIV						Glass beads + Protease XIV					
			24 h		48 h		72 h		24 h		48 h		72 h	
			Se Extracted (μg)	Extraction efficiency (%)	Se Extracted (μg)	Extraction efficiency (%)	Se Extracted (μg)	Extraction efficiency (%)	Se Extracted (μg)	Extraction efficiency (%)	Se Extracted (μg)	Extraction efficiency (%)	Se Extracted (μg)	Extraction efficiency (%)
<i>E. coli</i>	Selenite	5.8 ± 0.8	5.68 ± 0.02	97.4 ± 0.4	5.71 ± 0.05	97.9 ± 0.9	5.64 ± 0.04	96.7 ± 0.7	0.12 ± 0.02	2.0 ± 0.4	0.36 ± 0.03	6.2 ± 0.5	3.50 ± 0.08	60.0 ± 1.4
	Ch-SeNPs	5.5 ± 0.4	5.33 ± 0.03	96.9 ± 0.5	5.34 ± 0.04	97.1 ± 0.8	5.31 ± 0.02	96.6 ± 0.4	0.11 ± 0.02	1.9 ± 0.4	0.31 ± 0.03	5.6 ± 0.5	3.40 ± 0.08	61.8 ± 1.5
<i>S. aureus</i>	Selenite	4.5 ± 0.3	4.29 ± 0.08	95.4 ± 1.8	4.36 ± 0.03	96.9 ± 0.7	4.37 ± 0.04	97.1 ± 0.8	0.08 ± 0.01	1.8 ± 0.2	0.27 ± 0.02	6.0 ± 0.5	2.68 ± 0.02	59.5 ± 0.5
	Ch-SeNPs	5.5 ± 0.3	5.36 ± 0.04	97.5 ± 0.8	5.35 ± 0.04	97.2 ± 0.8	5.34 ± 0.04	97.1 ± 0.8	0.10 ± 0.01	1.9 ± 0.2	0.31 ± 0.02	5.6 ± 0.3	3.28 ± 0.02	59.6 ± 0.4

Fig.1.

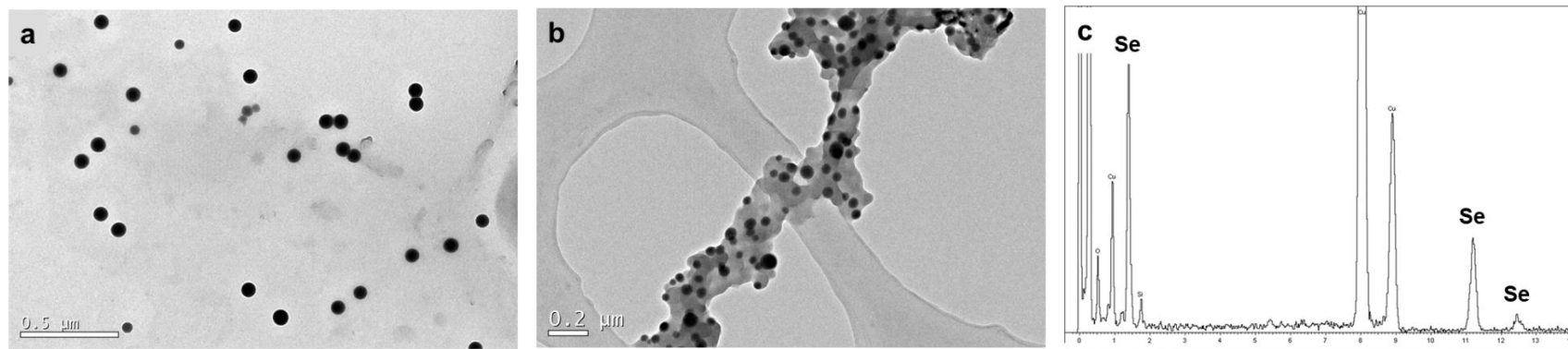


Fig. 2.

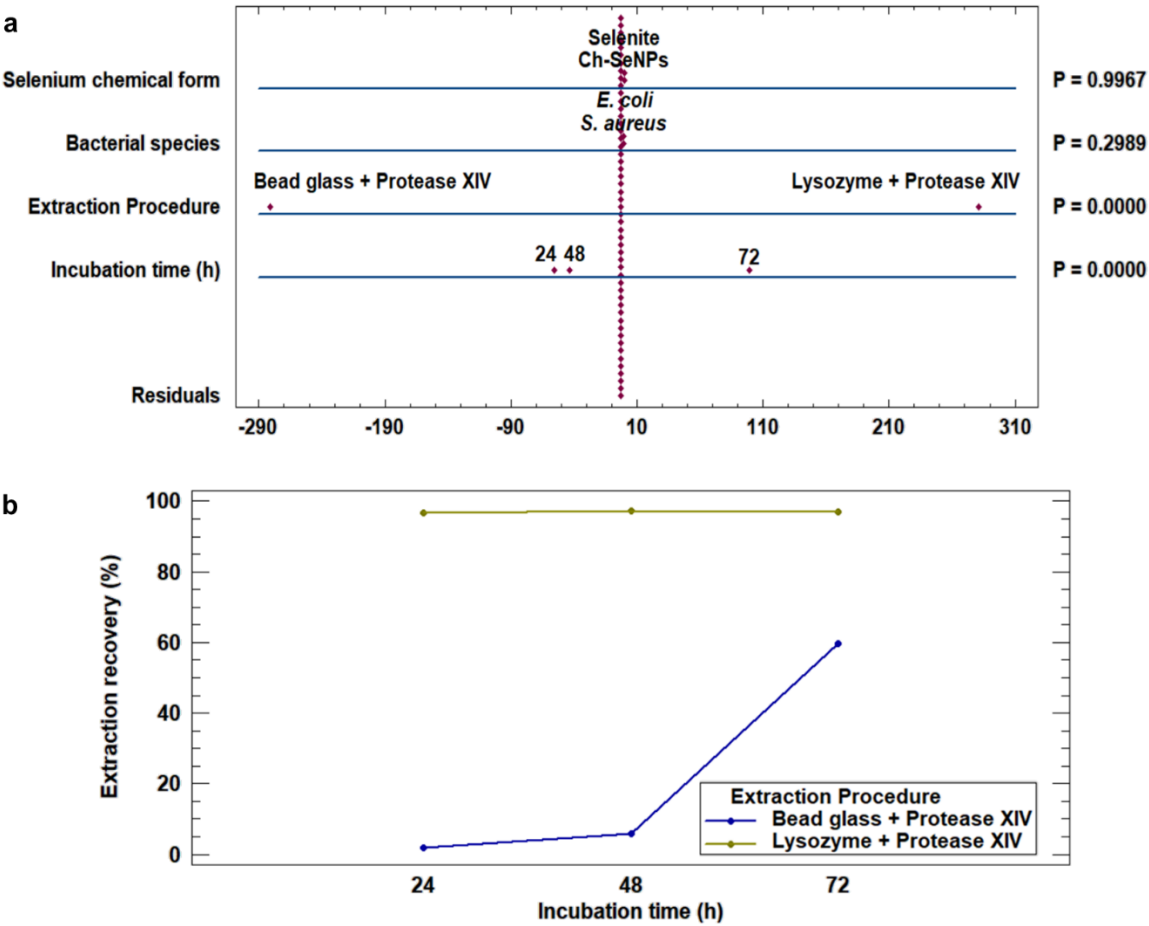


Fig. 3.

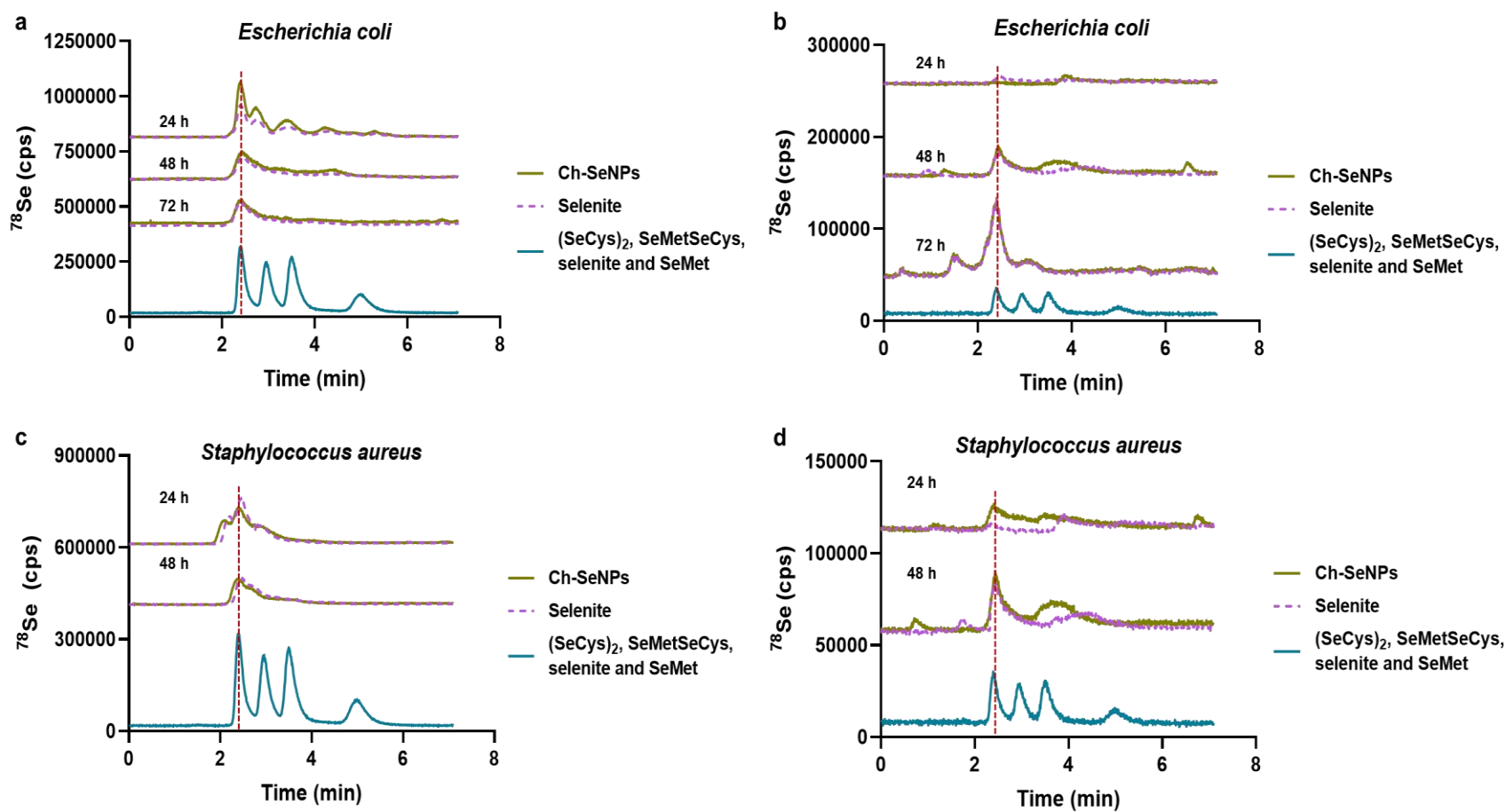


Fig. 4.

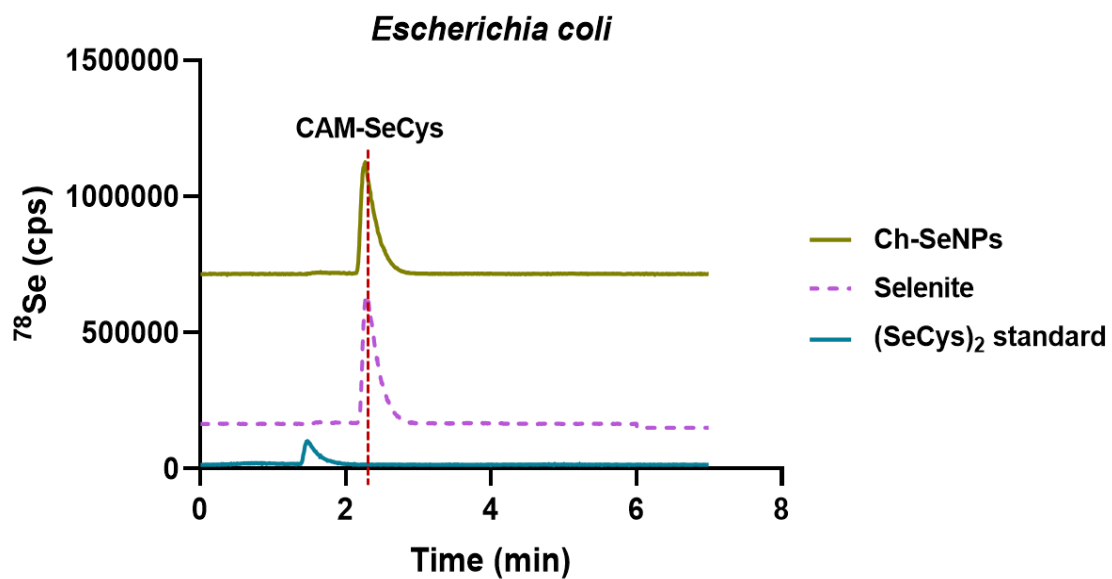
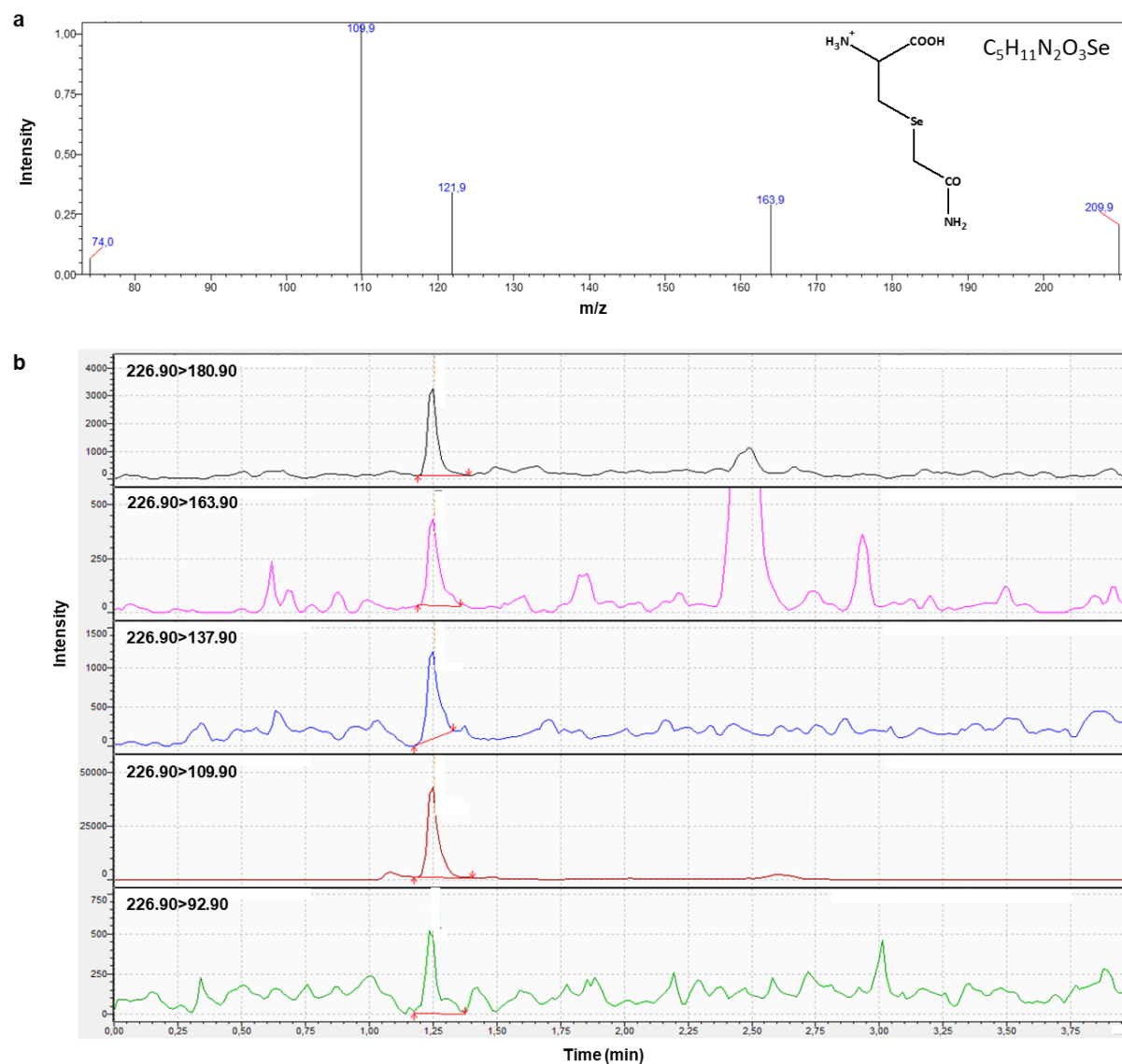


Fig. 5.



VIII.DISCUSIÓN INTEGRADORA

En esta sección se integran los resultados recogidos en los artículos, que componen los capítulos anteriores, con el objetivo de proporcionar una visión global de los estudios llevados a cabo en el marco de la presente Tesis Doctoral. Los resultados obtenidos han evidenciado la necesidad de utilizar una gran variedad de técnicas para obtener una información, lo más completa posible, sobre las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas metálicas y de metaloides, concretamente su tamaño, estado de agregación, forma, carga superficial y concentración; así como de sus transformaciones una vez entran en el medioambiente y/o interaccionan con sistemas biológicos.

Las propiedades únicas que presentan las nanopartículas, en comparación con sus análogos a escala micrométrica, han tenido como consecuencia una rápida expansión de la nanotecnología en múltiples sectores científico-tecnológicos e industriales. Entre las nanopartículas más comercializadas y, por tanto, más utilizadas se encuentran: las AgNPs que debido a sus propiedades antimicrobianas aparecen incorporadas en productos médicos, geles, textiles, filtros de aire y de agua, etc., y las AuNPs, ampliamente aplicadas en biomedicina debido a su biocompatibilidad, y a su capacidad para absorber la radiación en la región del infrarrojo cercano liberando energía térmica. Todo esto las convierte, por su amplio uso, en potenciales candidatas para incorporarse a los compartimentos medioambientales e interaccionar con diferentes organismos, con el consiguiente riesgo para la salud y los ecosistemas. Los estudios de la interacción de nanopartículas con sistemas biológicos y medioambientales suponen un reto para la Química Analítica. Como se ha mencionado en la introducción, las nanopartículas experimentan diferentes transformaciones físicas, químicas y biológicas que modifican sus propiedades fisicoquímicas originales (tamaño, forma, estado de agregación, carga superficial, etc.), lo que acaba influyendo sobre su destino y toxicidad. El estudio de estas nanopartículas en muestras medioambientales y biológicas implica el desarrollo de estrategias y metodologías analíticas que permitan llevar a cabo su detección y caracterización en este tipo de matrices, a unos niveles de concentración del orden de los $\mu\text{g L}^{-1}$ o $\mu\text{g Kg}^{-1}$ e incluso inferiores.

En este sentido, se desarrolló un método basado en análisis multivariante que permitió determinar simultáneamente el tamaño y la concentración de AgNPs en muestras de aguas de río y agua de grifo mediante espectrofotometría UV-Vis en combinación con la calibración multivariante mediante PLS. La metodología aplicada se basó en la

dependencia de la SPRB de las AgNPs (cuando forman estructuras agregadas con el aminoácido L-cisteína) con el tamaño y la concentración de las nanopartículas. Teniendo en cuenta que el proceso de agregación de las nanopartículas es un proceso cinético que depende tanto del tiempo como de la temperatura, se estudió la variación de esta propiedad óptica con el tamaño de las AgNPs estabilizadas con citrato (20, 40, 60 y 80 nm), a una temperatura de 25°C y registrando los espectros de UV-Vis a 0, 30 y 60 minutos. Además, se incluyeron distintos valores de pH obtenidos con ácidos de distinta naturaleza. Aunque en todos los casos se observó un desplazamiento hacia mayores longitudes de onda, manteniéndose constante transcurridos 30 minutos, fue el ácido fosfórico a pH 3,00 el que proporcionó mejores resultados con respecto al desplazamiento de la SPRB de las distintas AgNPs.

Con el objetivo de controlar el proceso de agregación y mejorar su reproducibilidad, se utilizó el aminoácido L-cisteína al existir evidencias de que su presencia induce la agregación de nanopartículas de metales nobles por su afinidad por el azufre. La incorporación de este aminoácido dio lugar a una agregación de las AgNPs parcialmente reversible, que podría deberse a una interacción entre ambos (aminoácido y AgNPs) fundamentalmente gobernada por fuerzas electrostáticas más que por enlaces de hidrógeno, ya que la agitación de las muestras, después de la incubación durante 30 minutos, provocó un menor desplazamiento de la SPRB comparado con la ausencia de agitación.

Bajo estas premisas, y teniendo en cuenta que los perfiles de los espectros de UV-Vis obtenidos después del proceso de agregación fueron únicamente dependientes del tamaño, al afectar la concentración solo a la intensidad de las señales y no a la forma de dichos perfiles, se decidió construir un modelo de calibración multivariante para determinar de manera simultánea el tamaño y la concentración de este tipo de nanopartículas. En este sentido, para realizar el análisis multicomponente se evaluaron diferentes combinaciones de longitudes de onda, teniendo en cuenta para su selección las diferencias y las similitudes entre los espectros de las AgNPs de diferentes tamaños.

Antes de elaborar el modelo de calibración multivariante, se optimizaron los niveles de concentración de ácido fosfórico y L-cisteína que proporcionaban un mejor proceso de agregación de las AgNPs. Para ello, se recurrió a un diseño experimental y a un análisis de superficie de respuesta. El diseño incluía dos factores y tres niveles, y como respuesta

se utilizó las variaciones de la absorbancia que experimentaron las bandas de absorción de las AgNPs de 20 y 80 nm a 390, 460, 660 y 700 nm en un intervalo de tiempo fijo de 30 minutos. Para las AgNPs de 40 y 60 nm se asumió que exhibirían un comportamiento intermedio al estar su tamaño comprendido entre 20 y 80 nm. Las superficies de respuesta obtenidas mostraron que la señal no solo fue dependiente del tamaño de las AgNPs sino también de la concentración de L-cisteína y de ácido fosfórico, cuyo efecto también dependió del tamaño. De hecho, en el caso del aminoácido, a medida que su concentración aumentaba se producía una disminución general de la señal para ambos tamaños de nanopartículas, siendo más acusada en las AgNPs de 80 nm a 660 nm y 700 nm. Sin embargo, en el caso del ácido fosfórico, una disminución de su concentración provocó un aumento de dicha señal en las AgNPs de 20 nm, y una disminución de esta a 660 nm y 700 nm para las AgNPs de 80 nm. Por tanto, este comportamiento tan diferente entre las AgNPs se tradujo en condiciones óptimas distintas para cada tamaño, siendo 51,6 mg L⁻¹ de L-cisteína y 17,6 mM de ácido fosfórico las concentraciones óptimas para las AgNPs de 20 nm, y 37,0 mg L⁻¹ y 13,4 mM, respectivamente para las AgNPs de 80 nm. Ante esta situación, ambas condiciones se aplicaron tanto a las AgNPs de 20 nm como a las AgNPs de 80 nm con el objetivo de seleccionar unas condiciones de compromiso. Las mayores diferencias en las respuestas espectroscópicas, como consecuencia del proceso de agregación dependiente del tamaño, se obtuvieron bajo las condiciones óptimas de las AgNPs de 20 nm, que finalmente se fijaron como las más adecuadas para la construcción del modelo de calibración multivariante.

Una vez establecidas las condiciones que rigen la agregación de las AgNPs, se construyó el modelo de calibración multivariante PLS utilizando un diseño de mezclas para establecer el menor número de mezclas de calibración, compuestas por disoluciones que contenían AgNPs de diferente tamaño y/o concentración, con la máxima variabilidad. El diseño de mezclas seleccionado se basó en un simplex con centroide más tres réplicas en el punto central, que dio como resultado un set de calibración de 21 muestras. De este set de 21 muestras, formadas por mezclas individuales, binarias, ternarias y cuaternarias de las AgNPs de 20, 40, 60 y 80 nm en un rango de concentración comprendido entre 0,62 y 2,5 mg L⁻¹, 18 muestras fueron proporcionadas a través del diseño y las tres restantes, constituidas por una mezcla ternaria y dos individuales, se añadieron para evaluar la reproducibilidad y la precisión del modelo de calibración. Con el fin de evaluar el número de factores para construir el modelo de calibración se utilizó el PCA de las

respuestas de este set de calibración y se observó, por un lado, que se necesitaban 5 factores para poder explicar el modelo y, por otro, la necesidad de seleccionar como respuesta el espectro completo registrado en la región espectral de 260 a 800 nm, ya que las señales a las cuatro longitudes de onda seleccionadas eran insuficientes para la construcción del modelo de calibración con valores de la suma de cuadrados del error de predicción (PRESS, *Prediction Error Sum of Squares*) inferiores al 25%. Bajo estas nuevas condiciones, el número de variables latentes aumentó de 5 a 9 teniendo en cuenta los valores del PRESS proporcionados por PLS, y como consecuencia de este incremento, se obtuvo un valor de PRESS de alrededor del 20-25% que, aunque resultó elevado, fue necesario para mejorar la capacidad de predicción del modelo. Dicha capacidad de predicción se evaluó a través de un set de 9 mezclas sintéticas de validación, que comprendían mezclas individuales, binarias y ternarias de las AgNPs en un rango de concentración entre 0,83 y 2,5 mg L⁻¹. Los resultados obtenidos, teniendo en cuenta que el error entre la cantidad de AgNPs añadida y la cantidad predicha por el modelo debía ser inferior al valor del PRESS (inferior al 25%), mostraron que, aunque en las mezclas ternarias los valores predichos por el modelo fueron generalmente por exceso para 40 nm y por defecto para 20 y 60 nm, la capacidad del modelo para predecir la concentración total añadida fue buena con independencia del tipo de mezcla.

Las características analíticas de este modelo se evaluaron en términos de reproducibilidad, límites de detección, precisión y selectividad. En cuanto a la reproducibilidad, basada en el error obtenido entre la cantidad total de AgNPs añadida y la cantidad total encontrada por el modelo en 12 mezclas binarias de 2,5 mg L⁻¹, se obtuvieron valores entre el 4% y el 20% tras eliminar tres mezclas cuyo error fue superior al 25% establecido por el PRESS. Además, aunque estos resultados evidenciaron que en las mezclas binarias de tamaños consecutivos el modelo predecía por defecto las nanopartículas de menor tamaño y por exceso las de tamaño mayor, las imágenes del TEM de estas mezclas discrepantes evidenciaron la formación de agregados y/o aglomerados que permitieron justificar estos resultados. Por su parte, los límites de detección para cada tamaño fueron obtenidos a través de las mezclas de validación y de reproducibilidad donde el tamaño de la AgNPs de interés no estaba presente, obteniéndose valores de 0,3; 0,6; 0,3 y 0,8 mg L⁻¹ para las AgNPs de 20, 40, 60 y 80 nm, respectivamente. Con respecto a la precisión, evaluada en las mezclas ternarias del set de validación, se alcanzaron valores del coeficiente de variación del 15%, 20% y 26%

correspondientes a la precisión dentro del día de las AgNPs de 20, 40 y 60 nm, respectivamente, y valores del 14% y 18% para la precisión entre días de las AgNPs de 20 y 40 nm. En el caso de las AgNPs de 80 nm, aunque su precisión no se pudo estimar al coincidir su concentración en las mezclas con su límite de detección, el modelo sí fue capaz de detectarlas en las mezclas de validación donde estaban presentes. Por último, la selectividad del método se evaluó directamente sobre las dos muestras de agua de río y sobre la muestra de agua de grifo, ya que su contenido en materia orgánica, conductividad y dureza podría afectar a la integridad de las AgNPs. Además, teniendo en cuenta que una vez alcancen el medioambiente, estas nanopartículas pueden estar en contacto con otros interferentes como la plata iónica o las TiO₂NPs, los análisis también se llevaron a cabo tanto en presencia como en ausencia de ambos interferentes. Los resultados mostraron que el método desarrollado era selectivo a las AgNPs, al no modificarse la concentración de estas nanopartículas predicha por el modelo cuando estos interferentes estaban presentes.

La aplicabilidad del método fue demostrada al estimar simultáneamente el tamaño y la concentración de AgNPs adicionadas a muestras de aguas de río y de agua de grifo, que se caracterizaron por su diferente contenido de metales y metaloides, dureza y contenido orgánico. Las recuperaciones obtenidas en base a la concentración total de AgNPs añadida y encontrada por el modelo, después de enriquecer las muestras con diferentes mezclas individuales, binarias y ternarias, mostraron el buen rendimiento del método al presentar valores superiores al 70% en la mayoría de las mezclas analizadas. A pesar de esta buena capacidad de predicción, el modelo mostró errores en las mezclas individuales de 40 nm en las aguas de grifo y del río de Valdemoro al predecir cantidades mayores a las añadidas por la detección de AgNPs de 20 nm y 60 nm, que no habían sido incorporadas. Asimismo, bajos valores de recuperación, comprendidos entre el 40% y el 65%, se obtuvieron para mezclas individuales de 20 nm y mezclas binarias de 20 nm y 40 nm en la misma agua de río. De nuevo, esto se debió a que en las mezclas individuales el modelo predijo por defecto la concentración total de nanopartículas al detectar AgNPs de 40 nm, que no se habían añadido previamente, y en las mezclas de tamaños consecutivos se volvió a observar un exceso de las nanopartículas de mayor tamaño. A través de las micrografías de estas muestras discordantes obtenidas por TEM se corroboraron de nuevo los resultados proporcionados por el modelo de calibración.

Con el propósito de conocer cómo se encontraban las AgNPs al ser incorporadas a las distintas muestras de agua, se llevó a cabo un análisis por TEM de estas muestras enriquecidas en nanopartículas, pero sin la adición del ácido fosfórico y la L-cisteína. Las micrográficas mostraron una agregación natural de las AgNPs por la propia matriz de las muestras. Esta agregación fue mayor en las mezclas binarias, y principalmente en la muestra de agua del río Valdemoro debido a su mayor conductividad y a la presencia de cationes bivalentes, como Mg^{2+} y Ca^{2+} , que se ha demostrado favorecen la agregación de las nanopartículas. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el control de la agregación para obtener reproducibilidad en las medidas se consiguió con la adición del ácido fosfórico y la L-cisteína.

El estudio de las características analíticas directamente sobre las muestras no mostró diferencias significativas con respecto a los límites de detección obtenidos por el modelo para cada tamaño, salvo en las AgNPs de 40 nm, cuyo valor se incrementó hasta $0,9 \text{ mg L}^{-1}$. En cuanto a la reproducibilidad, las aguas de río presentaron valores comprendidos entre el 2% y el 10% para la precisión dentro del día, y entre el 7% y el 27% para la precisión entre días, mientras que en el agua de grifo estos valores estuvieron en el rango del 6% al 13%, y del 23%, respectivamente. De nuevo, la precisión para las AgNPs de 80 nm no se pudo establecer debido a que la concentración encontrada estaba cerca del límite de detección.

Teniendo en cuenta las transformaciones que experimentan las nanopartículas en el medioambiente, y siendo una de ellas la modificación del agente estabilizante, este modelo de calibración también predijo el tamaño y la concentración de AgNPs cuando las muestras fueron enriquecidas con AgNPs estabilizadas con PVP, un agente estabilizante distinto al citrato, utilizado para la construcción del modelo. Asimismo, las micrográficas del TEM confirmaron estos resultados al mostrar que las nanopartículas estabilizadas con PVP también experimentaron el proceso de agregación y aglomeración, aunque en menor medida que las nanopartículas estabilizadas con citrato.

Estos resultados evidencian el alto potencial del método desarrollado para determinar de manera simultánea el tamaño y la concentración de AgNPs, con independencia de su agente estabilizante, en muestras de aguas. Además, el mínimo tratamiento de la muestra y el uso de equipos asequibles como el espectrofotómetro de UV-Vis, lo convierten en un procedimiento de *screening* que se puede aplicar en los

laboratorios de control de calidad, dado que hoy en día muchos de estos espectrofotómetros ya incorporan estas herramientas quimiométricas en su software facilitando el tratamiento de los datos.

Una de las vías de entrada de las nanopartículas en el medioambiente es a través de las estaciones de depuración de aguas residuales (EDAR). Actualmente este tipo de instalaciones no están preparadas para la eliminación de estos nuevos contaminantes emergentes. Una vez que las nanopartículas llegan a las EDAR pueden pasar dos cosas: 1) que sedimenten durante los procesos de tratamiento primario (sedimentación y floculación) y tratamiento secundario (tratamiento biológico), incorporándose a la línea de lodos, o 2) que pasen inalteradas por los distintos tratamientos y se incorporen al cauce receptor donde vierte la planta de tratamiento sus efluentes. En ambos casos las nanopartículas suponen un riesgo para el medioambiente, ya que en el caso de los lodos estos se emplean en agricultura como fertilizantes agrícolas y/o se almacenan como residuos peligrosos, y en el segundo supuesto entran de nuevo a los compartimentos medioambientales. Por todo ello, es importante la detección y caracterización de las nanopartículas en este tipo de matrices con el fin de estimar su impacto medioambiental. Como se ha comentado en la introducción de esta Tesis Doctoral una de las técnicas más útiles para la caracterización de nanopartículas metálicas y/o metaloides es la técnica de ICP-MS en su modalidad de detección de partículas individuales (splCP-MS). Esta técnica constituye una excelente herramienta de *screening* para la detección de nanopartículas a bajos niveles de concentración (en algunos casos en concentraciones significativas desde el punto de vista medioambiental), permite además diferenciar (sin necesidad de aplicar etapas de separación previa) entre el metal/metaloides en forma nanoparticulada y disuelta (proporcionando información sobre la estabilidad de las nanopartículas) y posibilita la caracterización de las nanopartículas en tamaño y concentración (tanto en masa como en número de nanopartículas, siendo esta última la forma que requiere la Unión Europea). Cuando la técnica se aplica a muestras sólidas es necesario llevar a cabo una extracción previa de las nanopartículas. En estos procesos de extracción se tiene que asegurar una extracción cuantitativa de las nanopartículas sin modificar las características fisicoquímicas originales de las mismas.

En este sentido se desarrolló un método para la extracción de AgNPs y AuNPs de lodos de depuradora que en combinación con la herramienta splCP-MS permitió

determinar su tamaño y estimar su concentración en número, así como evaluar su estabilidad en dicha matriz durante un periodo de almacenamiento de 12 meses.

En una primera fase se optimizaron los parámetros de extracción que afectaron al rendimiento de la extracción. Este estudio previo se llevó a cabo con suspensiones comerciales de AgNPs y AuNPs ($112 \mu\text{g L}^{-1}$ de AgNPs de 60 nm y de $112 \mu\text{g L}^{-1}$ de AuNPs de 80 nm), y se determinó la concentración en número de partículas y el tamaño de partículas. Los parámetros estudiados fueron el agente de extracción, en concreto agua Milli-Q y pirofosfato sódico (TSPP) 2,5 mM, la temperatura, en particular la temperatura de secado del lodo (42°C), y el tiempo y la velocidad de centrifugación, siendo los tiempos de centrifugación a estudiar 5 y 12 minutos, y las velocidades 289, 1575, 4629 y 12857 g. Los resultados obtenidos mediante el análisis por sPLCP-MS mostraron que los dos primeros parámetros no afectaron de forma significativa ni a la concentración en número de partículas, ni al tamaño de las nanopartículas de ambas suspensiones. Estos resultados fueron posteriormente corroborados a través de las micrografías obtenidas por TEM, especialmente en el caso de los agentes de extracción, donde no se observaron variaciones en el tamaño, la morfología y el estado de agregación. Sin embargo, en el caso del tiempo y la velocidad de centrifugación se observó que a medida que ambos parámetros aumentaban, la concentración en número de partículas tanto de AgNPs como de AuNPs disminuía significativamente al compararla con las suspensiones sin centrifugar, y con independencia del agente de extracción empleado. Además, teniendo en cuenta que el tamaño es un factor clave que podía influir en gran medida en la sedimentación de las partículas durante la centrifugación, este estudio en concreto también se realizó con suspensiones comerciales de AgNPs de 80 nm y de AuNPs de 60 nm. Con el fin de desarrollar un único método que permitiera la extracción de ambas nanopartículas del lodo de depuradora, en base a su tamaño y al porcentaje de recuperación en número de partículas, se seleccionaron como condiciones de centrifugación óptimas una velocidad de 289 g y un tiempo de 5 minutos, ya que tanto para las AgNPs de 60 y 80 nm, como para las AuNPs de 60 y 80 nm se obtuvieron porcentajes de recuperación superiores al 74% utilizando los dos agentes de extracción, agua Milli-Q y TSPP 2,5 mM. Además, se debe tener en cuenta que el tamaño de los diferentes tipos de nanopartículas no se vio afectado por ninguno de los procesos de centrifugación aplicados.

Para entender de manera conjunta la influencia de todos estos factores (agente de extracción, tiempo y velocidad de centrifugación, así como tamaño y composición de las nanopartículas) sobre el proceso de extracción, en base a la recuperación en número de partículas, y las posibles interacciones entre ellos, se llevó a cabo un análisis ANOVA multifactorial. El tiempo y la velocidad de centrifugación afectaron notablemente a la recuperación. Su efecto se relacionó con un aumento en el número de AgNPs y AuNPs que sedimentaban en el fondo del tubo de centrifuga al incrementarse ambos parámetros. Además, este efecto se relacionó directamente con el tamaño de ambas nanopartículas, ya que los valores de recuperación disminuyeron a medida que el tamaño de las nanopartículas y las condiciones de centrifugación (tiempo y velocidad) se incrementaron. En cuanto a la composición de las nanopartículas, su efecto sobre la centrifugación y, por consiguiente, sobre la recuperación en número de partículas se asoció a la distinta densidad de los metales que constituían ambas nanopartículas, siendo $10,49 \text{ g cm}^{-3}$ para la Ag y $19,32 \text{ g cm}^{-3}$ para el Au. Por otro lado, este análisis multivariante mostró 5 efectos secundarios, es decir, interacciones estadísticamente significativas que permitieron justificar y confirmar la influencia de los diferentes factores sobre el proceso de extracción desarrollado. Estas interacciones se dieron entre el tiempo de centrifugación y la velocidad de centrifugación; la velocidad de centrifugación y el tamaño de las nanopartículas; la velocidad de centrifugación y la composición de las nanopartículas; el tiempo de centrifugación y el tamaño de las nanopartículas, y la composición de las nanopartículas y su tamaño.

Para demostrar la aplicabilidad del método de extracción desarrollado se llevó a cabo el enriquecimiento de una muestra de lodos, procedentes de una estación de depuración de aguas residuales de la Comunidad de Madrid, con $5,7 \text{ mg Kg}^{-1}$ de Ag y $5,7 \text{ mg Kg}^{-1}$ de Au en forma de AgNPs de 60 nm y de AuNPs de 80 nm, respectivamente. El análisis mediante ICP-MS demostró que el proceso de enriquecimiento de las nanopartículas en los lodos de depuradora proporcionó porcentajes de enriquecimiento del $(90 \pm 8) \%$ para las AgNPs y del $(94 \pm 7) \%$ para las AuNPs. Asimismo, el análisis de la composición mediante difracción de rayos X mostró la presencia de plata, en forma de Ag_2O_3 y Ag_3O_4 , tanto en el lodo control como en el lodo enriquecido, aunque en este caso solo en forma de Ag_2O_3 , y en este último también se detectó la aparición de Ag metálica, que se pudo relacionar con la presencia de AgNPs. Sin embargo, en lo que respecta al Au, su identificación no se pudo llevar a cabo ni en lodo control ni en el lodo enriquecido,

probablemente debido a los bajos niveles en los que se encontraba en la muestra unido a los límites de detección del equipo para este metal. A pesar de esto, los análisis por ICP-MS confirmaron la presencia de Au, y también de Ag en las respectivas muestras de lodo enriquecidas.

Una vez comprobado que las nanopartículas se encontraban presentes en los lodos de depuradora, se procedió a llevar a cabo su extracción utilizando agua Milli-Q y TSPP 2,5 mM a pH ($9,56 \pm 0,02$) como agentes de extracción. Aunque ambos agentes no modificaron el tamaño de las AgNPs ((58 ± 8) nm para agua Milli-Q y (58 ± 6) nm para TSPP 2,5 mM) y de las AuNPs ((82 ± 13) nm para agua Milli-Q y (83 ± 13) nm para TSPP 2,5 mM) con respecto al de las dispersiones de referencia, el porcentaje en número de partículas extraído utilizando agua Milli-Q fue inferior al 5% para ambos tipos de nanopartículas, mientras que con TSPP 2,5 mM se consiguió extraer el (70 ± 2) % de las AgNPs y el (25 ± 1) % de las AuNPs. Por tanto, el agente extractante TSPP a un nivel de concentración de 2,5 mM permitió extraer las AgNPs de la matriz del lodo con valores aceptables y reproducibles de recuperación, mientras que en el caso de las AuNPs la concentración de TSPP empleada dio lugar a porcentajes de extracción bajos. De hecho, un aumento de la concentración de TSPP desde 2,5 a 50 mM, manteniendo el pH constante, consiguió mejorar la extracción de las AuNPs hasta alcanzar un valor máximo de (56 ± 1) % con 20 mM, sin alterar el porcentaje de extracción de AgNPs. Asimismo, este incremento en la concentración se vio reflejado en un aumento de la turbidez del extracto, debido posiblemente a la capacidad del TSPP de desplazar la materia orgánica adsorbida en la superficie de las nanopartículas. Por todo ello, se aplicó una concentración de 20 mM de TSPP para la extracción conjunta de AgNPs y AuNPs. En consecuencia, este método se podría utilizar para extraer simultáneamente AgNPs y AuNPs de lodos de depuradora mediante un único procedimiento de extracción. Como se ha comentado anteriormente el proceso de extracción empleado debe cumplir dos requisitos: 1) que la extracción de las nanopartículas sea cuantitativa, y 2) que esta extracción no modifique sus características fisicoquímicas originales. Sin embargo, aunque es cierto que los porcentajes de extracción de AgNPs y AuNPs no fueron cuantitativos, se debe tener en cuenta que en el caso de las nanopartículas esto no es una tarea fácil ya que, es necesario controlar sus características fisicoquímicas para evitar que estas se alteren, y así las conclusiones obtenidas se correspondan con las nanopartículas en su forma original. Asimismo, aunque los histogramas de distribución de tamaño de ambas nanopartículas

tras su extracción con agua Milli-Q y TSPP mostraron algunas diferencias con respecto al histograma de las suspensiones de referencia, su tamaño medio no se vio alterado, indicando además que la concentración de TSPP no afectó al proceso de centrifugación de las nanopartículas.

Con el objetivo de evaluar si este proceso de extracción había modificado las propiedades de las AgNPs y las AuNPs, los extractos obtenidos fueron analizados mediante las técnicas de TEM y DLS. Las micrografías de estos extractos, adquiridas mediante TEM, mostraron que estas nanopartículas no experimentaron ningún cambio durante el proceso de extracción, ya que se observaron nanopartículas esféricas, dispersas y con un tamaño medio de (62 ± 9) nm para las AgNPs y (80 ± 10) nm para las AuNPs, propiedades que no mostraron diferencias significativas en comparación con las dispersiones de referencia. Sin embargo, los análisis por DLS proporcionaron una distribución de tamaño de (440 ± 35) nm. Como es bien sabido la técnica DLS proporciona información acerca del tamaño hidrodinámico (el metal más el recubrimiento que lo rodea), por tanto, no tiene por qué coincidir con el tamaño del *core* proporcionado por la técnica TEM. Por otra parte, las medidas de las dispersiones de nanopartículas por DLS adquieren una mayor dificultad a medida que se incrementa la complejidad del extracto. En el caso concreto del extracto objeto de estudio, la presencia de partículas de gran tamaño junto con las nanopartículas de interés dificulta la capacidad de la técnica para detectar la presencia de partículas más pequeñas entre las grandes, como consecuencia de la dependencia de la luz dispersada con el tamaño. Por tanto, aunque la extracción de estas nanopartículas no fue cuantitativa, sí se consiguió llevar a cabo su extracción sin modificar sus propiedades fisicoquímicas (tamaño, forma y estado de agregación) con respecto a las suspensiones originales de referencia.

Finalmente, se realizó un estudio de estabilidad de las nanopartículas en los lodos durante un periodo de 12 meses, en el que se evaluaron modificaciones en su tamaño y en su forma química. Los resultados obtenidos mediante splCP-MS evidenciaron que ambos tipos de nanopartículas no experimentaron cambios en sus respectivos tamaños. Sin embargo, en la evaluación de su estabilidad, en base a la concentración en número de partículas, se observó un comportamiento diferente en ambos tipos de nanopartículas. El número de AgNPs se redujo desde el 70%, tras 3 meses de exposición hasta el $(54,9 \pm 0,2)$ % y $(45,1 \pm 0,1)$ %, a los 6 y 12 meses de almacenamiento, respectivamente. Esta

disminución en el número de partículas estuvo acompañada por un aumento del porcentaje de plata iónica que pasó del $(14 \pm 1) \%$ a los 6 meses al $(24 \pm 2) \%$ a los 12 meses, indicativo del proceso de oxidación que estaban experimentando las AgNPs en la matriz de lodo con el paso del tiempo. Con respecto a las AuNPs, no se observaron variaciones ni en su tamaño ni en su concentración en número de partículas. Los resultados mostraron, por tanto, que las AgNPs fueron menos estables que las AuNPs en el lodo de depuradora durante los 12 meses que duró el ensayo. Hay que indicar que la técnica splCP-MS proporcionó los límites de detección adecuados para la realización de los estudios de estabilidad a 12 meses, al obtenerse unos LOD en tamaño y en concentración en número de 23 nm y $3,12 \times 10^9$ partículas kg^{-1} para las AgNPs, y 16 nm y $1,38 \times 10^9$ partículas kg^{-1} para las AuNPs.

Por último, los posibles cambios en la estructura y en la composición de ambas nanopartículas durante los 12 meses fueron estudiados mediante difracción de rayos X. En el caso de la Ag sólo se consiguió identificar un incremento de la presencia de Ag_2O_3 , en el lodo enriquecido con el paso del tiempo, mientras que desafortunadamente, con relación al oro no fue posible llevar a cabo la identificación de sus fases.

Continuando con los estudios de caracterización de las nanopartículas en sistemas biológicos y medioambientales, la parte más extensa de la presente Tesis Doctoral es la relacionada con las SeNPs. Con este tipo de nanopartículas se ha incrementado el grado de complejidad en los estudios al evaluar su efecto y transformaciones en sistemas vivos como plantas y bacterias. Las SeNPs están adquiriendo un creciente interés debido a sus capacidades antioxidante y antimicrobiana, junto con su potencial efecto anticarcinogénico. Estas propiedades unidas a la menor toxicidad que muestran, en comparación con el resto de las especies orgánicas e inorgánicas de este elemento, han hecho que sean utilizadas en diferentes aplicaciones, algunas de ellas relacionadas con el campo de la biomedicina y la agricultura (nanofertilizante). Sin embargo, aunque resulta evidente que este tipo de nanopartículas llegarán al medioambiente en un medio plazo, las investigaciones centradas en evaluar sus transformaciones y efectos sobre el metabolismo de los organismos vivos con los que interaccionan son aún muy escasas. En los pocos estudios recogidos en la bibliografía sobre transformaciones de SeNPs en sistemas biológicos (sistemas celulares, bacterias y/o plantas) se ha observado que dichas nanopartículas se transforman a otras formas de selenio tanto de naturaleza

inorgánica (selenito) como orgánica, distinguiéndose en este último caso entre compuestos volátiles (DMSe, DESe y DMDSe) y no volátiles, tales como los selenoaminoácidos (SeMet, SeMetSeCys y SeCys).

Uno de los problemas asociados a este tipo de estudios es la cuantificación *in vivo* de las especies volátiles de selenio liberadas por sistemas biológicos suplementados con SeNPs. En la presente Tesis Doctoral se desarrolló una metodología basada en HS-SPME combinada con GC-MS y calibración interna en la fibra de SPME, para la determinación y cuantificación de las especies orgánicas volátiles de selenio. Para este estudio se seleccionaron las especies DMSe, DESe, DMDSe y el d^6 -DMS, este último como patrón interno al no encontrarse disponibles comercialmente especies volátiles de selenio en su forma deuterada y, además, por presentar unas características fisicoquímicas similares al DMSe.

El procedimiento analítico desarrollado consistió en la extracción de las especies de selenio sobre la fibra de SPME (carboxen/Polidimetilsiloxano (PDMS, *Polydimethylsiloxane*)), seguida de la extracción del patrón interno (procedente de otro vial) sobre esa misma fibra, y posterior separación y determinación por GC-MS. La optimización de los parámetros experimentales se llevó cabo haciendo uso de un diseño factorial de dos factores y dos niveles más tres réplicas en el punto central. Debido a la elevada volatilidad del patrón interno, y a la mejor reproducibilidad de la señal al trabajar con la relación de áreas entre el analito y dicho patrón, se seleccionaron como respuestas a optimizar el tiempo de retención del d^6 -DMS y los factores de respuesta de las especies DMSe, DESe y DMDSe. La aplicación del diseño factorial, arriba mencionado, permitió llevar a cabo la optimización simultánea de ambas respuestas en función de las variaciones del tiempo de extracción, y de la temperatura de desorción, parámetros estudiados en un rango comprendido entre 10-30 minutos y 240-300°C, respectivamente. El análisis de superficie de respuesta, teniendo en cuenta que el objetivo era maximizar ambas respuestas, mostró que, para obtener el mayor tiempo de retención para el patrón interno, el tiempo de extracción y la temperatura de desorción debían tener los valores más bajos del intervalo seleccionado. En cambio, para el factor de respuesta de cada una de las especies de selenio fue necesario que tanto el tiempo de extracción, como la temperatura de desorción tuvieran los valores más altos de los seleccionados. Ante esta situación contrapuesta se recurrió a la función de deseabilidad, que marca una optimización de las

respuestas a optimizar teniendo en cuenta la importancia que se ha asignado al tiempo de extracción y a la temperatura de desorción, en este caso. A través de dicha función se establecieron unas condiciones óptimas de compromiso de 26 minutos para el tiempo de extracción y 300°C para la temperatura de desorción y que proporcionaron un ajuste al modelo estadístico del 81,55%. Bajo estas condiciones, los valores predichos por el modelo para las respuestas a optimizar (tiempo de retención de 2,27 minutos y factores de respuesta de 0,147; 0,147 y 0,049 para DMSe, DESe y DMDSe, respectivamente) y los valores obtenidos experimentalmente (tiempo de retención de $(2,30 \pm 0,03)$ minutos y factores de respuesta de $(0,147 \pm 0,005)$ para DMSe, $(0,11 \pm 0,01)$ para DESe y $(0,049 \pm 0,002)$ para DMDSe) estuvieron dentro del porcentaje de deseabilidad y no mostraron diferencias significativas tras un análisis estadístico con un nivel de confianza del 95%.

La validación de este método se llevó a cabo en términos de intervalo de linealidad, límite de detección y de cuantificación, y precisión dentro del día y entre días para las especies DMSe y DMDSe. En ambos casos se obtuvo una buena correlación lineal con coeficientes de determinación de 0,999 en un rango de concentración de 1,2- 300 ng para DMSe y de 0,990 en un rango comprendido entre 0,1 y 20 ng para DMDSe, y unos límites de detección y de cuantificación del orden de los ng, que fueron tres veces más pequeños para el DMDSe. Aunque los valores de precisión dentro del día y entre los días fueron del 8% y 7% para el DMSe y del 11% y 12% para el DMDSe, respectivamente, se consideraron resultados satisfactorios al incluir la variabilidad entre las dos fibras de carboxen/PDMS, que se utilizaron para la determinación de estos parámetros.

Una vez optimizado el procedimiento analítico se pasó a la detección y cuantificación *in vivo* de especies volátiles de selenio producidas por plantas expuestas a SeNPs. Las plantas seleccionadas para este estudio fueron *Raphanus sativus* y *Brassica juncea*. El rábano (*Raphanus sativus*) fue seleccionado por ser una planta fácilmente cultivable, de rápido crecimiento y que acumula metales/metaloideos en la raíz y la parte aérea. La especie *Brassica juncea* se escogió por tratarse de una planta acumuladora de selenio capaz de acumular elevadas cantidades de este elemento sin mostrar síntomas de toxicidad.

Las SeNPs empleadas en este estudio (y en los estudios que se detallarán a continuación tanto con plantas como con bacterias) se sintetizaron en el laboratorio mediante la reducción del selenito sódico en presencia de ácido ascórbico, y empleando

quitosano como agente estabilizante. Al ser utilizadas en un medio distinto al medio de síntesis, su estabilidad fue evaluada mediante TEM en distintos escenarios: en el sistema hidropónico seleccionado para el cultivo de las plantas, es decir en la disolución nutritiva Hoagland, en la perlita utilizada como sustrato inerte, y en la combinación de la disolución nutritiva y la perlita. Las micrografías obtenidas no mostraron diferencias significativas entre el medio de síntesis y el medio hidropónico, en cuanto al tamaño, la morfología y el estado de agregación de las SeNPs, ya que en todos los casos se obtuvieron nanopartículas esféricas monodispersas y de un diámetro de partícula de (50 ± 5) nm.

Las plantas seleccionadas se cultivaron en el sistema hidropónico mencionado arriba, y transcurridas 4-5 semanas desde el crecimiento de las plantas se incorporaron 5 mg Se L^{-1} en forma de SeNPs a la disolución nutritiva. Para estudiar y cuantificar *in vivo* la formación de especies orgánicas volátiles de selenio se colocó una caja de metacrilato sin base sobre las plantas. La caja disponía de varios pasamuros que facilitaron el alojamiento de un septum y, por tanto, la introducción de la fibra de SPME para la extracción en espacio de cabeza de las especies de selenio producidas por las plantas. La aplicación de las condiciones optimizadas y descritas previamente evidenció que a partir de las primeras 24 horas de exposición, *Raphanus sativus* fue capaz de transformar las SeNPs en DMSe, cuya concentración aumentó desde los (16 ± 3) ng hasta los (163 ± 39) ng, obtenidos tras su estabilización a las 120 horas de exposición. Por su parte, la especie DMDS₂Se comenzó a ser detectada a partir de las 48 horas, en una concentración que pasó de los $(0,49 \pm 0,03)$ ng a los $(0,6 \pm 0,1)$ ng alcanzados a las 120 horas, tiempo al que se produjo la estabilización de la señal. En lo que respecta a la especie *Brassica juncea*, también se demostró su capacidad para transformar las SeNPs en DMSe y DMDS₂Se, a partir de las 24 y 48 horas de exposición, respectivamente. Asimismo, la cuantificación de ambas especies reflejó que mientras la concentración de DMSe aumentó desde los $(3,6 \pm 0,7)$ ng hasta los (116 ± 13) ng a las 167 horas de exposición, la cantidad de DMDS₂Se pasó de $(1,0 \pm 0,4)$ ng a $(2,2 \pm 0,9)$ ng durante el mismo tiempo de estudio. La precisión de los resultados, al cuantificar las especies orgánicas volátiles de selenio producidas por ambas especies de plantas, se puede considerar aceptable, ya que para el muestreo se utilizaron tres soportes con una fibra de carboxen/PDMS cada uno, que tomaron muestras en diferentes regiones del espacio de cabeza de la caja de metacrilato.

Para evaluar la existencia de diferencias en la formación de DMSe y DMDSe se realizó un estudio mediante ANOVA multifactorial, donde el tiempo de exposición (24, 48, 72, 120, 144 y 167 horas) y las especies de plantas (*Raphanus sativus* y *Brassica juncea*) se seleccionaron como factores. Los resultados de estos análisis evidenciaron, por un lado, que el tiempo de exposición influyó significativamente en la producción de ambas especies de selenio, al encontrarse una correlación lineal entre la cantidad de DMSe y DMDSe con el tiempo. Y por otro, que las especies de plantas solo influyeron de manera significativa en la formación de DMSe, donde se observó que *Raphanus sativus* liberaba mayores cantidades de esta especie. Esto puede deberse a que esta especie de planta, a diferencia de *Brassica juncea*, no es una planta acumuladora de selenio y, por tanto, para un mismo nivel de concentración de este elemento, posiblemente libera mayores cantidades de DMSe como mecanismo de detoxificación.

En base a estos resultados se demuestra que las SeNPs (análogamente a otras especies orgánicas e inorgánicas de este elemento) en contacto con las plantas son transformadas en especies orgánicas volátiles de selenio, cuya concentración puede ser monitorizada y cuantificada *in vivo* a través de este sencillo método basado en la aplicación de HS-SPME-GC-MS y calibración interna en fibra de SPME.

Con el fin de ampliar el conocimiento a cerca del efecto de las SeNPs sobre las plantas *Raphanus sativus* y *Brassica juncea*, se procedió a evaluar la transformación de las SeNPs a otras especies de selenio no volátiles (selenoaminoácidos), y a estudiar la influencia de estas nanopartículas en la incorporación de metales esenciales por parte de las plantas. La determinación del contenido total de selenio en la raíz y en la parte aérea de las plantas mediante ICP-MS, previa mineralización ácida en un horno de microondas, evidenció que *Raphanus sativus* presentó una mayor capacidad de acumulación de selenio que *Brassica juncea*. La aplicación del análisis ANOVA multifactorial puso de manifiesto que no había diferencias significativas en el contenido de selenio entre la raíz y la parte aérea de ambas plantas. Estos resultados junto con el factor de translocación, que fue inferior a 1 en ambos casos, indicaron la baja translocación de las SeNPs. Este comportamiento es muy parecido al observado en estudios similares donde se emplea selenito como fuente de selenio. Sin embargo, existen estudios que sugieren que el mecanismo de incorporación de ambas especies de selenio es completamente diferente, siendo la incorporación del selenito por difusión activa y la de las SeNPs por difusión

pasiva. Esto significa que la incorporación del selenito tendría lugar a través de un proceso rápido, dinámico y unidireccional, que requiere del consumo de energía por parte de las células para su transporte desde regiones con una menor concentración a regiones con mayores niveles de concentración. Además, este mecanismo de incorporación es altamente selectivo, se ve influido por inhibidores metabólicos y requiere de proteínas portadoras para que se lleve a cabo. Por el contrario, las SeNPs serían incorporadas mediante un proceso físico y comparativamente más lento, en el que estas partículas se mueven al azar hacia zonas donde su concentración es menor y sin ningún gasto de energía por parte de las células. Asimismo, este mecanismo no solo es en parte no selectivo, sino que no precisa de proteínas portadoras y tampoco se ve afectado por inhibidores metabólicos. Por otro lado, cabe destacar que, a pesar de que la perlita, utilizada como sustrato, retuvo entre el 20-30% del selenio añadido, los estudios en sistemas hidropónicos suponen una primera aproximación, que proporcionan información sobre la interacción directa entre las plantas y el elemento a estudiar y, además, permiten la comparación de resultados. En líneas generales los estudios en hidropónico se utilizan como paso previo a experimentos en el suelo, donde la acumulación del selenio depende de un mayor número de factores como son las características del suelo, la disponibilidad del elemento en esa superficie, las prácticas agronómicas, la forma de aplicación del selenio (en suelo o través de las hojas), la presencia de iones competidores e incluso de microorganismos, etc.

La evolución de la capacidad de transformación de las SeNPs por parte de las plantas a especies no volátiles de selenio (selenoaminoácidos) se llevó a cabo mediante hidrólisis enzimática seguida de la aplicación de HPLC-ICP-MS y HPLC-ESI-MS/MS. Este esquema experimental es habitualmente empleado en estudios de especiación de selenio. La extracción de las especies es una de las etapas más críticas en los estudios de especiación de este elemento, ya que no solo se ha de mantener la identidad de las especies, sino que su extracción ha de ser cuantitativa. La hidrólisis enzimática con proteasa XIV e incubación a 37°C durante 24 horas es el procedimiento más común para la extracción de las especies de selenio, ya que esta proteasa hidroliza los enlaces peptídicos al estar compuesta por al menos tres sustancias activas proteolíticas, como la serina proteasa extracelular. Además, algunos de los aminoácidos más importantes del selenio son selenoaminoácidos unidos a proteínas. Con el fin de disminuir los tiempos de la hidrólisis enzimática se han propuesto otros procedimientos alternativos a la incubación

durante 24 o 48 horas como es el empleo de la sonda de ultrasonidos, donde el tiempo de tratamiento se reduce al orden de minutos. Sin embargo, en muchos casos la incubación consigue mejorar los resultados proporcionados por la sonda en términos de eficiencia de extracción, además de proporcionar mejores perfiles cromatográficos posiblemente debido a una más eficiente actuación de las enzimas con tiempos de actuación más prolongados. En base a esto, la extracción de las especies de la raíz y de la parte aérea de ambas especies de plantas se llevó a cabo mediante hidrólisis enzimática con proteasa XIV e incubación a 37°C durante 24 horas. Mediante este procedimiento se obtuvo una eficiencia de extracción del $(90 \pm 11) \%$, tanto en la raíz como en la parte aérea de ambas plantas. Los extractos obtenidos se analizaron por HPLC-ICP-MS, y con el fin de mejorar la identificación de las especies de selenio se emplearon dos mecanismos cromatográficos de separación, uno de intercambio aniónico utilizando la columna PRP-X100, y otro de fase inversa a través de la columna EVO-C18. La identificación de estas especies se realizó comparando sus tiempos de retención con los de sus respectivos patrones comerciales, y por experimentos de enriquecimiento de los extractos. Los resultados obtenidos por ambas columnas, a partir de los perfiles cromatográficos de los extractos enzimáticos, evidenciaron que la distribución del selenio acumulado tanto en la raíz como en la parte aérea de *Raphanus sativus* y *Brassica juncea* fue del 60% para SeMetSeCys y del 10% para SeMet. Sin embargo, aunque la SeMetSeCys y la SeMet fueron las especies mayoritarias, otras especies de selenio minoritarias, que no se pudieron identificar por la falta de patrones comerciales, fueron detectadas en la totalidad de las muestras al analizar los extractos por ambos mecanismos de separación cromatográfica. Asimismo, la especie SeMet se puede transformar a SeMetO durante el proceso de extracción de las especies, pudiendo dar lugar su presencia a errores en la cuantificación de la propia SeMet. La presencia de SeMetO no pudo establecerse con claridad ya que, en los dos mecanismos de separación cromatográfica seleccionados en este trabajo, coeluye con la selenocistina. Aunque la recuperación de las especies de selenio en ambas columnas fue del 70%, este valor podría aumentar si se tiene en cuenta que para su obtención solo se consideraron las especies de las que se disponía de patrones y que fueron cuantificadas.

A pesar de que HPLC-ICP-MS es una técnica sensible, que tradicionalmente se ha utilizado para la especiación de selenio en muestras con distinto grado de complejidad, no permite realizar una identificación inequívoca de las especies. En los últimos años,

técnicas como HPLC-ESI-MS/MS se han incorporado a los estudios de especiación para la correcta identificación de las especies. En el caso objeto de estudio, los extractos que contenían las especies de selenio fueron analizados por HPLC-ESI-MS/MS empleando una columna EVO-C18, análoga a la empleada en los análisis por HPLC-ICP-MS. El espectro de masas de las especies SeMet, SeMetO y SeMetSeCys junto con la fragmentación del ion molecular seleccionado, y datos bibliográficos permitieron seleccionar las transiciones con el fin de confirmar la presencia de estas especies de selenio. A través del análisis por monitorización de reacciones múltiples, se confirmó la presencia de SeMet, SeMetSeCys y SeMetO, descartándose por tanto la presencia de SeCys, tanto en la raíz como en la parte aérea de *Raphanus sativus* y *Brassica juncea*. Además, esta técnica permitió identificar una de las especies desconocidas, observadas previamente por HPLC-ICP-MS, como γ -Glu-Se-MetSeCys (selenoaminoácido no proteinogénico). La presencia de dicha especie ha sido descrita en las plantas suplementadas con selenio y cuyas transiciones se confirmaron con datos aportados por la bibliografía.

Finalmente se evaluó el efecto de las SeNPs sobre la incorporación por parte de las plantas de los metales esenciales (Fe, Cu, Zn y Mo) que componían la solución nutritiva de crecimiento. Un estudio estadístico mediante ANOVA multifactorial considerando como factores las diferentes partes de las plantas (raíz y parte aérea) y el tratamiento aplicado (presencia y ausencia de SeNPs) mostró que el Zn fue el único elemento cuya concentración, y por tanto su incorporación, se vio afectada significativamente por el crecimiento de las plantas en contacto con estas nanopartículas (se producía una disminución de la concentración). En cuanto al resto de metales, este análisis indicó que la distribución del Mo fue estadísticamente diferente en ambas partes con independencia del tratamiento aplicado para el cultivo de las plantas. Dada la gran variedad de datos y la complejidad que suponía su tratamiento solamente mediante ANOVA, se llevó a cabo un PCA para mejorar la interpretación de los resultados, y poder así agrupar, caracterizar y relacionar las diferentes partes de las plantas en base a su contenido de selenio, SeMet, SeMetSeCys y metales esenciales. En este sentido, mientras en las plantas cultivadas en ausencia de selenio la raíz se caracterizó por concentraciones más elevadas de Fe y Cu, y la parte aérea por mayores concentraciones de Mo, sus análogos cultivados en presencia de SeNPs presentaron un bajo contenido en Zn y un alto contenido en selenio, SeMet y SeMetSeCys para la raíz, y un bajo contenido en Fe y en Cu para la parte aérea. Con el propósito de tener una visión general sobre el efecto de las SeNPs en el global de

las especies de plantas, de nuevo se realizó un estudio de PCA debido a la complejidad de los resultados tras incrementar el número de variables para comparar el global de las especies *Raphanus sativus* y *Brassica juncea*, en base al contenido de selenio, SeMet, SeMetSeCys, DMSe, DMDSe y metales esenciales. En este aspecto, en ausencia de SeNPs, la especie *Raphanus sativus* se caracterizó por presentar altos niveles de Fe, mientras la especie *Brassica juncea* mostró mayores concentraciones de Cu y Zn. Sin embargo, el crecimiento de ambas especies de plantas en presencia de las SeNPs provocó una disminución en los contenidos de Zn y de Cu en el caso de *Raphanus sativus*, y un aumento en los niveles de Mo por parte de *Brassica juncea*, posiblemente a expensas de reducir la incorporación del Fe. Atendiendo a las diferentes formas en que se encontraba el selenio, SeMetSeCys y DMSe fueron las formas en las que se encontró fundamentalmente en la especie *Raphanus sativus* frente a la especie *Brassica juncea*, cuya diferenciación residía en el contenido de SeMet y DMDSe. Teniendo en cuenta que la SeMet y la SeMetSeCys son los precursores de las especies orgánicas volátiles DMSe y DMDSe respectivamente, estos resultados son consistentes ya que un aumento en el contenido de DMSe conlleva una disminución de los niveles de SeMet, de la misma manera que la disminución del contenido de SeMetSeCys se puede asociar con un aumento de los niveles de DMDSe. Además, otro dato a tener en cuenta es que la especie DMDSe es formada principalmente por las plantas hiperacumuladoras de selenio, como es en este caso la planta *Brassica juncea*. Por tanto, estos estudios estadísticos demuestran que, aunque los estudios mediante ANOVA se basen en análisis cuantitativos, cuando se tiene una gran variedad de datos y un elevado número de factores, la situación se vuelve bastante compleja y se debe recurrir a herramientas como PCA para conseguir evaluar esa gran variedad de datos y factores, y así tener una visión cualitativa global del problema.

Los resultados obtenidos tras los estudios anteriores pusieron de manifiesto que la modificación de uno de los oligoelementos esenciales, como es el caso del selenio, podría alterar la concentración de los demás, con el fin de mantener el equilibrio del sistema redox. Además, esta alteración podría llegar a influir en el sistema antioxidante de las plantas, donde elementos como el selenio, el Cu, el Fe y el Zn desempeñan un papel importante al formar parte de diversas enzimas antioxidantes.

Los estudios de interacción de SeNPs con sistemas biológicos se continuaron seleccionando diferentes especies de bacterias. En este sentido se estudiaron dos tipos de bacterias: bacterias ácido-lácticas (de gran importancia en la industria alimentaria para la producción de alimentos basados en procesos fermentativos), y *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (de importancia medioambiental, alimentaria y clínica por su capacidad de formar asociaciones de bacterias o biopelículas para incrementar su supervivencia). La interacción entre nanopartículas y bacterias está recogida en muchos trabajos en la bibliografía, siendo uno de los aspectos más relevantes la síntesis biogénica de nanopartículas mediada por bacterias. Muchos de estos microorganismos cuando se exponen a concentraciones elevadas de metales (Ag; Au) y metaloides (Se; Te), que resultan tóxicas para su supervivencia, activan un mecanismo de detoxificación que consiste en la eliminación de estos metales y metaloides en forma nanoparticulada. De hecho, este mecanismo de detoxificación se utiliza como procedimiento de síntesis biogénica, y ha adquirido un gran interés en los últimos años ya que está en concordancia con los principios de la Química Verde (poco consumo de reactivos y disolventes, condiciones suaves de síntesis, y biocompatibilidad de las nanopartículas generadas).

De entre las diferentes especies bacterianas, las bacterias ácido-lácticas se caracterizan por poseer el estado de generalmente reconocido como seguro (GRAS, *Generally Recognize As Safe*) y de presunción cualificada de seguridad (QPS, *Qualified Presumption of Safety*) que permite su empleo en las fermentaciones alimentarias. Por tanto, esto las convierte en candidatas para llevar a cabo la síntesis biogénica de SeNPs no solo porque se trata de bacterias de fácil y segura manipulación, sino porque también han demostrado ser capaces de reducir el selenito a selenio elemental a través de la actividad de las enzimas glutatión reductasa y alcohol deshidrogenasa.

La heterogeneidad en el metabolismo y en la capacidad de resistencia al selenio por parte de estas bacterias, hizo que se seleccionaran distintas cepas: homofermentativas (*Lactobacillus acidophilus* CRL 636 y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 656) y heterofermentativas (*Lactobacillus reuteri* CRL 1101) con el fin de ser utilizadas para la síntesis de SeNPs biogénicas, y su posterior caracterización en base a su tamaño y morfología, y cuantificación (en términos de concentración en número y en masa) empleando una plataforma multitécnica.

Las distintas especies bacterianas se cultivaron en presencia de 25 mg Se L⁻¹, en forma de selenito. Transcurridas 24 horas de crecimiento, *Lactobacillus reuteri* fue la cepa que acumuló un mayor contenido de selenio, (79 ± 3) %, seguida por *Lactobacillus acidophilus*, (41,2 ± 0,6) %, y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, (28 ± 2) %. En todos los casos se observó un cambio en la coloración del medio de cultivo que se tornó de amarillo a rojo indicando la posible formación biogénica de SeNPs por parte de las distintas cepas bacterianas. El análisis del pellet bacteriano por TEM combinada con EDX demostró la formación de SeNPs esféricas con un cierto grado de aglomeración por parte de todas las cepas de *Lactobacillus*. Los tamaños de las nanopartículas sintetizadas por las diferentes especies bacterianas fueron similares entre sí: (176 ± 13) nm para *Lactobacillus acidophilus*, (160 ± 24) nm para *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y (130 ± 23) nm, *Lactobacillus reuteri*. Sin embargo, tanto la distribución de tamaño como la morfología de las SeNPs biogénicas mostraron ser dependientes de los niveles de selenio a los que se expusieron las bacterias. Un incremento de la concentración a 100 mg Se L⁻¹ hizo que mientras *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus reuteri* sintetizaron SeNPs esféricas con un tamaño alrededor de 300 nm, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* produjo SeNPs con forma de estrella. Asimismo, las micrografías proporcionadas por TEM evidenciaron un daño en la pared celular bacteriana tanto de *Lactobacillus acidophilus* como de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, y la excreción de sustancias exopoliméricas en *Lactobacillus reuteri*, a estos niveles de concentración de selenio. En este último caso, la excreción de exopolímeros se asocia a la producción de biopelículas (asociaciones o colonias de bacterias) como mecanismo de defensa para aumentar su capacidad de supervivencia ante agentes antimicrobianos y/o condiciones de estrés.

Una correcta caracterización de las SeNPs biogénicas generadas implica su separación previa del pellet bacteriano, ya que la presencia de bacterias podría dificultar su caracterización, fundamentalmente con técnicas de dispersión de luz, al presentar un mayor tamaño que las SeNPs sintetizadas. Esta separación no es una tarea fácil si se tiene en cuenta que en el caso de *Lactobacillus reuteri*, bacteria seleccionada por su mayor capacidad para acumular selenio y por sobrevivir en presencia de elevados niveles de este elemento, las SeNPs se localizaban en el interior de las bacterias, lo que requería un proceso de lisis de la pared bacteriana. Además, el gran tamaño de las bacterias dificultó su separación de las nanopartículas por filtración. Aunque se ensayaron diferentes

métodos de separación basados en esterilización por autoclave o sonicación mediante sonda de ultrasonidos, los resultados no fueron satisfactorios, ya que las SeNPs permanecieron ocluidas en el interior de las bacterias y, por tanto, retenidas en los filtros tras su filtrado. Sin embargo, la aplicación de la estrategia basada en utilizar una mezcla de 0,1% de SDS y 1 M de NaOH favoreció la liberación de las SeNPs del interior de la bacteria. Estos resultados se atribuyeron a un efecto sinérgico entre el surfactante, que permeabilizó la pared celular bacteriana, y el NaOH, que contribuyó a esa liberación de las nanopartículas al deshidratar los orgánulos de la bacteria. El uso de otros surfactantes como el surfynol, no mejoraron el proceso de separación posiblemente debido a su menor capacidad de permeabilización de la pared bacteriana en comparación con el SDS. El pretratamiento, basado en el uso conjunto del surfactante con NaOH, facilitó la posterior separación de las SeNPs del cultivo bacteriano a través de dos etapas de filtración consecutivas con filtros de nylon de 0,45 μm y 0,22 μm , respectivamente. La evaluación del contenido total de selenio después de cada etapa de filtración mostró pérdidas de las SeNPs debidas a su adsorción en los filtros de membrana. La primera filtración a través de filtros con un tamaño de poro de 0,45 μm proporcionó un porcentaje de recuperación del $(11,6 \pm 0,6) \%$, mientras que en la segunda etapa con los filtros de 0,22 μm la recuperación fue del $(12,8 \pm 0,2) \%$.

Una vez aisladas las SeNPs biogénicas, su caracterización en tamaño a través del análisis por TEM no mostró diferencias significativas entre las distribuciones de tamaño y las morfologías obtenidas antes y después del proceso de separación, sugiriendo que dicho proceso no alteraba estas propiedades. Asimismo, el patrón de difracción de electrones obtenido con esta misma técnica indicó que estas nanopartículas biogénicas carecían de estructura microcristalina. Los análisis mediante DLS y NTA permitieron completar la información relativa al tamaño de estas nanopartículas, al proporcionar valores sobre su tamaño hidrodinámico. En el caso del DLS, el valor obtenido fue de $(258 \pm 4) \text{ nm}$. Sin embargo, el resultado podía ser erróneo debido a la presencia de restos bacterianos que acompañaban a las SeNPs biogénicas. Asimismo, es conocido las dificultades que presenta esta técnica a la hora de resolver con precisión muestras polidispersas. Sin embargo, el índice de polidispersidad de 0,2 indicó que las SeNPs sintetizadas por *Lactobacillus reuteri* no estaban agregadas en su mayoría, sugiriendo una muestra monodispersa con una distribución muy estrecha. Los resultados obtenidos a través del análisis por NTA mostraron que las SeNPs biogénicas eran nanopartículas

monodispersas con un tamaño de (187 ± 56) nm, coincidiendo con los datos proporcionados por DLS. La diferencia entre las desviaciones estándar, al comparar las medias del tamaño hidrodinámico proporcionadas por ambas técnicas, se atribuyó a la manera en que cada una mide el tamaño hidrodinámico. En DLS la media se obtiene a partir de un gran número de partículas idénticas dando lugar a mediciones precisas y repetibles, mientras que en NTA a la hora de establecer la media, la distribución de una población de partículas más pequeñas puede proporcionar resultados estadísticos menos robustos. Para confirmar que el tamaño obtenido por estas dos técnicas de dispersión de luz se correspondía con las SeNPs, se decidió caracterizar la muestra por AF⁴ acoplada *online* tanto a DAD como a ICP-MS. En la separación por AF⁴-ICP-MS, la fracción que contenía la SeNPs se recogió y caracterizó por DLS en términos de tamaño e índice de polidispersidad, obteniéndose valores de (247 ± 14) nm y 0,239, respectivamente, los cuales fueron comparables con los resultados obtenidos sin la separación previa por AF⁴. El aumento en la desviación estándar del tamaño y del índice de polidispersidad, al comparar los valores, sugirió un cierto grado de aglomeración de las SeNPs biogénicas durante su separación por AF⁴, posiblemente asociado al mecanismo de separación en que se basa dicha técnica. Asimismo, el acoplamiento *offline* del AF⁴ y el ICP-MS permitió determinar la concentración en masa de la fracción recogida, la cual estuvo en consonancia con la concentración obtenida durante el acoplamiento *online*, del sistema AF⁴-ICP-MS.

Cuando se trabaja con nanopartículas la Unión Europea recomienda establecer su concentración en número más que su concentración en masa, por tanto, aprovechando la capacidad del NTA para contar el número de partículas directamente en la disolución, se obtuvo una concentración de $(4,7 \pm 0,3) \times 10^9$ SeNPs biogénicas mL⁻¹. Al tratarse de nanopartículas esféricas, este valor de concentración fue corroborado mediante su cálculo teórico a partir de la concentración en masa de selenio, obtenida por ICP-MS, la densidad de este elemento y su tamaño adquirido por TEM. En este sentido, la concentración teórica en el medio de cultivo fue de $(5,10 \pm 0,08) \times 10^9$ SeNPs biogénicas mL⁻¹, mostrando buena correlación con el valor experimental.

Los resultados obtenidos evidencian que, para poder evaluar la aplicabilidad de las nanopartículas sintetizadas por microorganismos, en este caso SeNPs a través de cepas de bacterias ácido-lácticas, es necesario realizar una correcta caracterización de dichas

nanopartículas utilizando una plataforma multitécnica y métodos que permitan su separación previa de la matriz microbiana que no alteren sus propiedades fisicoquímicas.

Como se ha comentado anteriormente la interacción entre SeNPs y bacterias se estudió además con dos bacterias de interés medioambiental, alimentario y clínico como son *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. En este caso, la investigación se centró en la transformación de SeNPs a especies de este elemento tanto de naturaleza volátil como no volátil, de forma análoga a los estudios realizados con las plantas y comentados previamente en esta discusión integradora. Con este fin, las bacterias se cultivaron en presencia de selenio, tanto en forma de selenito como de nanopartículas, a 1 y 2 mg Se L⁻¹, después de comprobar mediante TEM que el tamaño, la morfología y el estado de agregación de las SeNPs no se vio modificado por el medio de cultivo bacteriano (Luria-Bertani) después de estar 24 horas en contacto. El estudio de viabilidad bacteriana, en función de las diferentes formas de selenio y del nivel de concentración suplementado, mostró que el crecimiento de ambas especies bacterianas no se vio afectado significativamente después de 24 horas por ninguno de los factores mencionados. Sin embargo, al comparar la viabilidad celular bacteriana de ambas especies se encontraron diferencias significativas con independencia de su crecimiento en presencia o en ausencia de alguna de las formas de selenio seleccionadas. Estos resultados se asociaron a las características de las especies bacterianas, al ser *Escherichia coli* una bacteria Gramnegativa y *Staphylococcus aureus* una bacteria Grampositiva.

La capacidad de acumulación de ambas especies bacterianas mostró ser mayor cuando se cultivaron en presencia de 1 mg Se L⁻¹ en forma de SeNPs. De hecho, los porcentajes de acumulación obtenidos en el caso de *Escherichia coli* fueron de (49,7 ± 0,8) % para SeNPs y de (35 ± 5) % para selenito, mientras que en *Staphylococcus aureus* se obtuvieron porcentajes de (39 ± 1) % y (15 ± 1) % para SeNPs y selenito, respectivamente. El aumento de la concentración de selenio a 2 mg L⁻¹ desencadenó efectos diferentes, que fueron de nuevo función tanto de la especie bacteriana como de la forma de selenio suministrada. En *Escherichia coli* ese incremento de la concentración solo se reflejó en el porcentaje de acumulación con selenito, que se incrementó al (58,3 ± 0,8) %, a diferencia de *Staphylococcus aureus*, donde ambos porcentajes se vieron afectados alcanzando valores de (55 ± 3) % para SeNPs y (45 ± 3) % para selenito. Por tanto, quedó demostrado que ambas bacterias acumularon una cantidad bastante elevada

de selenio, sin que la viabilidad bacteriana se viera afectada tras 24 horas de crecimiento, y que esta acumulación dependió tanto de la forma química en la que se encontraba el selenio, como de su nivel de concentración.

Aunque es conocido que las bacterias son capaces de transformar el selenito a especies orgánicas volátiles, su capacidad para transformar el selenio en forma nanoparticulada a este tipo de especies aún no había sido investigada. A raíz de los resultados de acumulación obtenidos, se estudió la transformación de ambas formas químicas de selenio por parte de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* a especies orgánicas volátiles de selenio. Para ello, se aplicó el método basado en HS-SPME con estandarización interna en fibra combinado con GC-MS, previamente desarrollado para analizar y cuantificar estas especies volátiles en las plantas expuestas a SeNPs. Sin embargo, las diferentes condiciones de crecimiento de ambas bacterias (temperatura de 37°C y agitación a 120 rpm) y el uso del medio de cultivo Luria-Bertani hizo necesario una optimización del método para las nuevas condiciones. El medio de cultivo empleado bajo las condiciones de crecimiento bacteriano hizo necesario cuantificar los compuestos volátiles de selenio DMSe, DESe, y DMDSe a través del factor de respuesta expresado en función de la altura de pico (en vez de en área como ocurrió con las plantas), al existir una interferencia de la matriz con el área del patrón interno, incluso en el modo SIM. Bajo estas condiciones, el método fue validado de nuevo en términos de intervalo lineal, límite de detección, límite de cuantificación, y variación de la precisión dentro del día y entre días de acuerdo con las especies producidas por las bacterias. De este modo, se obtuvo una buena correlación lineal para la especie DMDSe con un coeficiente de determinación de 0,998, y unos límites de detección y de cuantificación del orden de los ng. En cuanto a la precisión dentro del día y entre días, los valores obtenidos del 6% y 12% para el DMSe, y del 6% y 21% para el DMDSe, se consideraron adecuados al incluir otra vez la variabilidad entre las dos fibras de carboxen/PDMS utilizadas para determinar dichos parámetros.

Con el fin de identificar y cuantificar las especies orgánicas volátiles de selenio liberadas por *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, los Erlenmeyer donde estas bacterias se cultivaron en ausencia y en presencia de 1 y 2 mg Se L⁻¹, en forma de selenito y SeNPs, se sellaron con un septum para poder realizar el muestreo con la fibra de carboxen/PDMS en el espacio de cabeza. Los análisis de los resultados tras la extracción

del patrón interno (colocado en un vial aparte) sobre la misma fibra que se había expuesto previamente al espacio de cabeza de las bacterias, y su posterior desorción en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases mostraron diferencias en la formación de las especies orgánicas volátiles de selenio encontradas, DMSe y DMDSe. En el caso del DMSe, aunque *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* fueron capaces de producir esta especie tanto en contacto con SeNPs como con selenito, sus niveles de concentración no se pudieron cuantificar, ni después de su exposición a 2 mg Se L^{-1} , al encontrarse las señales por debajo del límite de detección. Por el contrario, la especie DMDSe, cuya formación fue dependiente tanto de la especie bacteriana como de la forma química de selenio empleada para su cultivo, pudo ser cuantificada al mostrar unos valores de señal por encima del límite de cuantificación. Los niveles de esta especie producidos por *Escherichia coli* fueron de $(10 \pm 3) \text{ ng}$ y $(11 \pm 1) \text{ ng}$ tras su cultivo con 1 mg Se L^{-1} tanto en forma de SeNPs como de selenito, respectivamente. Un aumento de la concentración de selenio a 2 mg L^{-1} , no afectó significativamente a los niveles de DMDSe, los cuales permanecieron prácticamente constantes con valores de $(15 \pm 3) \text{ ng}$ cuando el selenio estaba en forma nanoparticulada y de $(11 \pm 1) \text{ ng}$ cuando estaba en forma iónica. Por su parte, *Staphylococcus aureus*, que solo produjo DMDSe cuando el selenio fue añadido en forma de selenito al medio de cultivo, liberó unas cantidades de esta especie que aumentaron de $(8,5 \pm 0,3) \text{ ng}$ hasta $(22,9 \pm 0,1) \text{ ng}$ cuando se incrementó la concentración de selenio. Un análisis ANOVA multifactorial de los resultados mostró diferencias significativas entre los niveles de DMDSe liberados por ambas bacterias, confirmando así que su producción era función tanto de la forma química de selenio y de su concentración, como de la especie bacteriana.

Para completar estos estudios, se evaluó a través de un análisis cualitativo si *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* tenían la capacidad de producir compuestos orgánicos volátiles de azufre, ya que al analizar el medio de cultivo en ausencia de bacterias se encontraron las especies dimetilsulfuro (DMS, *Dimethyl Sulfide*) y dimetildisulfuro (DMDS, *Dimethyl Disulfide*). El aumento de la relación de señal entre el DMS y el DMDS con el patrón interno, $\text{d}^6\text{-DMS}$, en presencia de ambas especies bacterianas, puso de manifiesto la formación de estos compuestos volátiles de azufre por parte de las dos bacterias. Además, otro compuesto volátil de azufre, dimetiltrisulfuro, ya encontrado en otras bacterias, fue identificado en la fracción volátil extraída de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* a través del análisis del espectro de masas junto con la

librería NIST 2011. Asimismo, la presencia de selenio en el medio de cultivo puede conducir a la formación de compuestos volátiles mixtos de selenio y azufre por parte las bacterias. De hecho, durante el análisis de las especies volátiles producidas por cada especie bacteriana se consiguió identificar el compuesto DMSeS, el cual ya se había descrito anteriormente en bacterias cultivadas con selenito, pero nunca en bacterias cultivadas en presencia de SeNPs.

Estos resultados ponen de nuevo de manifiesto la capacidad de los microorganismos, en este caso de las bacterias, para incorporar y transformar las SeNPs. Este comportamiento se asemeja al de los oxoaniones de selenio (selenito y selenato), cuya presencia, a ciertos niveles de concentración, hace que las bacterias activen un mecanismo de detoxificación a través del cual los eliminan, entre otras formas, como especies volátiles. Asimismo, se confirma el potencial del método desarrollado para la cuantificación *in vivo* de compuestos orgánicos volátiles de selenio, liberados por (micro)organismos tras su exposición a diferentes formas químicas de este elemento. Además, los bajos niveles de detección alcanzados podrían convertir a este método en una herramienta analítica útil para elucidar los mecanismos de detoxificación de selenio no solo en bacterias, sino también en otros organismos vivos como las algas.

Con el fin de profundizar más en el efecto de las especies bacterianas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* sobre las SeNPs, se evaluaron las transformaciones de estas nanopartículas, en comparación con las del selenito, a otras especies de selenio no volátiles (selenoaminoácidos). Al igual que en el caso de las plantas, esta capacidad de transformación de las bacterias se evaluó mediante hidrólisis enzimática seguida del análisis por HPLC-ICP-MS y HPLC-ESI-MS/MS. Aunque el empleo de proteasa XIV e incubación a 37°C es de nuevo el procedimiento más eficiente para extraer de forma cuantitativa las especies de selenio de las bacterias sin alterar su identidad, se ha demostrado que para estos microorganismos es necesario romper primero la pared celular bacteriana antes de proceder a la extracción de dichas especies con proteasa XIV. En este sentido, se probaron dos procedimientos diferentes de ruptura de la pared celular bacteriana. El primero de ellos se basó en un procedimiento enzimático utilizándose la enzima lisozima, mientras que el segundo fue un método mecánico mediante agitación con perlas de vidrio. Los resultados sobre la eficiencia de extracción de las especies de selenio en ambas bacterias, tras aplicar a continuación la hidrólisis enzimática a diferentes

tiempos de incubación (24, 48 y 72 horas), mostraron que después de la disrupción mecánica se requerían al menos 72 horas de incubación para alcanzar unos porcentajes de eficiencia de extracción del 60%. En cambio, tras la disrupción enzimática dicha eficiencia fue en todos los casos superior al 95% e independiente del tiempo de incubación. Por tanto, estos hallazgos demostraron que el pretratamiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* con lisozima facilitaba la actuación posterior de la proteasa XIV, consiguiendo extraer las especies de selenio de forma cuantitativa y de manera más rápida. Para evaluar de manera conjunta la influencia del procedimiento de extracción, la forma de selenio suplementada, el tiempo de incubación, y la especie bacteriana sobre la eficiencia de extracción de las especies de selenio se llevó a cabo un análisis ANOVA multifactorial. El resultado de este análisis determinó que solamente el procedimiento de extracción y el tiempo de incubación afectaron significativamente a la extracción de las especies. Asimismo, este estudio estadístico también reveló la existencia de un efecto secundario entre estos dos mismos factores, mostrando una relación exponencial entre el tiempo de incubación y el procedimiento de extracción basado en la disrupción mecánica, y una relación constante entre dicho tiempo y el procedimiento que empleó la disrupción enzimática.

En la identificación de las especies de selenio mediante el análisis de los extractos por HPLC-ICP-MS, utilizando la columna de intercambio aniónico, se observó una variación del perfil cromatográfico de estas especies con el tiempo de incubación con proteasa XIV. En lo que respecta a los procedimientos de extracción, la extracción basada en la disrupción enzimática de la pared bacteriana demostró ser más efectiva que la disrupción mecánica al obtenerse cromatogramas con una mejor resolución de los picos. Asimismo, a pesar de que la extracción con lisozima y proteasa XIV fue cuantitativa desde las 24 hasta las 72 horas de incubación, en *Escherichia coli* fue necesario aplicar un tiempo de incubación de 72 horas para mejorar la identificación de las especies de selenio, al simplificarse el perfil cromatográfico y obtenerse un único pico que contenía selenio. Sin embargo, en el caso de *Staphylococcus aureus* un tiempo de 48 horas fue suficiente para lograr el mismo resultado. Estas variaciones en los perfiles cromatográficos a lo largo del tiempo se asociaron con la actividad de las enzimas, ya que su tiempo óptimo de acción podría verse modificado en función de la complejidad de la matriz. Asimismo, la diferencia en el tiempo de incubación enzimática entre ambas bacterias se relacionó con la distinta composición de su pared celular bacteriana dado que, mientras las bacterias

Gramnegativas presentan una membrana externa que contiene lipopolisacáridos unidos covalentemente a la capa de peptidoglicanos, las bacterias Grampositivas tienen una capa de peptidoglicano más gruesa sin membrana externa de lipopolisacáridos. Por su parte, la disrupción mecánica de la pared bacteria de ambas bacterias proporcionó perfiles cromatográficos más complejos donde la identificación de las especies de selenio fue más complicada, aún después de 72 horas de incubación con la proteasa XIV. En definitiva, estos resultados pusieron de manifiesto la importancia del procedimiento de extracción y del tiempo de incubación en cuanto a los resultados de especiación.

Con independencia de las variaciones anteriores, la especie mayoritaria de selenio obtenida, tanto con la suplementación de selenito como de SeNPs a 1 y 2 mg Se L⁻¹, se identificó con el selenoaminoácido SeCys, al coincidir su tiempo de retención con el estándar de selenocistina, y al realizar experimentos de enriquecimiento con dicho estándar. Estos resultados podrían indicar que el mecanismo que utilizan tanto *Escherichia coli* como *Staphylococcus aureus* para transformar ambas formas químicas de selenio en este selenoaminoácido podría ser muy parecido. Por otro lado, la posterior cuantificación y el consiguiente balance de masas proporcionó valores de recuperación del orden del (85 ± 5) % del selenio total extraído. Sin embargo, la manera correcta de identificar la SeCys y asegurar su formación por parte de cualquier (micro)organismo no es asociar su presencia con el patrón de selenocistina. Se debe tener en cuenta que los residuos de SeCys se pueden descomponer durante el proceso de extracción enzimática, dificultado así su identificación. Por tanto, para solucionar este problema y poder confirmar la formación de este selenoaminoácido, las muestras fueron sometidas a un proceso de carbamidometilación, basado en la protección de los residuos de SeCys mediante su alquilación con iodoacetamida, antes de la extracción enzimática con lisozima y proteasa XIV. El análisis de estos extractos por HPLC-ICP-MS, utilizando una columna de fase inversa, permitió identificar el pico cromatográfico obtenido con la CAM-SeCys y, por tanto, con la SeCys, al no coincidir su tiempo de retención con el estándar de selenocistina. Sin embargo, la ausencia de un patrón comercial de CAM-SeCys impidió confirmar la presencia de este selenoaminoácido carbamidometilado utilizando únicamente esta técnica. Al igual que en la confirmación de las especies de selenio formadas por las plantas tras su crecimiento en presencia de SeNPs, fue necesario recurrir a la técnica HPLC-ESI-MS/MS para confirmar la formación de CAM-SeCys, y asegurar así la transformación por parte de ambas bacterias del selenito y de las SeNPs

en SeCys. La selección de las transiciones de este compuesto de selenio carbamidometilado a través del análisis por monitorización de reacciones múltiples, junto con datos bibliográficos permitieron confirmar la presencia de CAM-SeCys y, por tanto, la formación de SeCys por parte de *Escherichia coli* y de *Staphylococcus aureus* tras su crecimiento en presencia de las diferentes formas químicas de selenio.

Este trabajo, junto con el anterior, demuestran que las SeNPs pueden interaccionar con las poblaciones bacterianas y, por ende, con el resto de (micro)organismos, y transformarse tanto a especies volátiles como no volátiles de este metaloide.

Como se ha podido comprobar, todos estos estudios tienen en común que las SeNPs en contacto con los diferentes organismos estudiados (plantas y bacterias) se transforman en otras especies orgánicas de selenio tanto de naturaleza volátil como no volátil, lo que se debe tener en cuenta para poder comprender su comportamiento medioambiental. Aunque las técnicas comúnmente empleadas para la caracterización de nanopartículas fueron de gran utilidad para evaluar los cambios en las propiedades fisicoquímicas de las SeNPs en los diferentes medios utilizados para el crecimiento de los organismos vivos, fue necesario recurrir a otras técnicas analíticas para estudiar sus transformaciones. En concreto, la cromatografía de líquidos y la cromatografía de gases acopladas a diferentes detectores (MS, MS/MS o ICP-MS) han sido imprescindibles para poder evaluar las transformaciones experimentadas por las SeNPs, convirtiéndose así en técnicas a considerar cuando se quieran estudiar las transformaciones de otro tipo de nanopartículas de metaloide, no solo las de selenio. Asimismo, la aplicación de diferentes herramientas estadísticas y quimiométricas ha demostrado ser útil para establecer interrelaciones entre formas químicas de selenio suplementadas, niveles de concentración, y especies bacterianas y de plantas. Todo ello permite obtener una mayor cantidad de información de los datos obtenidos y, por tanto, una mejor comprensión del metabolismo de SeNPs en organismos vivos.

En definitiva, los resultados de los trabajos presentados en esta Tesis Doctoral ponen de manifiesto la capacidad de la Química Analítica para hacer frente a retos tan complejos como son la determinación de nanopartículas metálicas en muestras medioambientales, y la transformación de nanopartículas de metaloides por parte de diferentes organismos vivos. Asimismo, también se evidencia la necesidad de utilizar una gran variedad de técnicas analíticas diferentes, en combinación con las herramientas

quimiométricas para obtener una información lo más completa posible sobre las propiedades fisicoquímicas, efectos y transformaciones de las nanopartículas.

IX.CONCLUSIONES

Las metodologías analíticas desarrolladas en la presente Tesis Doctoral han permitido la caracterización y cuantificación de nanopartículas metálicas (AgNPs y AuNPs) y de metaloides (SeNPs) en una gran variedad de escenarios (muestras medioambientales, tejidos de plantas y cultivos de poblaciones bacterianas). Además, se han evaluado las transformaciones metabólicas que sufren las SeNPs en su interacción con sistemas biológicos como plantas y bacterias. En todos los casos ha sido necesario el desarrollo y la aplicación de una gran variedad de técnicas analíticas y herramientas quimiométricas. De los resultados obtenidos en los diferentes trabajos se pueden extraer las siguientes conclusiones generales:

1. La correcta caracterización de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas ha hecho necesario el empleo de una plataforma multitécnica, que comprende desde técnicas de microscopía (TEM), técnicas de dispersión de luz (DLS, NTA), difracción de rayos X, técnicas de separación (filtración, ultrafiltración y AF⁴) hasta la técnica ICP-MS en modo convencional y en modo de detección de partículas individuales (spICP-MS).
2. El estudio de la interacción de las SeNPs con sistemas biológicos ha requerido la aplicación de técnicas analíticas basadas en la espectrometría de masas (HPLC-ICP-MS, HPLC-ESI-MS/MS, GC-MS), y diferentes tratamientos de muestra (hidrólisis enzimáticas, SPME, etc.). Los resultados proporcionados por estas metodologías han evidenciado las transformaciones de estas nanopartículas a otros compuestos de selenio, afectando consecuentemente a aspectos tan importantes como su toxicidad.

A continuación, se exponen las conclusiones más específicas obtenidas de los diferentes trabajos relacionados con la caracterización y cuantificación de nanopartículas metálicas (AgNPs y AuNPs) en muestras medioambientales:

3. Se ha desarrollado un método espectrofotométrico que ha permitido determinar simultáneamente el tamaño y la concentración en masa de AgNPs en muestras de aguas de río y agua de grifo. La variación de las propiedades ópticas de estas nanopartículas, cuando formaron estructuras agregadas o ensambladas con la L-cisteína, en combinación con la herramienta quimiométrica de calibración multivariante basada en PLS consiguió mejorar

la selectividad de la técnica UV-Vis. Asimismo, su aplicación a aguas de distinta naturaleza proporcionó resultados satisfactorios al evaluar mezclas de AgNPs de diferentes tamaños y estabilizadas con distintos recubrimientos (citrato y PVP), demostrando la selectividad del modelo por las AgNPs, con independencia del agente estabilizante y, en consecuencia, la amplia aplicabilidad del método. Esto unido al mínimo tratamiento de la muestra que requiere la metodología planteada, y a la sencillez de la técnica UV-Vis pone de manifiesto el potencial del método desarrollado para su aplicación a la determinación de este tipo de nanopartículas en aguas.

4. Se ha optimizado un método de extracción de AgNPs y AuNPs en lodos de depuradora, utilizando el agente extractante TSPP. La combinación de esta metodología con la técnica spICP-MS permitió determinar el tamaño y la concentración en número de partículas de ambas nanopartículas en dicha matriz. Una de las principales ventajas de este método es que no modificaba las propiedades fisicoquímicas originales de estas nanopartículas durante todo el procedimiento analítico. Además, la interacción de las AgNPs y las AuNPs con los componentes de la matriz del lodo puso de manifiesto que las técnicas de caracterización basadas en la dispersión de luz no proporcionaban información consistente debido a la presencia de otras partículas en la muestra que acabaron interfiriendo en la medida.
5. La utilidad de la técnica spICP-MS para evaluar la estabilidad de las AgNPs y AuNPs en los lodos de depuradora a lo largo de 12 meses. Los resultados mostraron que, aunque no hubo cambios en el tamaño de ambas nanopartículas durante el periodo de estudio, las AgNPs fueron menos estables al experimentar a partir de los 6 meses un proceso de oxidación, que supuso el aumento del contenido de plata iónica en las muestras. Por tanto, se pone de manifiesto la utilidad del método desarrollado para su aplicación en estudios ecotoxicológicos y para la evaluación de riesgos de las nanopartículas metálicas estudiadas.

A continuación, se exponen las conclusiones más relevantes de los trabajos relacionados con la síntesis y caracterización de SeNPs, y las transformaciones que estas nanopartículas experimentan cuando entran en contacto con diferentes organismos vivos (plantas y bacterias).

6. La posible llegada de estas nanopartículas al medioambiente justifica la necesidad de evaluar las transformaciones que experimentan a otras especies de selenio cuando entran en contacto con sistemas biológicos. Los estudios realizados evidenciaron su transformación a especies de selenio volátiles y no volátiles (selenoaminoácidos). El desarrollo y optimización de un nuevo método de calibración con estandarización interna en fibra, basado en la combinación de HS-SPME con GC-MS, permitió monitorizar y cuantificar *in vivo* las especies volátiles de selenio. En el caso de las especies no volátiles, los procedimientos tradicionales de especiación de selenoaminoácidos, basados en su extracción enzimática, y posterior identificación y cuantificación por HPLC-ICP-MS, tuvieron que ser complementados con la técnica HPLC-ESI-MS/MS debido a su capacidad para confirmar de manera inequívoca las especies encontradas en la muestra e identificar especies desconocidas, cuyo estándar no está disponible comercialmente.
7. La suplementación de *Raphanus sativus* y *Brassica juncea* con 5 mg Se L⁻¹ en forma de SeNPs no perjudicó su productividad, y demostró la capacidad de ambas plantas para transformar las SeNPs tanto en las especies volátiles DMSe y DMDSe como en los selenoaminoácidos SeMetSeCys, SeMet y γ -Glu-Se-MetSeCys, este último identificado por HPLC-ESI-MS/MS. Los análisis con ANOVA multivariante y PCA permitieron establecer relaciones entre ambos tipos de plantas evaluando qué especies de selenio volátiles y no volátiles tenían o no en común para la detoxificación de este elemento. Asimismo, dichos análisis también consiguieron establecer la influencia de las SeNPs sobre la absorción de los metales esenciales, así como la relación que existía entre dicha variación en la absorción y las diferentes especies de selenio.
8. El crecimiento de las especies bacterianas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en presencia de SeNPs a 1 y 2 mg Se L⁻¹ no afectó a su viabilidad, y demostró que ambas bacterias fueron capaces de transformar dichas

nanopartículas en las especies de naturaleza volátil DMSe, DMDS₂ y DMSeS₂, y en el selenoaminoácido proteinogénico SeCys. Asimismo, los estudios en paralelo suplementando selenito al medio de cultivo evidenciaron la influencia de la forma química de selenio suplementada, así como de la especie bacteriana en la formación de las especies volátiles indicando que el mecanismo de transformación del selenito y de las SeNPs no solo sería diferente entre sí, sino también entre las bacterias.

9. La interacción del selenito con bacterias ácido-lácticas permitió la síntesis de SeNPs biogénicas como sistema de detoxificación de las bacterias en presencia de elevadas concentraciones de selenito. La separación de las nanopartículas biogénicas del pellet bacteriano supuso un reto analítico al ser necesario el empleo de surfactantes (SDS) en medio básico y procesos de filtración secuencial. Las SeNPs aisladas fueron caracterizadas mediante la aplicación de técnicas tales como AF⁴-ICP-MS, DLS, NTA y TEM. La síntesis biogénica constituye una alternativa muy atractiva a la síntesis química ya que está en concordancia con la Química Verde, y las estructuras obtenidas son compatibles para aplicaciones biomédicas.
10. Se ha demostrado la utilidad de las herramientas quimiométricas ANOVA y PCA para una mejor evaluación del comportamiento de las SeNPs en los organismos vivos, a través de la obtención de relaciones causa-efecto entre los distintos factores estudiados.

X.CONCLUSIONS

The analytical methodologies developed in this Doctoral Thesis have allowed the characterization and quantification of metal nanoparticles (AgNPs and AuNPs) and metalloids (SeNPs) in a wide variety of scenarios (environmental samples, plant tissues and bacterial cultures). In addition, the metabolic transformations that SeNPs undergo in their interaction with biological systems such as plants and bacteria, have been evaluated. In all cases, the development and application of a wide variety of analytical techniques and chemometric tools has been required.

The following general conclusions can be drawn from the results obtained in the different studies:

1. The correct characterization of the physicochemical properties of nanoparticles has required the use of a multi-technique platform, ranging from microscopy techniques (TEM), light scattering techniques (DLS, NTA), X-ray diffraction, separation techniques (filtration, ultrafiltration and AF⁴) to ICP-MS in conventional mode and single particle detection mode (spICP-MS).
2. The study of the interaction of SeNPs with biological systems has needed the application of analytical techniques based on mass spectrometry (HPLC-ICP-MS, HPLC-ESI-MS/MS, GC-MS) and different sample treatments (enzymatic hydrolysis, SPME, etc.). The results provided by these methodologies have evidenced the transformations of these nanoparticles to other selenium compounds, consequently affecting important aspects such as their toxicity.

The most specific conclusions obtained from the different works related to the characterization and quantification of metallic nanoparticles (AgNPs and AuNPs) in environmental samples are as follows:

3. A spectrophotometric method has been developed to simultaneously determine the size and mass concentration of AgNPs in river and tap water samples. The variation of the optical properties of these nanoparticles, when they formed aggregated or assembled structures with L-cysteine, in combination with the PLS-based multivariate chemometric calibration tool improved the selectivity of the UV-Vis technique. Furthermore, its application to waters of different nature provided satisfactory results when evaluating mixtures of AgNPs of different sizes and stabilized with different coatings

(citrate and PVP), demonstrating the selectivity of the model for AgNPs, independently of the stabilizing agent and, consequently, the wide applicability of the method. This finding, together with the minimal sample treatment required by the proposed methodology and the simplicity of the UV-Vis technique, highlights the potential of the method developed for its application to the determination of this type of nanoparticles in water.

4. A method for the extraction of AgNPs and AuNPs from sewage sludge has been optimized using the extracting agent TSPP. The combination of this methodology with the splCP-MS technique allowed us to determine the size and particle number concentration of both nanoparticles in the matrix. One of the main advantages of this method is that the original physicochemical properties of these nanoparticles remained unchanged throughout the whole analytical procedure. Moreover, the interaction of AgNPs and AuNPs with the components of the sludge matrix showed that characterization techniques based on light scattering did not provide consistent information due to the presence of other particles in the sample that interfered with the measurement.
5. The usefulness of the splCP-MS technique to evaluate the stability of AgNPs and AuNPs in sewage sludge over 12 months. The results showed that, although there was no change in the size of both nanoparticles during the study period, the AgNPs were less stable. They underwent an oxidation process after 6 months, which increased the ionic silver content in the samples. Therefore, the usefulness of the developed method for its application in ecotoxicological studies and for the risk assessment of the studied metal nanoparticles is demonstrated.

The most relevant conclusions of the different works related to the synthesis and characterization of SeNPs, and the transformations undergone when they interact with different living organisms (plants and bacteria), are presented below.

6. The possible arrival of these nanoparticles in the environment justifies the need to evaluate their transformations to other selenium species when they interact with biological systems. These studies have shown their transformation to volatile and non-volatile selenium species (selenoamino acids). The

development and optimization of a new calibration method with in-fiber internal standardization, based on the combination of HS-SPME with GC-MS, allowed *in vivo* monitoring and quantification of volatile selenium species. In the case of non-volatile species, traditional selenoamino acid speciation procedures, based on their enzymatic extraction and subsequent identification and quantification by HPLC-ICP-MS, had to be complemented with the HPLC-ESI-MS/MS technique due to its ability to unequivocally confirm the species found in the sample and identify unknown species, whose standards are not commercially available.

7. The supplementation of *Raphanus sativus* and *Brassica juncea* with 5 mg Se L⁻¹ in the form of SeNPs did not hamper their productivity and demonstrated the ability of these plants to transform SeNPs into both volatile species (DMSe and DMDSe), and selenoamino acids (SeMetSeCys, SeMet and γ -Glu-Se-MetSeCys, the latter identified by HPLC-ESI-MS/MS). Multivariate ANOVA and PCA analyses allowed us to establish relationships between both plant species by assessing which volatile and non-volatile selenium species had or did not have in common for selenium detoxification. These analyses also established the influence of SeNPs on the uptake of essential metals.
8. The growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacterial species in the presence of SeNPs at 1 and 2 mg Se L⁻¹ did not affect bacterial viability. Furthermore, it has been shown that both bacteria were able to transform these nanoparticles into the volatile species DMSe, DMDSe and DMSeS, and into the proteinogenic selenoamino acid SeCys. Furthermore, parallel studies by supplementing selenite to the culture medium evidenced the influence of the chemical form of selenium supplemented, as well as the bacterial species on the formation of the volatile species. This would indicate that the transformation mechanism of selenite and SeNPs is different and depends on the type of bacteria involved.
9. The interaction of selenite with lactic acid bacteria allowed us the synthesis of biogenic SeNPs as a bacterial detoxification system in the presence of high concentrations of selenite. The separation of the biogenic nanoparticles from the bacterial pellet was an analytical challenge as it required the use of

surfactants (SDS) in basic medium and sequential filtration processes. The isolated SeNPs were characterized by applying techniques such as AF⁴-ICP-MS, DLS, NTA and TEM. Biogenic synthesis constitutes a very attractive alternative to chemical synthesis since it is in accordance with green chemistry, and the structures obtained are compatible for biomedical applications.

10. The usefulness of the chemometric tools ANOVA and PCA has been demonstrated to understand the behavior of SeNPs in living organisms by obtaining cause-effect relationships between the different factors studied.

XI. LISTA DE ABREVIATURAS

AESAN	Agencia de española de seguridad alimentaria y nutrición
AcFFF	Fraccionamiento de flujo de campo acústico (<i>Acoustic Field Flow Fractionation</i>)
AF ⁴ /AsFIFFF	Fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (<i>Asymmetric Flow Field Flow Fractionation</i>)
AgNPs	Nanopartículas de plata (<i>Silver Nanoparticles</i>)
AI	Ingesta adecuada (<i>Adequate Intake</i>)
ANOVA	Análisis de la varianza (<i>Analysis of Variance</i>)
AuNPs	Nanopartículas de oro (<i>Gold Nanoparticles</i>)
CAM-SeCys	Carbamidometil-selenocisteína (<i>Carbamidomethyl-selenocysteine</i>)
CE	Electroforesis capilar (<i>Capillary Electrophoresis</i>)
CeO ₂ NPs	Nanopartículas de óxido de cerio (<i>Cerium Oxide Nanoparticles</i>)
Ch	Quitano (<i>Chitosan</i>)
CoONPs	Nanopartículas de óxido de cobalto (<i>Cobalt Oxide Nanoparticles</i>)
CPE	Extracción en punto de nube (<i>Cloud Point Extraction</i>)
CuONPs	Nanopartículas de óxido de cobre (<i>Copper Oxide Nanoparticles</i>)
d ⁶ -DMS	Dimetilsulfuro deuterado (<i>Dimethyl Sulfide-d⁶</i>)
DEP-FFF	Fraccionamiento de campo de flujo dielectroforético (<i>Dielectrophoretic Field Flow Fractionation</i>)
DESe	Dietilselenio (<i>Diethyl Selenide</i>)
DLS	Dispersión dinámica de luz (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
DMDS	Dimetildisulfuro (<i>Dimethyl Disulfide</i>)
DMDS _e	Dimetildiselenio (<i>Dimethyl Diselenide</i>)
DMS	Dimetilsulfuro (<i>Dimethyl Sulfide</i>)
DMSe	Dimetilselenio (<i>Dimethyl Selenide</i>)
DMSeS	Sulfuro de dimetilselenio (<i>Dimethyl Selenenyl Sulfide</i>)
EDAR	Estación de depuración de aguas residuales
EDXSd	Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (<i>Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy</i>)
EELS	Espectroscopía de pérdida de energía de electrones (<i>Electron Energy Loss Spectroscopy</i>)
EFSA	Autoridad europea de seguridad alimentaria (<i>European Food Safety Authority</i>)
EIFFF	Fraccionamiento de flujo de campo eléctrico (<i>Electrical Field Flow Fractionation</i>)
ESEM	Microscopía electrónica de barrido ambiental (<i>Environmental Scanning Electron Microscopy</i>)
ESI	Ionización por electrospray (<i>Electrospray Ionization</i>)

ETEM	Microscopía electrónica de transmisión ambiental (<i>Environmental Transmission Electron Microscopy</i>)
FAAS	Espectroscopía de absorción atómica con llama (<i>Flame Atomic Absorption Spectroscopy</i>)
FeONPs	Nanopartículas de óxido de hierro (<i>Iron Oxide Nanoparticles</i>)
FESNAD	Federación española de sociedades de nutrición, alimentación y dietética
FFF	Fraccionamiento en flujo mediante campo (<i>Field Flow Fractionation</i>)
GC	Cromatografía de gases (<i>Gas Chromatography</i>)
GE	Electroforesis en gel (<i>Gel Electrophoresis</i>)
γ -Glu-Se-MetSeCys	γ -glutamyl-selenometilselenocisteína (<i>γ-Glutamyl-Selenomethyl Selenocysteine</i>)
GRAS	Generalmente reconocido como seguro (<i>Generally Recognize As Safe</i>)
GrFFF	Fraccionamiento de flujo de campo gravitacional (<i>Gravitational Field Flow Fractionation</i>)
HDC	Cromatografía hidrodinámica (<i>Hydrodynamic Chromatography</i>)
HG-AAS	Espectroscopía de absorción atómica mediante generación de hidruros (<i>Hydride Generation Atomic Absorption Spectroscopy</i>)
HG-AFS	Espectroscopía de fluorescencia atómica mediante generación de hidruros (<i>Hydride Generation Atomic Fluorescence Spectrometry</i>)
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficacia (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HS	Espacio en cabeza (<i>Head Space</i>)
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (<i>Inductively Couple Plasma Mass Spectrometry</i>)
ICP-OES	Espectroscopía de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy</i>)
IDR	Ingesta dietética de referencia
IEC	Cromatografía de intercambio iónico (<i>Ionic Exchange Chromatography</i>)
INR	Ingesta nutricional de referencia
LOD	Límite de detección (<i>Limit of Detection</i>)
LOD _{number}	Límite de detección de concentración en número (<i>Number Concentration Detection Limit</i>)
LOD _{size}	Límite de detección de tamaño (<i>Size Detection Limit</i>)
MALS	Dispersión multiángulo de luz láser (<i>Multi-angle Laser Light Scattering</i>)

MgFFF	Fraccionamiento de flujo de campo magnético (<i>Magnetic Field Flow Fractionation</i>)
MRA	Análisis multirespuesta (<i>Multiple Response Analysis</i>)
MRT	Prueba de rango múltiple (<i>Multiple Range Test</i>)
MS	Espectrometría de masas (<i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem (<i>Tandem Mass Spectrometry</i>)
NiONPs	Nanopartículas de óxido de níquel (<i>Nickel Oxide Nanoparticles</i>)
NPs	Nanopartículas (<i>Nanoparticles</i>)
NTA	Análisis de seguimiento de partículas (<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>)
OLS	Regresión por mínimos cuadrados ordinarios (<i>Ordinary Least Squares</i>)
PAHs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos (<i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i>)
PC	Componente principal (<i>Principal Component</i>)
PCA	Análisis de componentes principales (<i>Principal Component Analysis</i>)
PCBs	Bifenilos policlorados (<i>Polychlorinated Biphenyls</i>)
PCR	Regresión sobre componentes principales (<i>Principal Component Regression</i>)
PDMS	Polidimetilsiloxano (<i>Polydimethylsiloxane</i>)
PLS	Regresión de mínimos cuadrados parciales (<i>Partial Least Squares</i>)
PRESS	Suma de cuadrados del error de predicción (<i>Prediction Error Sum of Squares</i>)
PVP	Polivinilpirrolidona (<i>Polyvinylpyrrolidone</i>)
QDs	Puntos cuánticos (<i>Quantum dots</i>)
QPS	Presunción cualificada de seguridad (<i>Qualified Presumption of Safety</i>)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RPC	Cromatografía en fase inversa (<i>Reverse Phase Chromatography</i>)
RSM	Metodología de superficie de respuesta (<i>Response Surface Methodology</i>)
SdFFF/ CFFF	Fraccionamiento en flujo mediante campo de sedimentación/ centrífugo (<i>Centrifugal Field Flow Fractionation</i>)
SDS	Dodecilsulfato de sodio (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño (<i>Size Exclusion Chromatography</i>)

SeCys	Selenocisteína (<i>Selenocysteine</i>)
SEM	Microscopía electrónica de barrido (<i>Scanning Electron Microscopy</i>)
SeMet	Selenometionina (<i>Selenomethionine</i>)
SeMetO	Selenometionina oxidada (<i>Selenomethionine Oxide</i>)
SeMetSeCys	Selenometilselenocisteína (<i>Selenomethylselenocysteine</i>)
SeNPs	Nanopartículas de selenio (<i>Selenium Nanoparticles</i>)
spICP-MS	Detección individual de partículas mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (<i>Single Particle Inductively Couple Plasma Mass Spectrometry</i>)
SPME	Microextracción en fase sólida (<i>Solid Phase Microextraction</i>)
SPRB	Banda de resonancia de plasmón superficial (<i>Surface Plasmon Resonance Band</i>)
TEM	Microscopía electrónica de transmisión (<i>Transmission Electron Microscopy</i>)
ThFFF	Fraccionamiento de flujo de campo térmico (<i>Thermal Field Flow Fractionation</i>)
TiO ₂ NPs	Nanopartículas de óxido de titanio (<i>Titanium dioxide Nanoparticles</i>)
TOF-MS	Espectrometría de masas de tiempo de vuelo (<i>Time-Of-Flight Mass Spectrometry</i>)
TSP	Pirofosfato de sodio (<i>Tetrasodium Pyrophosphate</i>)
UV-Vis	Ultravioleta visible (<i>Ultraviolet Visible</i>)
Wet-SEM	Microscopía electrónica de barrido húmedo (<i>Wet-Scanning Electron Microscopy</i>)
Wet-TEM	Microscopía electrónica de transmisión húmedo (<i>Wet-Transmission Electron Microscopy</i>)
XRD	Difracción de rayos X (<i>X Ray Diffraction</i>)
ZnONPs	Nanopartículas de óxido de zinc (<i>Zinc Oxide Nanoparticles</i>)

XII.ANEXOS

A.1. Nanoespeciación mediante fraccionamiento de flujo de campo

Nanospeciation analysis using field flow fractionation

Gustavo Moreno-Martín, Jon Sanz-Landaluze, Yolanda Madrid

Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, theory and instrumentation; R.A. Meters (Ed.) (2017)

Nanospeciation Analysis Using Field Flow Fractionation

Gustavo Moreno-Martin, Jon Sanz-Landaluze, and Yolanda Madrid

Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

1 Introduction	1
2 Characterization of Nanoparticles. Nanoparticles Stability	3
3 Field-flow Fractionation	5
3.1 Instrumentation	6
3.2 Parameters Affecting Fractionation	8
3.3 Optimization of Variables	12
4 Sizing Nanoparticles with Flow-field Flow Fractionation	13
5 Quantification of Nanoparticles by Flow-field Flow Fractionation	15
6 Experimental Conditions for Characterizing Metallic Nanoparticles and Metallic Oxide Nanoparticles by Flow-field Flow Fractionation	16
6.1 Silver Nanoparticles	17
6.2 Titanium Dioxide Nanoparticles	17
6.3 Silica Nanoparticles	18
6.4 Zinc Oxide Nanoparticles	19
6.5 Ceria Nanoparticles	19
6.6 Selenium Nanoparticles	20
7 Conclusions	20
Acknowledgments	20
Abbreviations and Acronyms	21
Related Articles	21
References	21

Trace element speciation is currently moving toward nanotechnology field. Nanosized materials such as metallic nanoparticles (MNPs) and metallic oxide nanoparticles (MONPs) are being used in many fields. However, their impact on the environment and human health is still poorly understood. Characterizing metal and metalloids in nanosize form is not an easy task, and it is still at an incipient stage of development. There is a current trend of using multimethod approaches to provide information, especially for nano-objects in complex matrices. Field flow fractionation (FFF) techniques, especially asymmetrical

flow-field flow fractionation (AF⁴), have been shown as a promising approach for size-based elemental speciation. This article provides a detailed description of the application of AF⁴ to trace element speciation in nanosize form. The description will focus first on the difficulties encountered in MNPs and MONPs determination, especially those factors affecting their stability (sample treatment and interaction with living systems). The second part outlines the application of the AF⁴ in nanospeciation consisting of a description on the basic principles of the technique and the parameters affecting MNPs and MONPs separation along with different methodologies for their sizing and quantification. The article presents throughout selected examples on the application of AF⁴ for characterizing nanoparticles.

1 INTRODUCTION

The distribution, mobility, bioavailability, toxicity, and bioaccumulation of chemical elements depend not only on their concentrations but also on their physicochemical associations with biological and environmental systems. As per IUPACs definition, speciation analysis is the analytical procedure of identifying and/or measuring the quantities of one or more individual chemical species in a sample. In the past two decades, trace speciation analysis in the environmental field has been usually concerned with the determination of physicochemical forms of metals/metalloids in environmental compartments. In the case of biological systems, speciation has been focused on interactions of metals/metalloids with gene, proteins, metabolites, and other biomolecules in biological systems. Lately, speciation analysis is moving toward nanotechnology field. Nanosized materials such as MNPs and MONPs are currently used in many fields, including daily life products (functionalized clothing and cosmetics). However, the impact of these materials on the environment and human health is still poorly understood. For instance, MNPs once released in the environment can suffer oxidation and dissolution, thus coexisting MNPs with metal ions may be present in the form of free ions, complexes with the capping agents or ligands and adsorbed on the particles. Even a simple colloid of silver nanoparticles (AgNPs) may consist of three silver forms such as AgNPs, soluble Ag⁺, and surface-adsorbed Ag.⁽¹⁾

Despite the efforts made so far, there is still a lack of sensitive and selective analytical platforms to monitor MNPs and MONPs at ultratrace levels and to discriminate between metal/metal oxides nanomaterials and the corresponding metallic ionic forms.

The lack of legislation ruling the safety of nanoparticles (NPs) (especially, engineered nanoparticles, ENPs) has led the European Commission (EC) to address a

nanomaterial definition recommendation, which has been partially implemented in some regulations, e.g. for cosmetic products and for biocides (Regulation (EC) No. 1223/2009 and No. 528/2012, respectively)⁽²⁾:

[...] 'Nanomaterial' means a natural, incidental, or manufactured material containing particles, in an unbound state or as an aggregate or as an agglomerate and where, for 50 % or more of the particles in the number size distribution, one or more external dimensions are in the size range 1–100 nm. In specific cases and where warranted by concerns for the environment, health, safety, or competitiveness, the number size distribution threshold of 50% may be replaced by a threshold between 1% and 50%.

One important consequence of this definition is the need for developing methods for detecting and quantifying nanomaterials in food, consumer products, environmental, and biological samples. Unfortunately, there is no single analytical method or instrument able to fulfill the requirements, but a variety of methods exist, which, in conjunction offer the possibility to face the problem. In addition, there are no standardized protocols available for the characterization of NPs in complex matrices. Linsinger et al. suggest that validation of methods for NPs should include the following steps⁽³⁾:

1. Detection of the presence of the NP (size identity). In this case, the type of size must be clarified (hydrodynamic size or core size) as well as the particle size distribution.
2. Identification of the type of NP (chemical identity and morphology).
3. Quantification of the fraction of NP present in the sample (mass or number fraction). It is worth noting that the terms mass- and particles-based concentration are not comparable and therefore cannot be directly transformed. Only for those NPs with spherical morphology and of uniform and known density, it is possible to directly transform quantities that are expressed in units of mass into number of NP units and vice versa. The EU recommendation establishes that the size distribution of a material should be presented as size distribution based on the number concentration (i.e. the number of objects within a given size range divided by the number of objects in total) rather than the mass fraction of nanoscale particles, as a small mass fraction may contain the largest number of particles.

Hence, there is a need for developing valid and robust analytical methods to determine NPs. Along with the method development, the production of reference materials is needed to support the legislation and to improve consumer confidence. In the past year, several nanomaterials have been produced for validating results.

As an example, two reference materials were prepared within the frame of NanoLyse project supported by the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013). The two RMs produced were a tomato soup containing SiO₂NPs and chicken meat enriched in AgNPs. As will be described in a later section, the production of RMs containing NPs is not an easy task owing to both inhomogeneity and NPs transformation due to matrix effects, sample treatment, and storage.

As it has been suggested earlier, analyzing the nanoword is a real challenge for the present and the future of analytical chemistry. Characterizing metal and metalloids in nanosize form, and their transformation in environmental and living systems, is still at an incipient stage of development. There is a current trend of using multimethod approaches to provide information, especially for nano-objects in complex matrices. Such approaches, although time-consuming and expensive, have the advantage of including a range of techniques that provide information on properties that need to be measured for characterizing NPs. Among the range of techniques available for nanomaterials characterization, AF⁴ with elemental inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) and sizing detectors (dynamic light scattering (DLS) and multiangle light scattering (MALS)) has emerged in the past years as a highly promising approach for size-based elemental speciation in complex environmental, food, biological samples, and consumer products. Unlike chromatographic methods, AF⁴ is based on a differential flow of a solvent in a channel and a respective perpendicular cross-flow to separate the analytes only by hydrodynamic properties in a fast, nondestructive, one-phase separation mechanism. This methodology ensures very gentle separation conditions for large biomolecule analysis and aggregate detection, a rapid cost-effective analysis time, and less unwanted interactions because of the small surface area of the channel compared with packed columns. In addition, the smallest molecules can be analyzed simultaneously with large proteins, aggregates or NPs, which means that AF⁴ offers a wider dynamic range than other chromatographic methods. All these combined advantages have helped the technique gain lately wider acceptance and use for size-based elemental speciation. This article provides a detailed description of the application of AF⁴ to trace element speciation in nanosize form. The description will focus first on the difficulties encountered in MNPs and MONPs determination, especially those factors affecting their stability. Furthermore, examples on how sample treatment and interaction of NPs with environmental and living system alter their size and morphology and promote their dissolution to metallic ionic forms are presented. The second part outlines the application of the AF⁴ in nanospeciation consisting of a description on

the basic principles of the technique and the parameters affecting metallic and nonmetallic NPs separation along with different methodologies for their sizing and quantification. The article also presents some selected examples on the application of AF⁴ for characterizing NPs. The overall goal of the article is to give the readers, whether at university or in industry, a comprehensive overview of an area where new insights that are of interest to a largest scientific audience are emerging.

2 CHARACTERIZATION OF NANOPARTICLES. NANOPARTICLES STABILITY

NPs characterization implies to establish not only its chemical identity but also, even more important, its size and morphology. In addition, samples containing NPs are dynamic: aggregation or dissolution can occur being highly dependent on the physical and chemical properties of NPs.

NP suspensions stability is one of the most critical issues when evaluating the behavior and toxicity of NPs. The stability of NPs could be altered during synthesis, storage, shipping, and sample treatment, and the physical processes involved include sedimentation, agglomeration, crystal growth, and change of crystallinity state. The most common strategies to tackle this issue are to reduce particle size and/or to introduce stabilizers in the medium.⁽⁴⁾ For example, as the particle size is reduced, the sedimentation rate is decreased so that the particles can stay suspended longer in nanosuspensions. The general wisdom is that the smaller the NPs, the better. Unfortunately, manufacturing complexity increases when the particle size requirements become too stringent. The use of stabilizers is the most commonly used technique in achieving a stable NP formulation. The stabilizers are used not only to provide short- and long-term storage stability for nanosuspensions but also to achieve successful formation and stabilization of NPs during production. However, the stabilizer selection is challenging as it could potentially affect NPs' properties and behavior.⁽⁴⁾

Particle size and size distribution are the key parameters used for evaluating the physical stability of NPs. In order to determine NP size, a wide variety of techniques are now available, allowing fine characterization. The most commonly encountered are methods based on light scattering measurements such as DLS, MALS, and nanoparticles tracking analysis (NTA); classical electron microscopy (TEM/SEM); and atomic force microscopy and analytical ultrafiltration.⁽⁵⁾ The DLS is widely used to determine the size of particles dispersed in a liquid medium (hydrodynamic diameter and zeta potential).

Hydrodynamic diameter is defined as the diameter of a spherical particle that has the same Brownian motion behavior in suspension. On the other hand, the magnitude of the zeta potential gives an indication of the potential stability of the colloidal system. The dividing line between stable and unstable suspensions is generally taken at either +30 or −30 mV. Particles with zeta potentials more positive than +30 mV or more negative than −30 mV are normally considered stable. Zeta potential measurement is an important tool for understanding the state of the NP surface and predicting the long-term stability of the NP and therefore the grade of aggregation.⁽⁵⁾ MALS is the preferred analytical technique for determining absolute molar masses, sizes, and conformation of all types of macromolecules and particles in solution such as proteins, biopolymers, polymers and particles, liposomes, micelles, encapsulated proteins, and many more; thereby, the scattering intensity at various angles is used to determine the average particle size. In most cases, the Rayleigh–Gans–Debye (RGD) theory is used and can yield the molar mass, root-mean-square radius.⁽⁶⁾ MALS is a technique that can be applied in either batch or chromatographic mode (e.g. in combination with size exclusion chromatography and AF⁴).^(6,7) NTA is an innovative system for sizing particles from about 30 to 1000 nm. NTA enables the visualization of the sample, gives an approximate particle concentration, and obtains size information based on the Brownian motion of individual particles.⁽⁸⁾ NTA is compatible with the regulation adopted by EC recommendation (2011/696EU), which states that a particle number-based instead of mass-based analytical technique should be used.

Unfortunately, these techniques are not capable of measuring the size of dry powders. As direct visualization techniques, both electron microscopy-based techniques (SEM/TEM) and atomic force microscopy (AFM) offer images of the particles themselves with information about both size and morphology.⁽⁹⁾ However, it is very challenging and time-consuming to measure a significant number of particles to achieve statistical size distribution using these techniques. In addition, they suffer from the need of applying extensive sample preparation for solvent removal that can potentially introduce bias in measuring the particle size distribution relative to the starting sample.⁽¹⁰⁾

The abovementioned techniques can be divided into two categories, those giving the size of the metallic core (SEM/TEM) and those providing NP hydrodynamic diameters (NTA, LDS). This indicates that the method used for sizing NPs should be specified. Moreover, the sizes of NPs often follow rather broad distributions. This indicates that the method used for sizing NPs should be specified.

The effects of NPs depend also on their chemical composition; therefore, chemical information is essential. Electron microscopy-based techniques (SEM/TEM) with energy-dispersive X-ray analysis (EDX) can establish the composition of the observed particles; however, the sensitivity is very low requiring very high measurement times.

ICPMS is very useful for establishing chemical composition of MNPs and MONPs at low concentration levels. Moreover, ICPMS gives access to size information when using in single particle mode. Single particle analysis-ICPMS (sp-ICPMS) has become a popular method for analyzing NPs. The use of sp-ICPMS was first published by McCarthy and Degueldre.⁽¹¹⁾ In this technique, NPs in aqueous suspensions are continuously nebulized into the ICP-MS that acquires data with a high resolution. The number of pulses detected per second is directly proportional to the particle number concentration in the sample, while the intensity of the signal pulse is directly proportional to the mass of the detected NP. The size detection limits (LOD size) is dependent on the ability of the system to differentiate particle signals from the background noise. The technique provides lower sized detection limits for less abundant elements such as Ag than for particles consisting of common compounds such as silica. Similar to NTA, sp-ICP-MS is capable of counting NPs directly in suspension.

Most of these methods require sample preparation by means of dissolving the solid matrices into the liquid form. Characterization of the NPs becomes a problem when NPs are present in complex matrices. NPs in consumer products and biological samples are usually suspended or embedded in complex matrices, thus preventing the direct use of most of the abovementioned techniques. This means that NPs must be separated from the matrix first. The application of sample preparation procedure requires a previous knowledge about the target NPs (compound, size, and possible concentration). Several sample preparation approaches have been reported in the literature for characterizing MNPs and MONPs.^(12,13) Acid digestion with nitric acid followed by filtration was employed for determining SiO₂NPs spiked to tissue homogenates and cell lysate.⁽¹⁴⁾ Unfortunately, this approach could potentially alter or even dissolve NPs if conditions set are too harsh. Mild conditions using solvent extraction have been successfully applied for analyzing TiO₂NPs in sunscreens and cosmetic products.^(15,16) Enzymatic hydrolysis has also been used for extracting NPs from biological samples and food products. The enzymes used were proteases such as Proteinase K for releasing silica nanoparticles (SiO₂NPs) from SiO₂NPs-spiked lung tissues and AgNPs from meat, which was spiked with AgNPs.⁽¹⁷⁾ Schmidt et al.⁽¹⁸⁾ employed TMAH for releasing AuNPs from rat livers. To prevent NPs aggregation, serum albumin was

added to all sample homogenates and to aqueous suspensions of AuNPs before the alkaline sample pretreatment.

Furthermore, stability of NPs could be altered during storage and pretreatment steps as it has been clearly illustrated when preparing NPs-based RM. In this line, SiO₂NPs-based RM was prepared by adding an amount of an aqueous silica suspension to tomato soup to get a nominal SiO₂ mass fraction of 5 g kg⁻¹.⁽¹⁹⁾ Before preparing the material, the stability of aqueous solution of SiO₂NPs under storage (time and temperature) and sample preservation conditions were evaluated. The stability of aqueous SiO₂NPs was tested at short- and long-term storage. The long-term stability data demonstrated that SiO₂NPs remained stable at room temperature during 2 years. Several procedures were employed for preserving samples containing SiO₂NPs. DLS measurements of autoclaved samples evidenced a reduction of SiO₂NPs size during thermal sterilization of material, while freezing of the aqueous SiO₂NPs at -70°C produced an irreversible sedimentation of NPs. Thus, γ irradiation was selected for preserving tomato soup as changes in NPs size and morphology were not observed. A major problem in preparing the CRM was the inhomogeneity as silica is used as clarifying agent leading to considerable precipitation of food components when added to the tomato soup. Concerning the effect of matrix components, measurements by AF⁴-ICP-MS after storage of the soup by several months show similar SiO₂NPs size distribution from aqueous suspension and soup.

In this line, Grombe et al.⁽²⁰⁾ prepared an AgNPs-spiked chicken meat as a potential candidate for RM. For this purpose, chicken breast was homogenized by cryomilling and spiked with a 40-nm PVP-AgNPs dispersion, resulting in a nominal mass fraction of 0.1 and 0.5 g kg⁻¹. Subsequently, samples were stored at -130°C to avoid segregation and agglomeration. Several preservation methods (sterilization, γ -irradiation, freezing, and lyophilization) were tested to prevent degradation of matrix and NPs. Autoclaving was proven to produce AgNPs dissolution, while rapid freezing over liquid nitrogen did not significantly alter the morphology and composition of the NPs. TEM images from spiked chicken samples evidenced the presence of individual particles rather than agglomerates, indicating that meat matrices protect AgNPs against aggregation. However, the AgNPs size in meat was smaller than that observed in the aqueous suspensions, suggesting dissolution of the AgNPs by food matrix. The authors attribute this behavior to the interaction between the sulfur and amine compounds of the meat proteins and the silver of NPs.

From the abovementioned, it is clear that preserving NPs integrity is not an easy task, and the NPs integrity should be checked during pretreatment, sample

treatment, and analysis. If this is not done, the results could not reflect the initial composition of the nanomaterial in the sample. In the past years, interest in preparing NPs-spiked samples as a way of developing and optimizing analytical methodology has exponential growth. However, as stated above, sample matrix can produce aggregation or dissolution of NPs when compared with the initial NPs dispersion used to fortify the sample.

Moreover, once orally ingested, NPs can be transformed. Several studies have appeared in the literature in order to evaluate the effects produced for the gastrointestinal juices, relevant enzymes, physiological condition, and transit times in NPs integrity. For instance, the physiological conditions occurring during digestion (pH drops to around 2 from mouth to stomach and increases again in the gut to 6.5 in the presence of high electrolyte concentrations) could alter stability NPs, therefore affecting their absorption in the intestine walls. Böhmert et al.⁽²¹⁾ evaluated the impact of an in vitro gastrointestinal assay on the physicochemical properties of AgNPs using AF⁴ on-line combined with DLS and small-angle X-ray scattering (SAXS). Data evidenced that the artificial saliva has no effect on the size and aggregation state of the NPs. In contrast, the strong acidic shift from pH 6.4 in saliva to pH 2.0 in the gastric juice results in a major increase in the hydrodynamic size owing to the changes in the binding of the stabilizing agents followed by aggregation and/or formation of a protein corona. In the intestinal digestion step at pH 7.5, the hydrodynamic size decreased from 99 to 74 nm, owing to the release of the more weakly bound proteins from the NPs surface. Similarly, the integrity of SiO₂NPs in different food products (hot water, coffee with powdered creamer, instant soup, and pancake) during in vitro digestion was evaluated by DLS and SEM.⁽²²⁾ The results show that SiO₂NPs (5–200 nm) are present during mouth digestion. However, during the gastric digestion step, SiO₂NPs were not detected in the case of coffee and instant soup, while low amounts were found for pancakes in the gastric stage. The absence of SiO₂NPs was attributed to the low pH combined with high electrolyte concentrations in the gastric digestion stage. Surprisingly, when the low pH was increased to neutral pH in the intestinal stage, SiO₂NPs reappear in even higher amounts than in the saliva stage.

Concerning NPs stability in the environment, it is expected that once released, NPs suffer transformations as, for instance, to ionic forms with the transformation rates being highly dependent on the environment conditions. It has been reported that the rate of transformation of AgNPs to silver ions increases with temperature in the range 0–37°C and decreases with increasing pH or addition of humic or fulvic acids, while sea salts have only a minor effect on dissolved silver release. The oxidation

of AgNPs to Ag⁺ occurs by dissolved oxygen through the production of peroxide intermediates.⁽¹⁾

NP transformations by plants have been also reported in the literature. In the case of ZnONPs, results revealed that Zn was found only as Zn²⁺ in soybean plants exposed to ZnONPs.⁽²³⁾ Stampoulis et al.⁽²⁴⁾ reported that Ag was found at a greater concentration in zucchini grown in AgNPs than those cultivated in Ag bulk solution. Yin et al.⁽²⁵⁾ found that the AgNPs were oxidized to Ag(I) in the roots of AgNPs-exposed *Lolium multiflorum*. Zhang et al.⁽²⁶⁾ report the transformation of the high-stable CeO₂NPs in the cucumber plants. The authors speculate that CeO₂NPs were first absorbed on the root surfaces and partially dissolved with the assistance of the organic acids (citric acid) and reducing substances (ascorbic acid) excreted by the roots. All these studies highlighted the importance of evaluating the impact of body fluids, matrix effects, and environmental conditions on the NPs and the need for developing analytical techniques for understanding the potential benefits and risk of nanomaterials.

3 FIELD-FLOW FRACTIONATION

FFF is a family of analytical techniques that was developed specifically for the separation and characterization of materials ranging in size from macromolecules to particulates (macromolecules, supramolecular assemblies, colloids, and particles). The technique was invented and theoretically described by John Calvin Giddings in 1966.⁽²⁷⁾ The idea behind this separation technique is the use of an external field applied perpendicularly to the direction of sample flow through an empty, thin ribbon-like channel. Depending on the type of field applied (cross-flow stream, temperature gradient, electrical potential, centrifugal force, gravitational force, dielectrophoretic, standing acoustic wave, and magnetic field), several FFF subtechniques can be described such as flow (FIFFF), thermal (ThFFF), electrical (EIFFF), sedimentation (SdFFF), gravitational (GrFFF), dielectrophoretic (DEP-FFF), acoustic (AcFFF), and magnetic (MgFFF) field-flow fractionation, respectively. In recent years, the use of FFF techniques has increased for the separation and characterization of proteins, polymers, polysaccharides, cells, and natural and ENPs. However, only two of the subtechniques flow, FFF and SdFFF, have had a real application in the laboratories. The wide acceptance of flow-FFF mode among other FFF modalities is due to their attractive features such as the following: a wide size range of application (from 1 nm to 50 µm), which includes natural colloids (1–1000 nm) and natural and manufactured NPs (1–100 nm); the mobile solutions employed are compatible with a wide variety of pHs and ionic strengths; aqueous solution is commonly

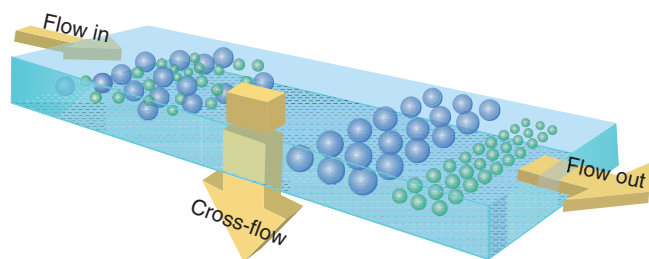


Figure 1 Scheme of flow field-flow fractionation (FIFFF).

used as carrier solutions; the possibility of performing on-line preconcentration of the sample during the focus step; and, finally the great variety of detection systems that can be used either on-line or off-line after collecting fractions. In this line, the use of ICPMS as detector has provided an added value to flow field fractionation techniques, especially for nanospeciation. To date, only Sp-FFF and flow-FFF have been on-line coupled to the ICPMS. However, the Sp-FFF is suitable for NPs of large size, while small NPs are not sufficiently fractionated. In contrast, as mentioned earlier, flow-FFF can be applied to a wide range of sizes, and it is a useful separation tool for small NPs. For all mentioned, the current article will mainly focus on the use of flow-FFF as being the main FFF subtechnique applied when characterizing nanosized metal and metalloids.

In flow FFF, a second flow or cross-flow is perpendicularly applied to the direction of main flow (Figure 1). Separation is achieved by retention of particles in the FIFFF channel compared to the average flow velocity of the carrier. The cross-flow drives analytes to the accumulation wall, which is covered by an ultrafiltration membrane through which the carrier solution passes while retaining analyte. The accumulation of analyte particles on the wall as a result of the cross-flow is counteracted by diffusion, which forces the particles into particular flow clouds of a specific characteristic thickness. Because the cross-flow is the same for all molecules or particles, the thicknesses of the clouds for different analytes are determined only by their diffusion rate, which is dependent on their size. Therefore, analyte particles with higher diffusion coefficients enter faster into the channel flow lines and are the first to elute. AF⁴ separates analytes by the hydrodynamics size and by the effective size of molecules/particles in solution.

Two types of flow-FFF can be considered: symmetric and asymmetric. Symmetric FIFFF was the original Giddings group's design and consists of a channel placed between two porous walls.⁽²⁸⁾ In this type, cross-flow enters the channel through the top wall and exits the channel through an ultrafiltration membrane. Later, Wahlund and Giddings⁽²⁹⁾ proposed an asymmetrical

system with only one porous wall (accumulation wall). In this asymmetrical AF⁴ mode, the carrier solution is pumped into the channel and splits into the cross-flow and the channel flow.

3.1 Instrumentation

The AF⁴ system controls or measures every operating variable that is required to run the system and to analyze the elution data. Pumps, valves, and flow rates are controlled, and elution data is acquired by the FFF data acquisition and control software through an interface. AF⁴ equipment is composed of a solvent organizer, a degasser, a focus pump, a tip pump, AF⁴ module, channel oven, and one or more detectors. The solvent organizer has different channels to connect the joining of diverse fluids with the pumps. The degasser has the function of removing the gases from drilling fluid, which could otherwise form bubbles. The focus and the tip pumps are isocratic piston pumps (HPLC) with the role of impulsing the carrier into the tip and the focus. The AF⁴ module is equipped with two cross-flow syringe pumps that limit the outcoming flow of the cross and control the cross-flow rates, a purge valve that switches the flow from the channel purge when an overpressure in the channel occurs, and a pressure sensor with the role of measuring the pressure under the membrane in the cross-flow. The AF⁴ module also includes the separation cartridge where the membrane is placed, which is a two-piece system, normally of an inert material and that fits perfectly with the help of a screw system to tighten two parts together. The top plate consists of a solid poly(methyl methacrylate) sheet with fluidic connections for sample inlet and outlet. The channel bottom contains a stainless steel frit supporting the membrane and relaying the fluid pushed through the membrane toward the outlet cross-flow. The steel plates on both sides of the assembly are used to compress the chip and withstand pressures in excess of 10 bar (Figure 2). The channel oven serves to control the temperature of the channel. Temperature is an important factor because the diffusion coefficient depends on this parameter.

Experimentally, the sample injection is followed by a focusing step that is technically realized by two different procedures, depending on the FFF manufacturer. In the first procedure, the sample is injected independently via a third port into the focusing zone. In the second procedure, the sample is injected together with the inlet flow, and the focus flow is injected from about two-thirds downstream of the channel with a flow rate of focus flow plus detector flow.

The use of AF⁴ for the analysis and characterization of natural colloids and manufactured NPs has been covered by several reviews.^(30–33) Unlike conventional filtration

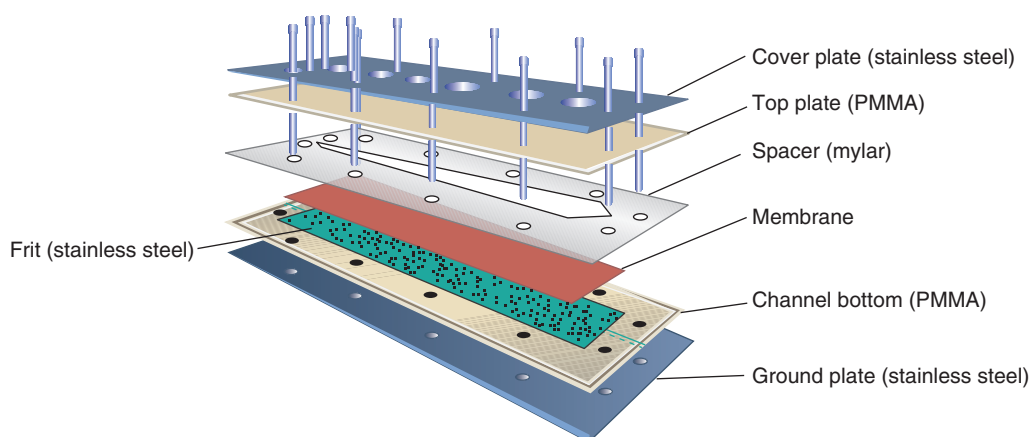


Figure 2 Scheme of an AF⁴ module device.

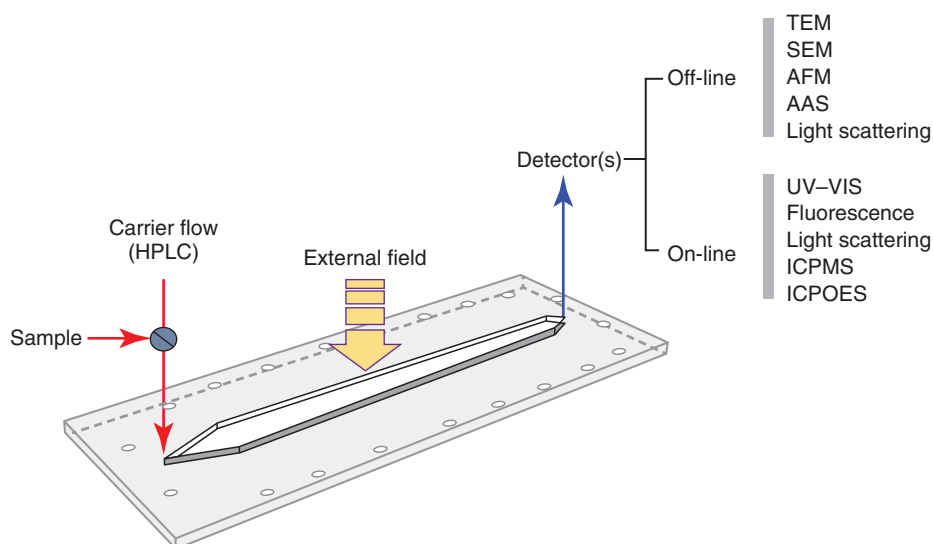


Figure 3 Typical field-flow fractionation (FFF) lay-out with examples of different detectors.

methods, AF⁴ provides a continuous and high-resolution separation of NPs as a function of their diffusion coefficient, hence the interest for determining particle size distribution. Moreover, when the system is coupled to detectors such as ICPMS, DLS, UV-absorbance, fluorescence, transmission electron microscopy, and atomic force microscopy (Figure 3), AF⁴ provides a wide range of information on particle properties including, size, shape, structural parameters, chemical composition, and particle contaminant.

Among the techniques applicable to the detection and elemental characterization of NPs, the use of AF⁴ coupled to ICPMS appears extremely promising and applicable to a number of samples from environmental

to biological samples. This approach combines the ability of AF⁴ to separate particles in the nano range with the high sensitivity and element specificity of ICPMS, thus providing an ideal tool for the simultaneous detection and quantification of MNPs and MONPs. Furthermore, being a technique for the analysis of liquid samples, AF⁴-ICP-MS allows the study of NP size distribution directly in their native dispersions, avoiding possible artifacts derived from sample preparation and drying as it might happen in electron microscopy analysis. Finally, AF⁴ is able to isolate NPs from the ionic/soluble species, providing an appealing tool for nanospeciation.

The key advantages of AF⁴ can be summarized as follows:

- Separates both soluble and colloidal components over a wide size range; especially unmatched powers in submicrometer range;
- Large dynamic range: from a few nanometers to a few micrometers;
- Rapid analysis: typically 10–30 min;
- Absence of shearing forces (no stationary phase; separation takes part in separation channel);
- Ultrahigh-resolution separations, comparable to ultracentrifugation;
- Simplifies analysis by eliminating many time-consuming sample preparation steps;
- Adjustable and flexible separation ability: very efficient for complex samples;
- Direct injection: minimal sample preparation necessary;
- Interfaces with modern analytical methods such as MALS and MALDI-TOF;
- Fractions can be collected and used for off-line analysis (with electron microscopy, MS, ICP-MS, ELISA, etc.).

3.2 Parameters Affecting Fractionation

Depending on the size of the particles, behavior of these along the flow can be classified as normal (Brownian) or steric. As a rule, particles of 1–1000 nm are separated in normal mode and particles >1–100 μm are separated in steric mode. Thus, NPs are generally separated in the normal elution mode.⁽³²⁾

The retention of an analyte component is quantified by its retention ratio R , defined as the component's velocity through the channel relative to the average velocity of the carrier liquid. Experimentally, the retention ratio is calculated as the ratio $R = t_0/t_R$, where t_0 is the elution time of void peak and t_R the elution time of the analyte. Under the action of a cross-flow field, the individual species injected into the channel are present at a certain average distance l from the accumulation wall:

$$l = \frac{D}{u} \quad (1)$$

where D is the diffusion coefficient ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) in the carrier and u the induced field flow. Instead of l , the dimensionless retention parameter λ can also be used:

$$\lambda = \frac{l}{w} \quad (2)$$

where w corresponds to the channel width or thickness. In FFFF, where the cross-flow is constant throughout the channel, λ is a constant defined for each analyte by:

$$\lambda = \frac{V_0 \cdot D}{V_{\text{cross}} \cdot w^2} \quad (3)$$

where V_0 is the geometric channel volume, D the diffusion coefficient of the particle, V_{cross} the volumetric cross-flow rate, and w the channel thickness. The retention ratio (R) is connected with the so-called dimensionless retention parameter λ by:

$$R = \frac{t_0}{t_R} = 6\lambda \coth\left(\frac{1}{2\lambda}\right) - 12\lambda^2 \quad (4)$$

This equation is strictly correct for particles of negligible size eluted via symmetrical flow FFF. However, the deviation from asymmetrical behavior is negligible for good retention (less than 1% for $\lambda < 0.025$). Thus, substituting Equation (3) in Equation (4) and taking into account the Stokes–Einstein relationship:

$$D = \frac{K_B \cdot T}{3\pi\eta d_H} \quad (5)$$

where d_H is the hydrodynamic diameter, η the viscosity of the mobile phase ($\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$), T the temperature of the medium (at room temperature, 293 K), and k_B the Boltzmann constant ($1.38 \times 10^{-23} \text{ kg m}^2 \text{s}^{-2} \text{K}^{-1}$), and applying some approximations, the following equation is obtained:

$$t_R = \frac{\omega^2 \pi \eta d_H}{2K_B \cdot T} \cdot \ln\left(1 + \frac{V_{\text{cross}}}{V_p}\right) \quad (6)$$

where V_p is the channel flow (mL min^{-1}). As a consequence of these equations, the retention time of a particle is a function of the hydrodynamic diameter, the thickness of the spacer, and the temperature and the flow of cross-rate and the channel. In addition, experimentally, there are some other parameters that can influence the performance of the AF⁴ process as mobile phase composition, membrane (material and pore size cut-off), quantity of analyte injected, and injection time.

3.2.1 Membrane (Material and Pore Size Cut-off)

The separation of NPs by AF⁴ is also directly affected by instrumental parameters. The nature of the membrane material plays an important role in NP separations. Different membranes are available in the market, the most employed being regenerated cellulose (RC) and polyethersulfone (PES) and also others, such as polyvinylidene difluoride (PVDF) as a very inert membrane material, polycarbonate (PC), or cellulose acetate (CE), have been used for more specific applications. The recovery and separation of NPs by AF⁴ are strongly correlated with electrostatic repulsion (surface charge) and hydrophobic interaction with membrane. Membranes show different surface charges depending on the material type, with van der Waals and electrostatic

forces being responsible for the particle–membrane interactions in the aqueous environment of an AF⁴ channel.

If there is repulsion between NPs surface and the membrane, the particle will be situated in the middle of the flow of the main channel, and this will carry the particle, and the elution will be faster. On the contrary, if there is attraction between the membrane and the NP, this will be carried slower by the main flow, and the elution will be delayed.^(34,35)

For instance, Hagendorfer et al.⁽³⁶⁾ evaluate the recovery of AuNPs (20, 30, and 40 nm) using different types of membranes (RC, PVDF, and PES) and ultra (UF) and nanofiltration membranes (NF) made of a thin-film polyamide composite with surfaces showing ampholytic properties. The idea behind using these NF membranes was to increase recoveries by utilizing the electrostatic repulsion of the surface to repel the negatively charged Au-NPs. In contrast to the highly charged UF and NF membranes, less-charged membrane materials such as PE, RC, and PVDF provided better recovery between 70% and 90% when separating AuNPs. In addition, Ulrich et al.⁽³⁷⁾ checked three different membranes (RC, PVDF, and PES) for AgNPs separation by evaluating changes in ζ -potential at different pHs. Results evidenced that an increase of pH results in a larger zeta potential value for membrane materials with pH-sensitive functional groups such as OH, or COOH, whereas a PVDF membrane with covalent fluor–carbon bonds shows less sensitivity against pH change.

Loeschner et al.⁽³⁸⁾ also studied different membranes for AgNPs separation, finding no significant differences of relative recoveries and retention times when comparing PES and RC membranes, but for PVDF membrane, a yellow coloration of the membrane was observed, showing that there was a strong adsorption of the AgNPs on the membrane. Moreover, these authors found that for PES membranes, saturation behavior was observed. After three injections, the recovery did not increase any further. RC membranes showed higher variations in recovery.

Consequently, it is very advisable to make a previous study of zeta potential values of NPs to have a previous idea of possible interactions between membrane and NPs. In the case of differently charged particle and membrane surface, the attraction forces can make possible the depositions of particles on the membrane surface and consequently losses in recoveries as previously observed for gold and AgNPs.^(36,39,40) Sötebier et al.⁽⁴⁰⁾ demonstrated the adsorption of AgNPs on a 5-kDa PES membrane using imaging laser ablation coupled to ICP-MS. The results evidenced that Ag was found on the membrane, with highest Ag intensities close to the injection point and focusing point.⁽⁴⁰⁾ Other authors⁽⁴¹⁾ have suggested the

coating not only of NPs but also of the membrane as a way of overcoming the problem of low recuperation values.

Molecular weight cut-off (MWCO) of the membrane is a parameter of great influence on separation. MWCO is defined as the molecular weight (in daltons) of the molecule (e.g. globular protein) that is 90% retained by the membrane. In the particular case of spherical particles, the relation of MWCO and molecular radius has been determined as $R \text{ (nm)} = 0.66 M^{1/3} \text{ (kDa)}$, finding that most used membranes, with a cut-off of 10 kDa, have an approximate pore size of 1.42 nm. Some other authors determined this relation experimentally finding slightly higher radius than theoretical approximation (32 kDa are 3.9 nm and 100 kDa are 6.5 nm).⁽⁴²⁾ Membranes of MWCO of 10 kDa are usually employed to ensure that also small NPs were retained. Smaller cut-off values reduce the permeability of the membrane and, for high cross-flow rates (which come with the separation of the smallest particles), the in-channel pressure became too high. Consequently, MWCO values lower than 5 kDa are usually avoided to prevent the build-up of high backpressures in the channel.^(32,38)

As Kammer et al.⁽³²⁾ advice, the fractionation takes place in the nearest vicinity to the membrane, and so it is important that the membrane offers a well-defined, homogeneous surface charge (and charge distribution), a smooth flat surface, and a homogeneous distribution of permeability. These are the parameters that are not in the first place considered by manufacturers, and membranes tailored for the purpose of FFF are still not available.⁽³²⁾ Other authors also claim for more different materials for membrane fabrication, so that different properties could be tested.⁽⁴³⁾

3.2.2 Channel Dimensions

Channel geometry (spacer thickness and channel width and shape) is a fundamental parameter impacting the elution and fractionation processes. At the beginning of the technique development, different shapes of the channel were tested and used, but as the technique is commercially available, the planar trapezoidal shape has prevailed. Recently, a hollow fiber device has been developed, and its use is growing in interest.^(44,45) Compared to standard AF⁴ channels, hollow fibers (HF5) work with reduced membrane areas causing high separation forces at lower cross-flows, thus involving lower consumption of carrier and production of wastes.⁽⁴⁵⁾ In the planar trapezoidal shape, where channel width influences the shape of the eluting peak, it is not a crucial parameter for fractionation. On the other hand, spacer thickness (ω) controls the parabolic velocity profile in the channel according to Stokes–Einstein equation (Equation 2). As shown in the equation, the FFF theory predicts a direct

dependency on elution time on ω^2 so that longer retention times are expected for thicker spacer and therefore a better resolution in separation. For instance, increasing the spacer by a factor of 2 has the same effect in retention time as increasing the cross-flow by a factor of 4. Generally, channel thickness values between 190 and 500 μm are used.

Loeschner et al.⁽³⁸⁾ studied three different spacers with heights of 190, 250, and 350 μm for improved separation of two different-sized AgNPs (40 and 60 nm) using a PES membrane. With decreasing channel height, retention times decreased, which was in accordance with AF⁴ theory (Equation 2). However, when using the spacer height of 190 μm , the fractogram shows a relatively narrow peak with a small shoulder eluting close to the void peak, instead of a double peak expected for the two AgNPs tested. Although for the same retention time, the fractionation power theoretically varies inversely with the square of the channel height and should be highest for the smallest spacer height,⁽⁴⁶⁾ the limit of the maximum cross-flow can be applied; using this spacer height of 190 μm , the fractionation power is not possible to be increased. Using the spacer height of 250 μm , the retention time increases and also the resolution is better, and the two peaks can be clearly seen. For the 350- μm spacer, the resolution increases, but slightly (250 μm : $R_s=0.45$ and 350 μm : $R_s=0.47$), but the time of analysis increases. Also, the authors found a decrease on the total area of the peaks as the height of the spacer decreases, suggesting an increasing adsorption of the AgNPs on the membrane with thin spacers. Sánchez-García et al.⁽⁴⁵⁾ tested also the effect of the spacer thickness (190 and 350 μm) on the elution time of the two CeO₂NPs standards, finding that with the 350- μm spacer, a slightly better separation was obtained, although at the expense of the peak width (4–9-fold wider than with the 190- μm spacer).

Another important issue when determining the size of NPs is the determination of ‘real thickness’ of the spacer, as usually ω is smaller than the thickness of the channel spacer owing to the compressibility of porous

ultrafiltration membrane used for the accumulation wall of the AF⁴ channel. The membrane is placed in the AF⁴ channel between the spacer and the frit that supports the membrane. The uncompressed portion of the membrane protrudes into the channel space, resulting in the channel thickness ω smaller than the spacer thickness as illustrated in Figure 4.⁽⁴⁷⁾ This issue will be treated in-depth in the size determination section (Section 4).

3.2.3 Mobile Phase Composition

The mobile phase composition is one of the most important and flexible parameters in AF⁴ and should be chosen both to ensure compatibility with the analyte and to improve separation performance. Mobile phases should be selected based on the initial information known about the physicochemical properties of the NPs (e.g. size range, zeta potential, natural or manufactured, surface chemistry, nature of capping agent, and presence of surfactants). Parameters such as ionic strength, pH, and chemical composition (surfactants and buffer) of the carrier solution affect the electrical double-layer (EDL) and so the NP–NP interaction or NP–membrane interaction. The thickness of the EDL is characterized by the Debye length, κ^{-1} , which for a monovalent electrolyte at 25°C in aqueous solution is given by

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{K_B T \epsilon_0}{2 q^2 N_A I}} = 0.304 \frac{1}{\sqrt{I}} \quad (7)$$

where the Debye length is given in nanometers and I is the ionic strength. The magnitude of the κ^{-1} depends only on the properties of the mobile phase and not on properties of the membrane surface, such as its charge or potential.⁽⁴⁸⁾ For like-charged membranes and particles, a higher mobile phase ionic strength compresses the EDL thickness (decreases κ^{-1}), allowing the analytes to more closely approach the membrane surface; this can potentially induce irreversible adsorption with attendant

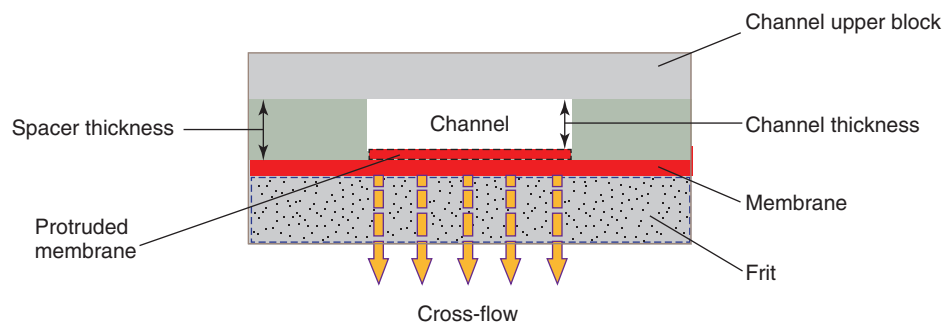


Figure 4 Schematic cross-section of an AF⁴ channel. (Adapted with permission from Ref. 47 © Elsevier, 2015.)

loss of sample.⁽⁴⁹⁾ Mobile phase ionic strength should thus be set at an appropriate value to get an equilibrium between providing sufficient electrostatic repulsive force to prevent significant loss of analyte to the membrane surface and avoiding overly strong repulsive interactions that may result in pre-elution phenomena (entrainment of analyte in the void peak). The carrier should also prevent particle dissolution, aggregation, and growth of bacteria, and it must be compatible with equipment (pumps, valves, and cells) and the requirements determined by the detectors in-line with the FFF system.⁽³²⁾

As mentioned in Section 3.2.1, pH can also affect the zeta potential value of membrane materials with pH-sensitive functional groups and also might change the electrostatic forces between coating or functionalization agent and NP core, supposing to have greater impact on electrostatically stabilizing coatings/functionalization than on steric ones.⁽³⁷⁾ Sánchez-García et al.⁽⁴⁵⁾ establish that the ideal situation is to select a pH that provides the highest repulsion between the NPs themselves and the membrane to avoid aggregation or adsorption phenomena. They determine the zeta potential for CeO₂NPs at different pH values, finding that the highest repulsion was obtained at extreme pHs (2–3 and 9–10). However, at low pHs (2–3), the CeO₂NPs are positively charged, while the PES membrane is negatively charged, thus causing interaction.⁽³⁴⁾ Therefore, for CeO₂ NPs separation, a pH value of 10 was chosen to minimize NPs–membrane interaction. Loeschner et al.⁽³⁸⁾ studied the effect of two buffered carrier solutions based on (NH₄)₂CO₃ (pH 9) and NH₄HCO₃ (pH 7.4) on the separation and recovery of two AgNPs, finding that the influence of the pH value of the carrier solution in the studied range had no significant impact on the retention time.

As a rule, increasing salt concentration (>0.1 mol L⁻¹) produces a substantial increase in analyte retention, which could lead to irreversible adsorption of large particles onto the membrane and therefore losses in the channel and low recoveries. In general, it is best to choose an indifferent (nonreactive) electrolyte system that enables pH buffering, while also establishing an appropriate ionic strength.⁽⁴⁹⁾ For instance, the use of monovalent salt ammonium nitrate (NH₄NO₃) is quite common, because it has minimal adverse impact on recovery for a wide range of NP analytes and is chemically inert with respect to components (including detectors) typically in contact with the analyte solution. Other salts such as NaCl, NaNO₃, and KCl and other simple electrolytes have shown to be appropriate if compatible with the analyte and sample medium.

The addition of surfactants to the carrier is a common practice in AF⁴ to increase the suspension stability and to control the interaction of NP membrane. The presence of

ionic and nonionic surfactant contributes to create electrostatic or steric repulsion by changing the surface charge of the dispersed phase or by forming an adsorbed layer on to the NPs. When deciding to employ a surfactant, it should be kept in mind that these compounds could influence pH and ionic strength and specially alter the NP size and state of dispersion. A bad selection of the surfactant can negatively impact on retention behavior including analyte losses in the membrane. Moreover, it is also recommended to select a surfactant concentration well below the critical micelle concentration as micelle can interfere with the detection of similar size analytes. Among them, sodium dodecyl sulfate (SDS) and cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) are the most widely used surfactants for AF⁴ separations. It has been reported that SDS can affect the nebulization efficiency of NPs when the system is coupled to ICP-MS. For preventing this negative effect, Schmidt et al.⁽¹⁸⁾ added 3% (v/v) methanol to the carrier in order to enhance and stabilize the ionization efficiency of AuNPs. In addition, it is known that the use of organic solvents may prevent TiO₂NPs aggregation, thus improving the resolution of the fractograms.⁽¹⁶⁾

Meisterjahn et al.⁽⁴³⁾ present a systematic study for the separation of two different NPs (AgNPs and AuNPs) using a complex mixture of buffers, ionic and nonionic surfactants (SDS, FL-70 solution) combined with other variables as membrane material and cross and channel flows 50. They found that careful adjustment of separation conditions can result in acceptable, but not ideal, separation conditions for two fundamentally different stabilized materials, and that it may not be possible to separate a set of different particles under ideal conditions for each particle type.

3.2.4 Rate of Cross and Channel Flows

As established before, and according to Equation (6), the ratio between cross and channel flow has a direct influence on the retention time of a compound; increasing this ratio leads to slower elution (higher retention) but also influences other parameters such as resolution, total time of fractograms, and recuperation, showing higher resolutions increasing the ratio but at the cost of increased analysis time and a greater potential for sample loss. As it is evident, cross-flow controls the distribution of particles near the membrane and consequently their separation. As cross-flow increases, NPs are moved toward the membrane, retaining the particles for some more time and increasing the interaction of the NPs with the membrane. Moreover, the use of a high cross-flow produces additionally a dilution of the sample. In contrast, lower cross-flow could result in an insufficient separation of NPs. Therefore, the use of a cross-value

that is appropriate for both fractionation (component separation) and size determination (low loss and minimal band broadening with no pre-elution) is recommended. For example, Baalousha et al.⁽⁵⁰⁾ optimized the separation of natural NPs by testing various flow rates. They showed that a cross-flow of 0.3 mL min^{-1} results in a poor fractionation and a low retention time, whereas a cross-flow rate of 0.75 mL min^{-1} leads to selective losses of larger particles. As a compromise, a flow rate of 0.5 mL min^{-1} was chosen for separation. One option for samples with a wide particle-size range is to apply field gradients, hence to reduce the cross-flow rate over time.⁽³²⁾

The channel flow rate has a direct impact on peak broadening by influencing the residence time in the channel. Typically, it is set within the range $0.5\text{--}1.0 \text{ mL min}^{-1}$. Below 0.5 mL min^{-1} , extremely slow elution (high retention) is typically observed, and immobilization (loss) of a significant quantity of the sample is possible, which can result in low recovery value. Above 1.0 mL min^{-1} , the pressure inside the channel increases substantially, and high cross-flow must be applied in order to fractionate very small analytes, thus substantially constraining the available experimental range.⁽⁴⁹⁾

Another parameter related with fluxes is focus flow. During injection of the sample into the AF⁴ channel, the analyte is uniformly distributed across the depth of the channel. A focusing process is then applied in order to achieve analyte equilibration in the mobile phase before elution.⁽⁴⁹⁾ During the focus step, the injected NPs are focused in a narrow zone of the AF⁴ channel, generally positioned directly under the injection port, before separation takes place. The position can be adjusted by controlling the balancing flow. Generally speaking, an improvement of the recovery and the peak shape is observed along with a decrease of the retention time as the focus time increases. In contrast, the recovery of NPs became worse, and the fraction of eluted NPs in the void peak increases as the focus time decreases.⁽³⁶⁾

3.2.5 Temperature

Although the AF⁴ theory explains through Equation (6) that temperature of the carrier liquid influences separation performance and actually AF⁴ instruments allow to vary temperature during fractionation, however in very few studies this variable is included during the optimization. It is true that variation of the temperature in actually manufactured temperature chambers and furnaces is slow, and large equilibration times are necessary. This is the main reason because actually all separations are performed at constant temperature.⁽³⁸⁾

3.2.6 Injected Mass and Injection Time

As in the chromatography techniques, the quantity (mass) of analyte injected in an elution experiment has a crucial influence on the fractionation quality, and a compromise solution should be found; sufficient material must be present to yield a reasonably high detector signal-to-noise ratio but not too much, because if the quantity is too high, this can result in overloading phenomena that alter the retention behavior of the analyte.⁽⁴⁹⁾ The injected sample volume is determined by the sample loop used on the injector. Some devices allow also the modification of injection times, looking for a better distribution of sample on the hole surface of the channel. Loeschner et al.⁽³⁸⁾ studied the influence of both the parameters, injected sample volume and injection time, finding no significant influence of the injection time on relative recovery and retention times of both the parameters.

3.3 Optimization of Variables

Owing to the special characteristics of the AF⁴ technique, the performance of the efficiency (balance or compromise between speed of analysis and resolution) of fractionation method (the ability of the method (instrument components + procedures and experimental conditions to fractionate analytes without a substantial loss of material or information) can be assessed with the defined retention ratio (R , Equation 4) and the recovery ($R(\%)$). Recovery is defined as the ratio between the recovered mass after analysis, m , and initial injected mass, m_0 , expressed as a percentage:

$$R(\%) = (m/m_0) \times 100 \quad (8)$$

Some authors⁽⁴⁹⁾ have established that the optimal range for R is approximately $0.03 \leq R \leq 0.2$. To determine $R(\%)$, quantification of the analyte with an appropriate mass sensitive detection method is necessary (e.g. UV–vis absorbance, differential refractometer, fluorescence, or ICP-MS). The recovery can be calculated based on two different approaches:

1. Off-line approach, wherein the analyte concentration is determined directly in the sample before fractionation and then off-line by the same detection method following fractionation and collection of the eluting peak.
2. On-line approach, wherein the sample is injected both with and without application of the cross-flow field. In this case, the area under each peak is integrated, and the difference represents the analyte mass loss in the channel.

As it has been described in detail, the parameters affecting the performance of fractionation are numerous

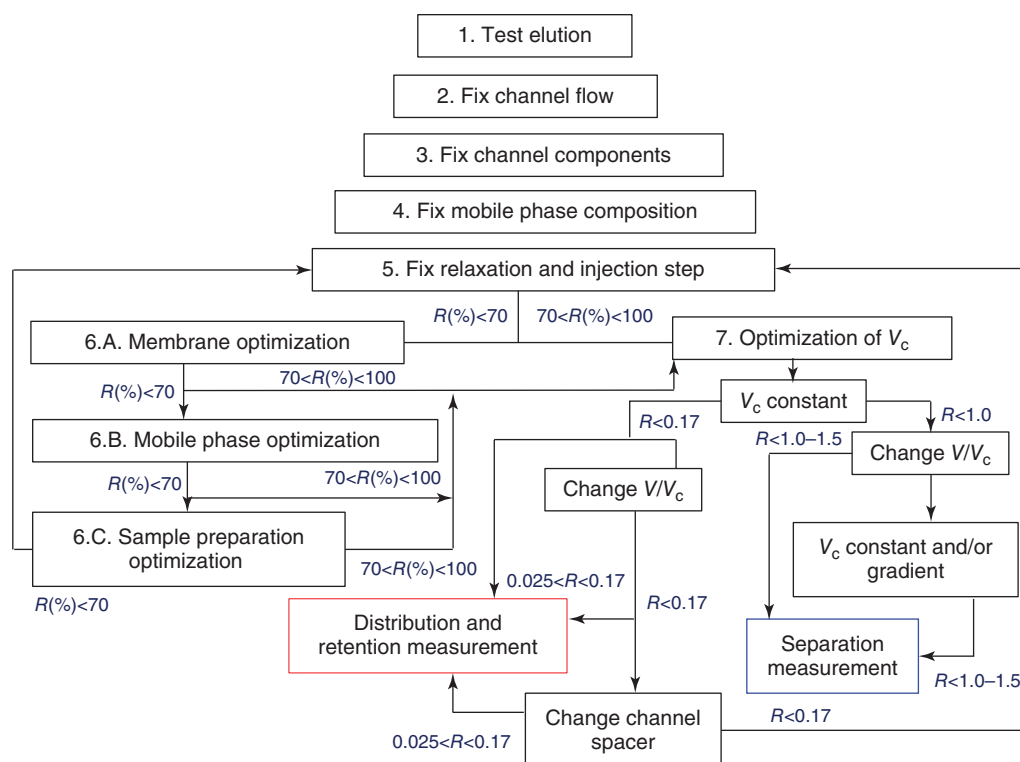


Figure 5 Schematic illustration of protocol developed to optimize AF⁴ fractionation for NP characterization. (Adapted with permission from Ref. 49 © Elsevier, 2014.)

(membrane, channel characteristics, mobile phase, channel and cross-flow, injection time, and volume), and it is difficult to propose a method to optimize all these parameters at once as, for example, using chemometrical approach to evaluate interactions between all the parameters. Although the literature is prolific in the development of studies with optimized conditions established for fractionation of the specific target analytes,^(32,36,38,43,45,50) a systematic protocol for the optimization of AF⁴ conditions to fractionate two or more nanoscale components of a given type of material is currently lacking. Although Gigault et al.⁽⁴⁹⁾ proposed a simple work flow based on decisions of values of retention ratio and recovery that can be quite useful for the optimization of several parameters (Figure 5), other authors stated that this method of development and optimization in the form of an iterative decision tree is likely to be too time-consuming in certain cases (e.g. if the initial conditions are too different from the optimal conditions for the respective particle) and likely to fail if the materials used (e.g. the membranes) show the large variety that is seen today.⁽⁴³⁾ These authors propose an aggrupation of some of the parameters and the study of the single variation of those parameters, showing that careful adjustment of separation conditions can result in

acceptable, but not ideal, separation conditions for two fundamentally different stabilized materials. Thus, it is clear that there is an important amount of work to find an optimal procedure for optimization of AF⁴ conditions, looking for parameters that can be influenced between them and so have into account all these parameters in multiparameter optimization strategies.

4 SIZING NANOPARTICLES WITH FLOW-FIELD FLOW FRACTIONATION

The determination of the size of NPs in complex mixtures is a challenging problem. The size and surface chemistry of NPs is a key parameter for the proper assessment of the relationship between properties and toxicity of NPs. For example, in vitro tests NP smaller than 5–10 nm can easily enter cells, and it has been proven that AuNP toxicity strongly depends on the size of the NPs.⁽⁵¹⁾ As it has been mentioned earlier, there is a plethora of techniques for sizing NPs; however, all of them have limitations. DLS ideally developed for monodisperse solutions cause inconvenience when applying in samples of high polydispersity where size can be biased toward larger particle size owing to the size-dependent scattering

intensity. For example, metallic NPs exhibiting plasmon resonances, such as Au and Ag, do not exhibit simple angular-dependent scattering, resulting in the inability to characterize the size or shape of the nanomaterials with static light scattering (SLS) methods.

Therefore, accurate characterization of the mean diffusion coefficient (determined by size) based on retention with asymmetric-AF⁴ is an increasingly common procedure applied to nanomaterials. Two different approaches can be used to determine the hydrodynamic diameter of fractionated particles as follows:

1. Using certified standards in size to calibrate the retention time–size relationship for a specific set of flow conditions. A common practice for calibrating diffusion is the use of well-characterized, commercially available polymer lattices (typically polystyrene spheres), where interaction between the membrane and the calibrant or analyte of interest is assumed to be similar based on surface charge (e.g. zeta potential) in a known ionic strength. However, even though surface properties of the calibrant and NP analyte are similar, it has been shown that NPs composition also strongly contributes to the retention behavior in the channel and can result in inaccurate determination of analyte diffusion and therefore size.⁽⁵²⁾ The observed compositional influences highlight the importance of incorporating validated methods for calibration. Recently, it has been shown that retention time increases for nominally size-matched metallic NPs (Ag, Au) compared to lower density (PSL and SeNPs).⁽⁵²⁾ Similar separation behavior was observed between SeNPs and PSL.
2. By applying the standard FFF theory. FFF theory can be applied to calculate size from elution time provided that the viscosity of the carrier, channel thickness, and flow rates are well known (Equation 6).

$$t_R = \frac{\omega^2 \pi \eta d_H}{2 K_B \cdot T} \cdot \ln \left(1 + \frac{V_{\text{cross}}}{V_p} \right) \quad (6)$$

This approximation requires, as it has been mentioned earlier in the spacer section, the measurement of the experimental channel width (ω), as the uncompressed portion of the membrane stands out into the channel space, resulting in the channel thickness smaller than the theoretical spacer thickness as illustrated in Figure 4.⁽⁴⁷⁾ Some approaches have been developed to overcome this problem. Sanchez-García et al.⁽⁴⁵⁾ proposed two different strategies by means of measuring (i) the elution time of an unretained substance or (ii) the retention time of a substance of known diffusion coefficient t . Experimental values of 189 ± 9 and $319 \pm 4 \mu\text{m}$ were obtained

for the spacers of theoretical width of 190 and 350 μm , respectively.

Heroult et al.⁽⁵³⁾ estimate the value of the channel thickness for sizing SiO₂ NPs in coffee creamer using the FFF theory. They also include the coupling of FFF with standardless sizing detectors such as MALS and TEM (with EDAX for Si detection). The study resulted in a channel thickness of 150 μm , which is less than half of the nominal spacer thickness. The authors hypothesized that the silica particles do not pass in an ideal way through the channel but undergo some interaction with the membrane. A correction factor was applied to correlate theoretical elution time with experimentally observed elution time using silica particles with known size.

Sanchez-García et al.⁽⁴⁵⁾ characterized the size of two commercial nanoceria suspensions by both approaches, first based on the FFFF theory and the estimation of channel thickness and another based on the use of size standards (using AgNPs and SiO₂ NPs standards). To complete the study, the authors also used other techniques such as DLS, TEM images, and XRD values. Values obtained by all FFFF approaches are quite in agreement ($23 \pm 8 \text{ nm}$ for STD-10 and $60 \pm 13 \text{ nm}$ for the commercial suspension CeO₂ NPs) but differ from those obtained by other techniques (4, 5, and 8 nm for STD-10 and 2–65, 40, and 26 nm for the commercial suspension using TEM, XRD, and DLS techniques, respectively). It is true that the different nature of the size distribution measured by all these techniques should be considered, but these results reveal the importance of applying multimethod approaches for reducing biases and ambiguous characterization. Both approaches entail that size fractionation is only dependent on the size of the component but independent of its chemistry. However, as it has been shown from the literature,^(16,37,52,53) erroneous information may still be obtained as these approach methodologies do not take into account elution time changes due to specific NP–membrane interactions, different behavior between the NPs used for calibration and the analyte, formation of aggregates, and the nature of the NPs.

Loeschner et al.⁽³⁸⁾ use the two abovementioned approaches to calculate the size of polyvinylpyrrolidone-stabilized AgNPs finding same problems mentioned. Interactions between particles or particles and membrane may lead to nonideal separation behavior. Both sizing approaches give similar results and also show the vulnerability of applying FFF theory alone using materials different from the sample particles. The same authors use a third approach, which is to collect fractions obtained by AF⁴ separation and to analyze the size distribution of these fractions with TEM to qualitatively confirm the size distributions determined with the abovementioned

methods. In addition, AF⁴ on-line coupling with DLS and MALS was also employed. The final conclusion of the authors is to recommend the combination of all size information obtained with all approaches. Thus, in FFF theory, a considerable complication exists with regard to the correct determination of the analyte diffusion coefficient, the principal determinant of retention time, and the use of appropriate methods must be validated. To develop and validate such a method, accurate standardized calibration materials with known physicochemical properties are also necessary.

5 QUANTIFICATION OF NANOPARTICLES BY FLOW-FIELD FLOW FRACTIONATION

Quantification of metal and metal oxide NPs is a challenging analytical problem that needs to be solved as the presence of nanomaterials must be clearly indicated on the label of food and cosmetics products and in daily life products commercialized in the European Union. As stated earlier, the European Union recommends that NPs quantification should be expressed as the number of concentration rather than the mass fraction of NPs for regulatory purposes. Unfortunately, there are very few techniques capable of counting NPs such as NTA and sp-ICPMS. However, NTA suffers from matrix interferences, while sp-ICP-MS requires very diluted solutions, and additionally its analytical performance is not good enough for those NPs composed of elements that contribute high signal to the blanks.

Depending on the detector employed, AF⁴ can provide quantitative information expressed either in number or mass-based concentration. ICPMS is the most common detector employed for AF⁴ when fractionating metal and MONPs; however, ICPMS is a mass detector; thus, NPs quantification is given as mass concentration of NPs. A critical point for AF⁴ coupled to ICPMS is the development of suitable calibration strategies for quantifying NP. Generally speaking, the NPs ionization and transport efficiency is lower compared to ionic species preventing calibration with conventional ICPMS standards. However, this effect is dependent on the size of the NPs tested.

Different quantification approaches when using AF⁴-ICP-MS have been developed, the most commonly employed 'off-line' quantification of fractions being collected from AF⁴-ICP-MS, followed by ICPMS analysis prior acid digestion and 'on-line' quantification by ICPMS using ionic standards added to the flow coming from AF⁴ using a mixing-T. However, Heroult et al.⁽⁵³⁾ found errors in the quantification of SiO₂NPs in food matrix by AF⁴-ICP-MS using postchannel calibration with ionic silicon, which were attributed to unexplained losses of material in the separation channel. Therefore,

the development of calibration methods based on the use of standards with similar properties to that of the NPs present in the samples is of great importance when AF⁴-ICP-MS is used. On-line calibration procedures by employing NPs as standards (prechannel calibration) could overcome erroneous results obtained when using ionic metal solutions as calibrants. However, it is worth noting that the surface properties of NPs standards and analyte may not be the same, and therefore differences in NPs–NPs and NPs–membrane interaction could lead to an over- or underestimation of the results. In addition, the lack of available certified standard for inorganic NPs is still a problem in NPs quantification. Therefore, the first step is to precisely determine the contents of the metal/metalloid in the NPs dispersion to be used as standards. Barahona et al.⁽⁵⁴⁾ used an on-line AF⁴-ICP-MS to perform the separation and mass determination of different-sized SiO₂NPs contained in an aqueous test dispersion of SiO₂NPs. Quantification was performed by introducing SiO₂NPs dispersions as standards in the AF⁴-ICP-MS system. The efficiency of ionization of SiO₂NPs in the ICPMS was previously assessed by comparing the signal obtained by ICPMS from acid-digested and undigested NPs. No significant differences in signal were observed, suggesting a complete atomization of SiO₂NPs across the different sizes tested (<500 nm). The use of this prechannel calibration approach revealed losses of analyte particles in the AF⁴ system mainly due to interactions between NPs and membrane. Interestingly, the recovery rates varied with particle size and ranged between 75% for the smallest size (20 nm) and 53% for the greatest size (150 nm). As conclusion, mass quantification using prechannel calibration could lead to erroneous results when using NPs as calibrants with a different particle size to that of the analyte in the sample. Similar conclusions were addressed by Schmidt et al.⁽¹⁸⁾ when performing quantification of AuNPs by AF⁴-ICP-MS using a prechannel approach with recoveries of 50%, 95%, and 67% for the 10, 20, and 60 nm Au NPs, respectively. The authors attribute the incomplete recoveries to the adhesion of NPs to instrument surfaces rather than agglomeration of Au NPs.

López-Heras et al.⁽¹⁶⁾ highlighted NPs aggregation as the main difficulty when preparing external calibration graphs using rutile TiO₂NPs standards. Calibration graphs were constructed by injecting of a series of TiO₂NPs dispersions into the AF⁴-ICP-MS systems prior sonication either in an ultrasonic bath for 10 min or using a tip sonicator for 2 min. A linear response between ⁴⁹Ti intensity (integrated as peak area) and increasing TiO₂NPs concentration was only achieved when tip sonication was applied. The method was successfully applied to the quantification of TiO₂NPs in cosmetic products with an average concentration of 36997 ± 145 mg Ti/kg

sample. This concentration was similar to the amount of NPs quantified by collecting NPs fractions from the AF⁴-ICP-MS system followed by acid digestion and ICP-MS measurements.

As mentioned earlier, ICPMS is a mass detector, and therefore, the AF⁴-ICP-MS system provides information on mass-based concentration of NPs. However, AF⁴-ICP-MS can also be used to determine number-based concentration NPs, but this approach is limited to dispersed NPs with spherical morphology and with very well-known characteristics (density and size of the inorganic core).

Recently, number-based concentration of SiO₂NPs has been measured in serum by on-line coupling of AF⁴ to NTA.⁽⁵⁵⁾ The AF⁴ provided the selectivity required for measuring the number-based concentration of the SiO₂NP in the sample by NTA with a relative standard deviation of 5.1% ($n=3$) and without chemical sample pretreatment. The experimental set-up developed allowed the simultaneous on-line coupling of AF⁴ to NTA, ICPMS, and MALS for the characterization of SiO₂ NP, in terms of size, size distribution, elemental composition, molecular weight, and number and mass-based concentration, in a complex matrix. The system can be applied to other NPs and open new insights in the capabilities of the AF⁴ as a component of the multitechnique platforms for on-line characterization of NPs.

6 EXPERIMENTAL CONDITIONS FOR CHARACTERIZING METALLIC NANOPARTICLES AND METALLIC OXIDE NANOPARTICLES BY FLOW-FIELD FLOW FRACTIONATION

The use of AF⁴ has exponentially increased in the past years in many areas such as biomedical, environmental, and food and consumer products applications (Figure 6). The technique has been used for separating and characterizing using different detectors a wide range of materials of different sizes and nature of interest in biomedical applications such as polymers, proteins, virus-like NPs, polysaccharides, synthetic macromolecules, liposomes, and micelles.⁽⁵⁶⁾ Dissolved organic matter (DOM) plays an important role in the environment (water retention and movement of nutrients and metal ions) and water supply systems. The use of AF⁴ combined with different detectors (UV-vis, fluorescence, and ICPMS) has allowed separation of natural colloids, humic acids, and metal bound to natural colloids.⁽³⁰⁾ On the other hand, metallic and metallic oxide NPs and quantum dots have a huge potential in areas such as electronics, cosmetics, coating, packaging, and biotechnology.

In the final part of the article we have considered of interest for the readers to summarize the experimental conditions employed for characterizing some of the most relevant metallic and metallic oxide NPs by AF⁴-ICP-MS

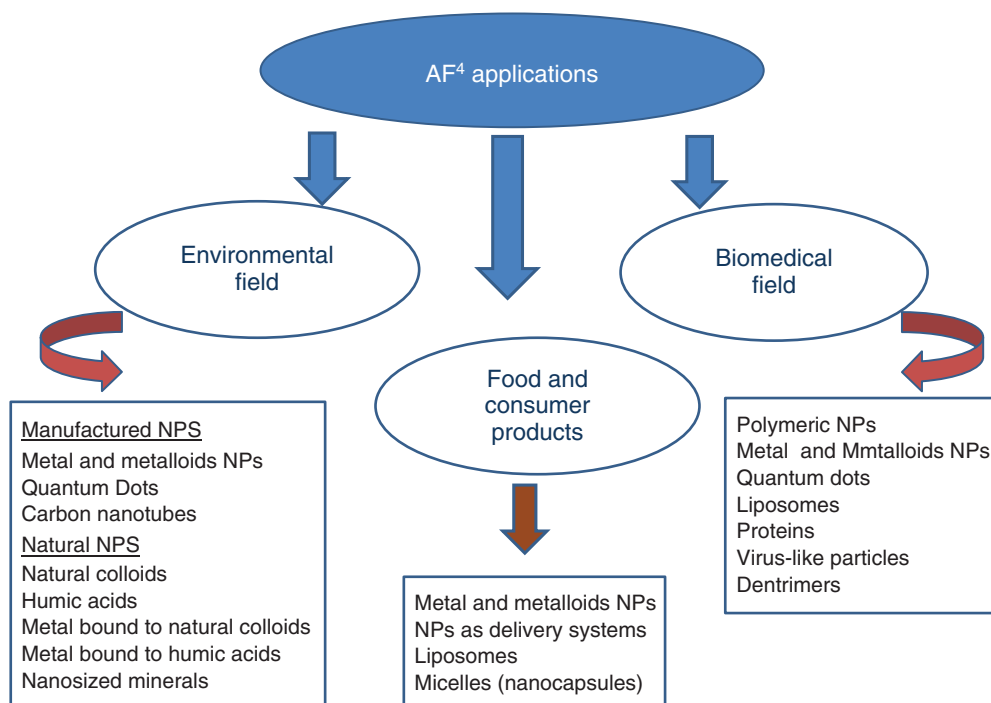


Figure 6 Schematic overview of most relevant AF⁴ applications.

as being one of the most applied analytical tool for trace element nanospeciation.

6.1 Silver Nanoparticles

AgNPs exhibit unique physical and chemical properties such as high thermal and electrical conductivity, Raman scattering of improved surface, chemical stability, catalytic activity, and nonlinear optical behavior that make them suitable for their use in ink, microelectronics, and medical imaging. In addition, AgNPs show effective antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria including highly multiresistant strains such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. For these reasons, AgNPs are being increasingly incorporated as antimicrobial agent in a wide range of consumer products such as plastics, soaps, food, clothing, and membranes for water purification systems and surgical material.⁽⁵⁷⁾ AgNPs can be used either in liquid form as part of colloids (coating and spirals) or contained in shampoos or in solid form, as they can be embedded in a mixture of polymers or suspended in a bar of soap.⁽⁵⁷⁾ AgNPs focus a lot of research interest due to their wide area of application, and therefore, the number of papers published on the determination of AgNPs by AF⁴ in different matrices is numerous.

Ramos et al.⁽⁵⁸⁾ carried out the separation, characterization, and quantification of endogenous AgNPs in commercial drinks and nutraceuticals by AF⁴-ICP-MS. For this purpose, two separation methods were optimized by means of using commercial AgNPs of known sizes (10, 40, and 60 nm), and an AF⁴ experimental condition consisted of a cut-off of 10-kDa RC membrane, a spacer thickness of 350 μm , and 0.01% SDS at pH 8 as mobile phase. Two separation methods were optimized according to the AgNPs size. The first method was developed for those samples containing AgNPs of a size lower than 20 nm. The best separation conditions were achieved using an injection flow rate of 0.2 mL min⁻¹ (5 min), a gradient cross-flow starting at 0.325 mL min⁻¹ (maintained for 5 min) followed by a linear decay to 0 mL min⁻¹ (15 min), combined with a focusing cross-flow of 1.4 mL min⁻¹ for 5 min and a constant detection flow at 1 mL min⁻¹ (30 min). The second method was applied to products containing AgNPs of a size higher than 20 nm. In this case, an injection flow rate of 0.2 mL min⁻¹ (5 min), a gradient cross-flow starting at 0.5 mL min⁻¹ (maintained for 25 min) followed by a linear decay to 0 mL min⁻¹ (5 min), combined with a focusing cross-flow of 0.5 mL min⁻¹ for 5 min and a constant detection flow at 0.3 mL min⁻¹ (30 min) was needed. Endogenous AgNPs in beverages and nutraceutical samples were successfully characterized in terms of size (by applying FFF theory equation and the Stokes–Einstein equation) and

mass-based concentration (by constructing calibration graphs with increasing concentrations of commercial AgNPs of 10 and 40 nm), obtaining in all cases good regression coefficient values ($R^2 \sim 0.99$).

Artiaga et al.⁽⁵⁹⁾ evaluated the presence of AgNPs in commercially available plastic food containers and their potential migration into different food stimulants under time and storage conditions selected according to the EU 10/2011 normative. Plastic containers in contact with the food stimulants were stored in the dark at 20 and 40°C for 1, 4, 7, and 10 days and also for 2 days at 70°C. Once the migration study was completed, the food simulants were sampled at different containers area (up, down, and in the middle) and analyzed by ICPMS to determine total silver concentration. In addition, food simulants exposed to the plastic containers during 2 days at 70°C were analyzed by AF⁴-ICP-MS using the experimental separation conditions previously reported by Ramos et al.⁽⁵⁸⁾ Finally, AgNPs size distribution in food simulants was established by comparing their retention times with those provided by commercial AgNPs of known sizes (10, 40, and 60 nm).

Bolea et al.⁽⁶⁰⁾ employed AF⁴ coupled to UV–vis and ICP-MS for determining AgNPs and ionic silver in culture media and cells used in cytotoxicity test. Total silver concentration in the culture medium and cells was evaluated by ICP-MS before acid digestion or alkaline solubilization using TMAH and Triton X-100. AgNPs were characterized by AF⁴-ICP-MS either immediately after being incorporated into the culture medium or after 24 h of incubation time corresponding to the duration of the cell viability assays. For AgNPs separation by AF⁴, a 1-kDa polyether sulfone (PES) membrane, a 350- μm spacer, and 0.01% SDS at pH 8 as mobile phase were employed. Separation was achieved by applying an injection flow rate of 0.2 mL min⁻¹ (5 min), a gradient cross-flow starting at 0.325 mL min⁻¹ (maintained for 30 min) followed by a linear decay to 0 mL min⁻¹ (5 min). When comparing fractograms, a decrease in AgNPs recovery was obtained after 24 h of incubation owing to the formation of ionic silver associated with proteins.

6.2 Titanium Dioxide Nanoparticles

Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂NPs) are manufactured worldwide in large amounts for being used in a wide range of applications. Currently, they are mainly found in high-factor sun-protection creams, textile fibers, and wood preservatives.⁽⁶⁰⁾ However, the range of application of these NPs are exponentially growing. The catalytic and photocatalytic properties of these NPs are being implemented in the treatment of water contaminated with industrial by-products, in the manufacture of photoactive materials for building solar panels, and

for self-cleaning and self-fogging purposes such as the production of self-cleaning tiles, self-cleaning windows, self-cleaning textiles, and antifogging car mirrors. In the field of medicine, the use of TiO_2NPs as a tool in advanced imaging and nanotherapy is being explored, as well as in the research of nanoproceses as new treatments against nondermatological diseases. In addition, their protective effect against harmful UV radiation can be useful in the manufacture of cosmetic products, sun creams, and food-packaging materials.⁽⁶¹⁾

Nischwitz et al.⁽¹⁵⁾ described the characterization of TiO_2NPs in sunscreens by AF^4 coupled to ICP-MS. For this purpose, TiO_2NPs were isolated from the samples by including a defatted step with hexane. The resulting extracts were further analyzed by AF^4 -ICP-MS by means of using a membrane of RC of 10 kDa, a spacer of 350 μm , and water as carrier. AF^4 optimal separation conditions were achieved using an injection flow rate of 0.2 mL min^{-1} (4 min), a gradient cross-flow starting at 1 mL min^{-1} (maintained for 36 min) followed by a decay to 0 mL min^{-1} (5 min), combined with a focusing cross-flow of 1.5 mL min^{-1} for 4 min and a constant detection flow at 0.5 mL min^{-1} (50 min). The system was applied to evaluate the best conditions for extracting TiO_2NPs from sunscreens. The addition of fresh hexane to the samples before their suspension in water followed by tip sonication provided fractograms with two Ti-containing peaks corresponding to a diameter size distribution of 10–20 nm and about 100 nm, respectively. Sizing was performed by comparison of the retention time of the samples with those provided by standards of TiO_2NPs of known sizes. The developed methodology was applied to evaluate the presence of TiO_2NPs in sunscreens of a variety of sun-protection factors (SPF10, 15, 30, and 50). TiO_2NPs quantification was performed using ionic standards added to the flow coming from AF^4 using a mixing-T. As expected, the highest TiO_2NPs concentration was achieved for 50 SPF sunscreens, whereas TiO_2NPs were not detected when analyzing 10 SPF creams.

López-Heras et al.⁽¹⁶⁾ showed the possibilities and difficulties of the AF^4 -ICP-MS technique when applying the characterization and elemental quantification of TiO_2NPs in food and cosmetic products. The TiO_2NPs were extracted from the samples following the procedure described by Nischwitz et al.⁽¹⁵⁾ and subsequently separated using an experimental set-up consisting of the use of an RC membrane of 10 kDa, a spacer of 350 μm , and 0.2% SDS/6% MeOH at pH 8.7 as carrier liquid. The optimal separation was achieved by applying an injection flow rate of 0.2 mL min^{-1} (4 min), a gradient cross-flow rate starting at 0.5 mL min^{-1} (maintained for 5 min) followed by a linear decay to 0 mL min^{-1} (30 min), combined with a focusing cross-flow rate of 1.3 mL min^{-1} for 4 min and a constant detection flow rate at 1 mL min^{-1}

(40 min). In addition, an external method for quantifying such NPs was developed by injecting a series of TiO_2NPs dispersions into the AF^4 -ICP-MS systems prior sonication. A linear response between ^{49}Ti intensity (integrated as peak area) and increasing TiO_2NPs concentration was only achieved when tip sonication was applied.

Helsper et al.⁽⁶²⁾ used AF^4 -ICP-MS to evaluate the presence of additional elements in titanium materials. For this purpose, an RC membrane of 10 kDa, a spacer of 350 μm , and a solution containing 200 mg L^{-1} of FL-70 and NaN_3 as carrier were used. The elution program employed consists of an injection flow rate of 0.2 mL min^{-1} , a gradient cross-flow rate starting at 0.1 mL min^{-1} (maintained for 50 min) followed by a decay to 0 mL min^{-1} (5 min), combined with a focusing cross-flow rate of 1.5 mL min^{-1} and a constant detection flow rate at 0.5 mL min^{-1} (69 min). The coupling with ICP-MS evidenced the presence of zirconium and aluminum as an integral part of the titanium materials as these elements co-eluted with TiO_2NPs .

6.3 Silica Nanoparticles

SiO_2NPs have a great chemical and thermal stability, high surface area optically transparent, and are environmentally friendly. SiO_2NPs are highly soluble in water owing to the electrostatic stabilization that favors the dispersion of the NPs, which makes them suitable for applications based on the use of bioassays. In additionally, SiO_2NPs have a high surface concentration of silanol facilitating a wide variety of surface reactions as well as the binding of different biomolecules (avidin–biotin, antigen–antibody, peptides, proteins, and DNA).⁽⁶³⁾ Mesoporous silica NPs are the SiO_2NPs most widely used in the field of biomedicine as they have very attractive structural properties such as high pore volume and internal surface area, tunable pore sizes, colloidal stability, and the possibility to functionalize specifically their inner pore and/or their outer surface of the particle. These properties along with their good biocompatibility make them very attractive for biomedical applications such as bioimaging, biosensors, biocatalysis, bone repair and scaffold engineering, and drug administration.⁽⁶⁴⁾

Heroult et al.⁽⁵³⁾ employed AF^4 -ICP-MS for determining SiO_2NPs in coffee creamer samples enriched with SiO_2NPs . The coffee creamer samples, once defatted, were enriched with food-grade SiO_2NPs and analyzed with an RC membrane of 10 kDa, a spacer of 350 μm , and deionized water as the carrier solution. Separation conditions employed were an injection flow rate of 0.2 mL min^{-1} (4 min), a gradient cross-flow rate starting at 0.5 mL min^{-1} (maintained for 28.8 min) followed by a linear decay to 0 mL min^{-1} (2 min), combined with a focusing cross-flow rate of 2.3 mL min^{-1} for 4 min and

a constant detection flow rate at 0.5 mL min^{-1} (40 min). No significant differences in particle size distribution of SiO_2NPs were observed in coffee creamer samples either in defatted samples or when directly dissolved in water.

An $\text{AF}^4\text{-ICP-MS}$ method was developed by Barahona et al.⁽⁵⁴⁾ for analyzing SiO_2NPs in samples containing monodisperse SiO_2NPs from different sources and prepared for different purposes. The optimization of the experimental set-up was achieved using NPs of known sizes and within the 20–150 nm range. An RC membrane of 10 kDa, a spacer with a thickness of 350 μm , and 0.25 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CaCO}_3$ as the carrier liquid were used. NPs were efficiently separated by applying an injection flow rate of 0.2 mL min^{-1} , a cross-flow rate of 1.0 mL min^{-1} combined with a focusing cross-flow of 1.0 mL min^{-1} , and a constant detection flow at 0.5 mL min^{-1} . Under these conditions, SiO_2NPs were separated in less than 70 min. The hydrodynamic size of the NPs in the different samples was measured off-line by DLS, which provided results that were in good agreement with those provided by $\text{AF}^4\text{-ICP-MS}$ when using the SiO_2NPs of known size for sizing. The use of a prechannel calibration method by employing SiO_2NPs as standard allowed the authors to perform the quantification of NPs more accurately than using postchannel calibration with ionic silica as standards.

Bartczak et al.⁽⁵⁵⁾ proposed for first time a methodology based on the simultaneous coupling of AF^4 to NTA, ICP-MS, and MALS for the full characterization of silica NPs in a bovine serum matrix. An RC membrane of 10 kDa, a spacer of 350 μm , and 5 mM Tris-HCl at pH 7.4 as carrier were used in the experimental set-up. Best separation conditions were achieved using an injection flow rate of 0.5 mL min^{-1} (4 min), a gradient cross-flow rate starting at 3.0 mL min^{-1} (maintained for 1.5 min) followed by a linear decay to 0 mL min^{-1} (15 min), combined with a focusing cross-flow rate of 3.0 mL min^{-1} for 4 min, and a constant detection flow rate at 0.5 mL min^{-1} . The developed methodology was applied to characterize the SiO_2NPs in a complex matrix such as BSA in terms of size distribution, size-based elemental composition, and number and mass-based concentration.

6.4 Zinc Oxide Nanoparticles

Zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) are ingredients of a wide variety of materials and consumer products owing to their excellent properties such as high thermal conductivity, high refractive index, ultraviolet protection, and antibacterial and antitumor capacity. Because of their ability to absorb UV radiation, ZnONPs are used as cosmetic ingredients. In addition, the combination of ZnONPs and TiO_2NPs in cosmetic formulations has been used to solve the cosmetic drawback of opaque

sunscreens. The textile industry has found in these NPs a substitute of micro-sized ZnO as ZnONPs presents a highest protective capacity against UV-radiation.⁽⁶⁵⁾

ZnONPs were characterized by Gajjar et al.⁽⁶⁶⁾ using $\text{AF}^4\text{-ICP-MS}$ with an RC membrane of 10 kDa, a spacer of 224 μm , and Milli-Q water with 2% FL-70 at pH 8.93 as carrier. AF^4 separation conditions were optimized according to the NPs size. For those ZnONPs with diameter sizes within the 10–250 nm range, both detector flow rate and slot flow rate were kept constant throughout the fractogram at values of 0.4 and 2.6 mL min^{-1} , respectively. The remaining flows (tip, cross, and focus) were varied during the elution with initial values of 0.1, 3.9, and 1 mL min^{-1} , respectively. For those ZnONPs with sizes smaller than 10 nm, all the flow rates were varied with values of 0.1, 4.4, 3.5, 0.4, and 0.6 mL min^{-1} for tip flow, focus flow, cross-flow, detector flow, and slot flow, respectively.

6.5 Ceria Nanoparticles

The excellent properties of ceria nanoparticles (CeO_2NPs) are derived from their crystalline structure and redox properties of ceria. Among the attractive properties of these NPs are thermal and chemical stability, high ionic conductivity, good storage capacity or oxygen release, and strong absorption of ultraviolet radiation.⁽⁶⁷⁾

CeO_2NPs are increasing in popularity in catalytic applications. For instance, in the automobile industry, they are widely used as active components of three-way catalysts for exhaust gas treatment of vehicles, oxidative coupling of methane, and water-gas displacement reaction. In recent years, these NPs have acquired a great interest for its regenerative antioxidant properties that allow them to participate in various redox processes to inactivate some of the most toxic reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide and superoxide and nitroxyl radicals. This property together with their ability to absorb strongly UV radiation to protect from sunlight has made cerium NPs become a promising UV filter in cosmetic sun-protection products.⁽⁶⁸⁾

Sánchez-García et al.⁽⁴⁵⁾ proposed a method for the characterization and quantification of CeO_2NPs using $\text{AF}^4\text{-ICP-MS}$. Optimal separation conditions were achieved by employing a PES membrane of 5 kDa, spacers of 190 and 350 μm , and 0.05% SDS at pH 10 as carrier liquid. Concerning the separation program applied, an injection flow rate of 0.2 mL min^{-1} (4 min), a gradient cross-flow starting at $0.325 \text{ mL min}^{-1}$ (maintained for 25.0 min) followed by a linear decay to 0 mL min^{-1} (5 min), combined with a focusing cross-flow of $1.125 \text{ mL min}^{-1}$ for 4 min and a constant detection flow at 1.0 mL min^{-1} (40 min) were suitable for the separation. This method was applied to determine the

size of the ceria NP standards by both the application of the FFF theory and the use of SiO₂NPs that have a great similarity in terms of chemical nature and potential Z with ceria NPs. Good agreement was achieved between results obtained by both the methods. Other techniques such as DLS and TEM were used to characterize these NPs obtaining results that supported those provided by AF⁴-ICP-MS.

6.6 Selenium Nanoparticles

Selenium is an essential and controversial element as the interval to be considered deficient, essential, or toxic is very narrow. It is estimated that the ingestion of foods with concentrations below 0.1 mg Se kg⁻¹ can lead to deficiency states and above 1 mg Se kg⁻¹ may cause toxicity.⁽⁶⁹⁾

Selenium nanoparticles (SeNPs) are lately used in biology, medicine, and nanotechnology-related areas. They are also of great interest for electronic and photonic applications because of their high refractive index and high reactivity, thus allowing the coating of selenium nanostructures with other metals (platinum and cadmium) by reduction and disproportionation of elemental selenium.⁽⁷⁰⁾ In addition, several studies have reported the high biological activity and low toxicity of SeNPs compared to other organic selenium species such as selenomethionine (SeMet) or selenomethylselenocysteine (SeMetSeCys).^(71,72)

A recent research has shown the antioxidant capacity of SeNPs, thus allowing their use as ingredients for developing antioxidant food-packaging materials for increasing shelf-life of the product.⁽⁷³⁾

Pornwilard et al.⁽⁷⁴⁾ evaluated by means of AF⁴-ICP-MS changes in the size distribution of SeNPs stabilized with polysaccharides (pectin and alginate/pectin mixture) and proteins (ovalbumin and β -lactoglobulin) when applied in an in vitro gastrointestinal assay with and without adding digestive enzymes. First, the different types of SeNPs were fractionated using an RC acetate membrane of 1 kDa and a solution of 0.02% FL-70/0.02% NaN₃ at pH 11.7 as carrier. A channel flow rate of 1.4 mL min⁻¹ and a cross-flow rate of 0.8 mL min⁻¹ were required for the proper separation of SeNPs. The application of the developed methodology evidenced changes in the size distribution of SeNPs when submitted to either gastric (pH 2, with and without the addition of pepsin) or intestinal conditions (pH 7, with and without the addition of pancreatin–bile extract). The observed variations were justified by the changes in the Z potential of the NPs under the gastrointestinal conditions applied. SeNPs behavior was very much affected by the type of the coating agent used.

Palomo-Siguero et al.⁽⁷⁵⁾ hydroponically grew radish plants (*Raphanus sativus*) in the presence of

chitosan-modified SeNPs. SeNPs were characterized by AF⁴-ICP-MS using an RC membrane of 10 kDa, a spacer of 500 μ m, and water as carrier. In addition, an injection flow rate of 0.1 mL min⁻¹ and a gradient cross-flow starting at 2 mL min⁻¹ followed by an exponential decay (e^{0.5}) to 0 mL min⁻¹ were employed for achieving SeNPs fractionation. SeNPs size was determined using polystyrene beads reference standards of three known sizes, which were subjected to the separation program described earlier.

7 CONCLUSIONS

As it has been mentioned throughout the article, the determination of metal/metalloids as nanosize form is not an easy task, and a plethora of techniques is needed for an unambiguous characterization of these forms in a wide variety of matrices such as biological and environmental matrices. Among them, AF⁴ is a fast, nondestructive, one-phase separation mechanism. This methodology ensures very gentle separation conditions for large biomolecule analysis and aggregate detection, a rapid cost-effective analysis time, and less unwanted interactions because of the small surface area of the channel compared with packed columns. Moreover, when the system is coupled to detectors such as ICPMS, DLS, UV absorbance, and MALS, AF⁴ provides a wide range of information on particle properties including size, shape, structural parameters, chemical composition, and concentration. Nowadays, AF⁴ is a well-established technique in laboratories dealing with NPs and nanomaterials. However, as detailed in this article, optimization of experimental parameters is not an easy task and requires a careful control of a great number of factors affecting the fractionation process. Unfortunately, separation process must be optimized for each type of NP in each given sample. Therefore, the development of multiparametric optimization procedures by employing chemometric tools should be explored in the future. AF⁴ coupled to the ICPMS is a useful technique for trace element determination in nanosize with the aim of evaluating their transformation in environmental and living systems and therefore to assess their real impact on the ecosystems and human health. However, aspects such as effect of storage and sample treatment on NPs stability should be carefully controlled with the aim of avoiding erroneous results and conclusions.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Spanish Commission of Science and Technology (CTQ2014-54801-C2-1-R) and the

Community of Madrid/FEDER Programme (S2013/ABI-3028, AVANSECAL-CM) for funding.

ABBREVIATIONS AND ACRONYMS

AF ⁴	Asymmetrical Flow-field Flow Fractionation
AFM	Atomic Force Microscopy
AgNP	Silver Nanoparticle
CE	Cellulose Acetate
CeO ₂ NP	Ceria Nanoparticle
CTAB	Cetyl Trimethylammonium Bromide
DLS	Dynamic Light Scattering
DOM	Dissolved Organic Matter
EDL	Electrical Double-layer
EDX	Energy-dispersive X-ray Analysis
ENP	Engineered Nanoparticle
FFF	Field Flow Fractionation
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma-mass Spectrometry
MALS	Multiangle Light Scattering
MNP	Metallic Nanoparticle
MONP	Metallic Oxide Nanoparticle
MWCO	Molecular Weight Cut-off
NF	Nanofiltration
NP	Nanoparticle
NTA	Nanoparticles Tracking Analysis
PC	Polycarbonate
PES	Polyether Sulfone
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
RC	Regenerated Cellulose
RGD	Rayleigh–Gans–Debye
ROS	Reactive Oxygen Species
SAXS	Small-angle X-ray Scattering
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SeNP	Selenium Nanoparticle
SiO ₂ NP	Silica Nanoparticle
SLS	Static Light Scattering
sp-ICPMS	Single Particle Analysis-ICPMS
TiO ₂ NP	Titanium Dioxide Nanoparticle
ZnONP	Zinc Oxide Nanoparticle

RELATED ARTICLES

Atomic Spectroscopy

Field-Flow Fractionation with Atomic Spectrometric Detection for Characterization of Engineered Nanoparticles • Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry in Biodistribution Studies of (Engineered) Nanoparticles

Particle Size Analysis

Field-flow Fractionation in Particle Size Analysis • Particle Size Analysis: Introduction

REFERENCES

1. J. Liu, R. Hurt, 'Ion Release Kinetics and Particle Persistence in Aqueous Nano-Silver Colloids', *Environ. Sci. Technol.*, **44**(6), 2169 (2010).
2. European Commission (2011) Commission Recommendation of 18 October 2011 on the Definition of Nanomaterial (2011/696/EU).
3. T.P.J. Linsinger, Q. Chaudhry, V. Dehalu, P. Delahaut, A. Dudkiewicz, R. Grombe, F. Von der Kammer, E.H. Larsen, S. Legros, K. Loeschner, R. Peters, R. Ramsch, G. Roebben, K. Tiede, S. Weigel, 'Validation of Methods for the Detection and Quantification of Engineered Nanoparticles in Food', *Food Chem.*, **138**, 1959 (2013).
4. L. Wu, J. Zhang, W. Watanabe, 'Physical and Chemical Stability of Drug Nanoparticles', *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **63**, 456 (2011).
5. E.J. Cho, H. Holback, K.C. Liu, S.A. Abouelmagd, J. Park, Y. Yeo, 'Nanoparticle Characterization: State of the Art, Challenges, and Emerging Technologies', *Mol. Pharm.*, **10**(6), 2093 (2013).
6. W. Fraunhofer, G. Winter, C. Coester, 'Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation and Multiangle Light Scattering for Analysis of Gelatin Nanoparticle Drug Carrier Systems', *Anal. Chem.*, **76**, 1909–1920 (2004).
7. P.J. Wyatt, 'Submicrometer Particle Sizing by Multiangle Light Scattering Following Fractionation', *J. Colloid Interface Sci.*, **197**, 9–20 (1998).
8. V. Filipe, A. Hawe, W. Jiskoot, 'Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates', *Pharm. Res.*, **27**(5), 796 (2010).
9. A. Dudkiewicz, K. Tiede, A.B.A. Boxall, K. Loeschner, L.H.S. Jensen, E. Jensen, R. Wierzbicki, K. Molhave, 'Characterization of Nanomaterials in Food by Electron Microscopy', *TrAC Trends Anal. Chem.*, **30**, 28 (2011).
10. L. Calzolari, D. Gilliland, F. Rossi, 'Measuring Nanoparticles Size Distribution in Food and Consumer Products: A Review', *Food Addit. Contam.*, **29**, 1183 (2012).
11. J. McCarthy, C. Degueldre, *Characterisation of Environmental Particles*, Lewis Publishers, Chelsea, MI, 247, Vol. 2, ch 6, 1993.
12. B. Kowalczyk, I. Lagzi, B.A. Grzybowski, 'Nanoseparations, Strategies for Size and Shape Selective Purification of Nanoparticles', *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **16**, 135–148 (2011).
13. S. Wagner, S. Legros, K. Loeschner, J. Liu, J. Navratilova, R. Grombe, T.P.J. Linsinger, E.H. Larsen, F. von der Kammer,

- T. Hofmann, 'First Step Towards a Generic Sample Preparation Scheme for Inorganic Engineered Nanoparticles in Complex Matrix for Detection, Characterization and Quantification by AF⁴ Coupled to MALS and ICP-MS', *J. Anal. At. Spectrom.*, **30**, 1286 (2015).
14. C.E. Deering, S. Tadjiki, S. Assemi, J.D. Miller, G. Yost, J. Veranth, 'A Novel Method to Detect Unlabeled Inorganic Nanoparticles and Submicron Particles in Tissue by Sedimentation Field-Flow Fractionation', *Part. Fibre Toxicol.*, **5**, 18 (2008).
 15. V. Nischwitz, H. Goenaga-Infante, 'Improved Sample Preparation and Quality Control for the Characterisation of Titanium Dioxide Nanoparticles in Sunscreens Using Flow Field Flow Fractionation On-Line with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry', *J. Anal. At. Spectrom.*, **27**, 1080 (2012).
 16. I. López-Heras, Y. Madrid, C. Cámara, 'Prospects and Difficulties in TiO₂ Nanoparticles Analysis in Cosmetic and Food Products Using Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Hyphenated to Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry', *Talanta*, **124**, 71 (2014).
 17. K. Loeschner, J. Navratilova, C. Kjøbler, K. Mølhave, S. Wagner, F. von der Kammer, E.H. Larsen, 'Detection and Characterization of Silver Nanoparticles in Chicken Meat by Asymmetric Flow Field Flow Fractionation with Detection by Conventional or Single Particle ICP-MS', *Anal. Bioanal. Chem.*, **405**, 8185 (2013).
 18. B. Schmidt, K. Loeschner, N. Hadrup, A. Mortensen, J.J. Sloth, C. BenderKoch, E.H. Larsen, 'Quantitative Characterization of Gold Nanoparticles by Field-Flow Fractionation Coupled Online with Light Scattering Detection and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry', *Anal. Chem.*, **83**, 2461 (2011).
 19. R. Grombe, J. Charoud-Got, H. Emteborg, T.P.J. Linsinger, J. Seghers, S. Wagner, F. von der Kammer, T. Hofmann, A. Dudkiewicz, M. Llinas, C. Solans, A. Lehner, G. Allmaier, 'Production of Reference Materials for the Detection and Size Determination of Silica Nanoparticles in Tomato Soup', *Anal. Bioanal. Chem.*, **406**, 3895 (2014).
 20. R. Grombe, G. Allmaier, J. Charoud-Got, A. Dudkiewicz, H. Emteborg, T. Hofmann, E.H. Larsen, A. Lehner, M. Llinas, K. Loeschner, K. Mølhave, R.J. Peters, J. Seghers, C. Solans, F. von der Kammer, S. Wagner, S. Weigel, T.P.J. Linsinger, 'Feasibility of the Development of Reference Materials for the Detection of Ag Nanoparticles in Food: Neat Dispersions and Spiked Chicken Meat', *Accred. Qual. Assur.*, **20**, 3 (2015).
 21. L. Böhmert, M.s. Girod, U. Hansen, R. Maul, P. Knappe, B. Niemann, S.M. Weidner, A.F. Thünemann, A. Lampen, 'Analytically Monitored Digestion of Silver Nanoparticles and their Toxicity for Human Intestinal Cells', *Nanotoxicology*, (2013). DOI: 10.3109/17435390.2013.815284
 22. R. Peters, E. Kramer, A.G. Oomen, R. Herrera, E. Zahira, G. Oegema, C. Peter, R. Fokkink, A. Rietvel, J.P.H. Marvin, S. Weigel, A.C.M. Peijnenburg, H. Bouwmeester, 'Presence of Nano-Sized Silica during In Vitro Digestion of Foods Containing Silica as a Food Additive', *ACS Nano*, **6**(3), 2441 (2012).
 23. M.L. López-Moreno, G. De La Rosa, J.A. Hernandez-Viezcas, H. Castillo-Michel, C.E. Botez, J.R. Peralta-Videa, J.L. Gardea-Torresdey, 'Evidence of the Differential Biotransformation and Genotoxicity of ZnO and CeO₂ Nanoparticles on Soybean (*Glycine max*) Plants', *Environ. Sci. Technol.*, **44**, 7315 (2010).
 24. D. Stampoulis, S.K. Sinha, J.C. White, 'Assay-Dependent Phytotoxicity of Nanoparticles to Plants', *Environ. Sci. Technol.*, **43**, 9473 (2009).
 25. L. Yin, Y. Cheng, B. Espinasse, B.P. Colman, M. Auffan, M. Wiesner, J. Rose, J. Liu, E.S. Bernhardt, 'More Than the Ions: The Effects of Silver Nanoparticles on *Lolium multiflorum*', *Environ. Sci. Technol.*, **45**, 2360 (2011).
 26. Y. Zhang, Z. Ma, X. Zhang, J. He, Z. Zhang, R. Guo, Y. Tai, 'Biotransformation of Ceria Nanoparticles in Cucumber Plants', *ACS Nano*, **6**, 9943 (2012).
 27. J.C. Giddings, 'A New Separation Concept Based on a Coupling of Concentration and Flow Non uniformities', *Sep. Sci.*, **1**, 123 (1966).
 28. J.C. Giddings, F.J. Yang, M.N. Myers, 'Theoretical and Experimental Characterization of Flow Field-Flow Fractionation', *Anal. Chem.*, **48**, 1126 (1976).
 29. K.G. Wahlun, J.C. Giddings, 'Properties of Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Channel Having One Permeable Wall', *Anal. Chem.*, **59**, 1332 (1987).
 30. M. Baalousha, B. Stolpe, J.R. Lead, 'Flow Field-Flow Fractionation for the Analysis and Characterization of Natural Colloids and Manufactured Nanoparticles in Environmental Systems: A Critical Review', *J. Chromatogr. A*, **1218**, 4078 (2011).
 31. G. Yohannes, M. Jussila, K. Hartonen, M.-L. Riekkola, 'Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Technique for Separation and Characterization of Biopolymers and Bioparticles', *J. Chromatogr. A*, **1218**, 4104 (2011).
 32. F.V.D. Kammer, S. Legros, T. Hofmann, E.H. Larsen, K. Loeschner, 'Separation and Characterization of Nanoparticles in Complex Food and Environmental Samples by Field-Flow Fractionation', *TrAC Trends Anal. Chem.*, **30**(3), 425 (2011).
 33. K. Tiede, A.B. Boxall, S.P. Tear, J. Lewis, H. Davidand, M. Hassellöv, 'Detection and Characterization of Engineered Nanoparticles in Food and the Environment', *Food Addit. Contam.*, **25**, 7795 (2008).
 34. H. Susanto, M. Ulbricht, 'Characteristics, Performance and Stability of Polyethersulfone Ultrafiltration Membranes Prepared by Phase Separation Method Using Different Macromolecular Additives', *J. Membr. Sci.*, **327**, 125 (2009).

35. U.B. Kavurt, M. Marioli, W.T. Kok, D. Stamatialis, 'Membranes for Separation of Biomacromolecules and Bioparticles Via Flow Field-Flow Fractionation', *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **90**, 11 (2015).
36. H. Hagendorfer, R. Kaegi, J. Traber, S.F.L. Mertens, R. Scherrers, C. Ludwig, A. Ulrich, 'Application of an Asymmetric Flow Field Flow Fractionation Multi-Detector Approach for Metallic Engineered Nanoparticle Characterization – Prospects and Limitations Demonstrated on Au Nanoparticles', *Anal. Chim. Acta*, **707**, 367 (2011).
37. A. Ulrich, S. Losert, N. Bendixen, A. Al Kattan, H. Hagendorfer, B. Nowack, C. Adlhart, J. Ebert, M. Lattuadae, K.J. Hungerbühler, 'Critical Aspects of Sample Handling for Direct Nanoparticle Analysis and Analytical Challenges Using Asymmetric Field Flow Fractionation in a Multi-Detector Approach', *J. Anal. At. Spectrom.*, **27**, 1120 (2012).
38. K. Loeschner, J. Navratilova, S. Legros, S. Wagner, R. Grombe, J. Snell, F. von der Kammer, E.H. Larsen, 'Optimization and Evaluation of Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation of Silver Nanoparticles', *J. Chromatogr. A*, **1272**, 116 (2013).
39. H. Hagendorfer, R. Kaegi, M. Parlinska, B. Sinnet, C. Ludwig, A. Ulrich, 'Characterisation of Silver Nanoparticle Products Using Asymmetric Flow Field Flow Fractionation with a Multidetector Approach – A Comparison to TEM and Batch-DLS', *Anal. Chem.*, **84**(6), 22678 (2012).
40. C.A. Sötebier, F.S. Bierkandt, S. Rades, N. Jakubowski, U. Panne, S.M. Weidner, 'Sample Loss in Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation Coupled to Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry of Silver Nanoparticles', *J. Anal. At. Spectrom.*, **30**, 2214 (2015).
41. T.K. Mudalige, H. Qu, G. Sánchez-Pomales, P.N. Sisco, S.W. Linder, 'Simple Functionalization Strategies for Enhancing Nanoparticle Separation and Recovery with Asymmetric Flow Field Flow Fractionation', *Anal. Chem.*, **87**, 1764 (2015).
42. A. Boschetti-de-Fierro, M. Voigt, M. Storr, B. Krause, 'MCO Membranes: Enhanced Selectivity in High-Flux Class', *Sci. Rep.*, **5**, 18448 (2015).
43. B. Meisterjahn, S. Wagner, F. von der Kammer, D. Hennecke, T. Hofmann, 'Silver and Gold Nanoparticle Separation Using Asymmetrical Flow-Field Flow Fractionation: Influence of Run Conditions and of Particle and Membrane Charges', *J. Chromatogr. A*, **1440**, 150 (2016).
44. R. Saenmuangchinn, J. Mettakoonpitak, J. Shiowatana, A. Siripinyanond, 'Separation of Silver Nanoparticles by Hollow Fiber Flow Field-Flow Fractionation: Addition of Tannic Acid into Carrier Liquid as a Modifier', *J. Chromatogr. A*, **1415**, 115 (2015).
45. 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**, 205 (2016).
46. M.E. Schimpf, in *Field-Flow Fractionation Handbook*, eds M.E. Schimpf, K.D. Caldwell, J.C. Giddings, Wiley-Interscience, New York, 71, 2000.
47. H. Dou, E.C. Jung, S. Lee, 'Factors Affecting Measurement of Channel Thickness in Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation', *J. Chromatogr. A*, **1393**, 115 (2015).
48. J.N. Israelachvili, 'Electrostatic forces between surfaces in liquids', in *Intermolecular and Surface Forces*, 3rd edition, Academic Press, San Diego, 291–340, 2011.
49. J. Gigault, J.M. Pettibone, C. Schmitt, V.A. Hackley, 'Rational Strategy for Characterization of Nanoscale Particles by Asymmetric-Flow Field Flow Fractionation: A Tutorial', *Anal. Chim. Acta*, **809**, 9 (2014).
50. M. Baalousha, F.V.D. Kammer, M. Motelica-Heino, H.S. Hilal, P. Le Coustumer, 'Size Fractionation and Characterization of Natural Colloids by Flow-Field Flow Fractionation Coupled to Multi-Angle Laser Light Scattering', *J. Chromatogr. A*, **1104**, 272 (2006).
51. Y. Pan, S. Neuss, A. Leifert, M. Fischler, F. Wen, U. Simon, G. Schmid, W. Brandau, W. Jahnke-Dechent, 'Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles', *Small*, **3**, 1941 (2007).
52. J. Gigault, V.A. Hackley, 'Observation of Size-Independent Effects in Nanoparticle Retention Behavior During Asymmetric-Flow Field-Flow Fractionation', *Anal. Bioanal. Chem.*, **405**, 6251–6258 (2013).
53. J. Heroult, V. Nischwitz, D. Bartczak, H. Goenaga-Infante, 'The Potential of Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation Hyphenated to Multiple Detectors for the Quantification and Size Estimation of Silica Nanoparticles in a Food Matrix', *Anal. Bioanal. Chem.*, **406**, 3919 (2014).
54. F. Barahona, O. Geiss, P. Urbán, I. Ojea-Jimenez, D. Gilliland, J. Barrero-Moreno, 'Simultaneous Determination of Size and Quantification of Silica Nanoparticles by Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation Coupled to ICPMS Using Silica Nanoparticles Standards', *Anal. Chem.*, **87**, 3039 (2015).
55. D. Bartczak, P. Vincent, H. Goenaga-Infante, 'Determination of Size- and Number-Based Concentration of Silica Nanoparticles in a Complex Biological Matrix by Online Techniques', *Anal. Chem.*, **87**, 5482 (2015).
56. M. Wagner, S. Holzschuh, A. Traeger, A. Fahr, U.S. Schubert, 'Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation in the Field of Nanomedicine', *Anal. Chem.*, **86**, 5201 (2014).
57. Q.H. Tran, V.Q. Nguyen, A.-T. Le, 'Silver Nanoparticles: Synthesis, Properties, Toxicology, Applications and Perspectives', *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.*, **4**, 33001 (2013).
58. K. Ramos, L. Ramos, C. Cámara, M.M. Gómez-Gómez, 'Characterization and Quantification of Silver

- Nanoparticles in Nutraceuticals and Beverages by Asymmetric Flow Field Flow Fractionation Coupled with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry', *J. Chromatogr. A*, **1371**, 227 (2014).
59. G. Artiaga, K. Ramos, L. Ramos, C. Cámara, M. Gómez-Gómez, 'Migration and Characterisation of Nanosilver from Food Containers by AF4-ICP-MS', *Food Chem.*, **166**, 76 (2015).
 60. E. Bolea, J. Jimenez-Lamana, F. Laborda, I. Abad-Alvaro, C. Bladé, L. Arola, J.R. Castillo, 'Detection and Characterization of Silver Nanoparticles and Dissolved Species of Silver in Culture Medium and Cells by AsFIFFF-UV-vis-ICPMS: Application to Nanotoxicity Tests', *Analyst*, **139**, 914 (2014).
 61. Y. Lan, Y. Lu, Z. Ren, 'Mini Review on Photocatalysis of Titanium Dioxide Nanoparticles and their Solar Applications', *Nano Energy*, **2**, 1031 (2013).
 62. J.P.F.G. Helsper, R.J. Peters, M.E. van Bommel, Z.E. Rivera, S. Wagner, F. von der Kammer, P.C. Tromp, T. Hofmann, S. Weigel, 'Physicochemical Characterization of Titanium Dioxide Pigments Using Various Techniques for Size Determination and Asymmetric Flow Field Flow Fractionation Hyphenated with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry', *Anal. Bioanal. Chem.*, **408**, 6679 (2016).
 63. D. Knopp, D. Tang, R. Niessner, 'Review: Bioanalytical Applications of Biomolecule-Functionalized Nanometer-Sized Doped Silica Particles', *Anal. Chim. Acta*, **647**, 14–30 (2009).
 64. C. Argyo, V. Weiss, C. Bräuchle, T. Bein, 'Multifunctional Mesoporous Silica Nanoparticles as a Universal Platform for Drug Delivery', *Chem. Mater.*, **26**, 435 (2014).
 65. A. Kolodziejczak-Radzimska, T. Jesionowski, 'Zinc Oxide—from Synthesis to Application: A Review', *Materials (Basel)*, **7**, 2833–2881 (2014).
 66. P. Gajjar, B. Pettee, D.W. Britt, W. Huang, and A.J. Anderson, 'Antimicrobial Activities of Commercial Nanoparticles Against an Environmental Soil Microbe, *Pseudomonas putida* KT2440', *J. Biol. Eng.*, **3**, 1 (2009).
 67. L. He, Y. Su, J. Lanhong, S. Shi, 'Recent Advances of Cerium Oxide Nanoparticles in Synthesis, Luminescence and Biomedical Studies: A Review', *J. Rare Earth.*, **33**, 791 (2015).
 68. C. Xu, X. Qu, 'Cerium Oxide Nanoparticle: A Remarkably Versatile Rare Earth Nanomaterial for Biological Applications', *NPG Asia Mater.*, **6**, e90 (2014).
 69. M.P. Rayman, 'Food-Chain Selenium and Human Health: Emphasis on Intake', *Br. J. Nutr.*, **100**, 254–268 (2008).
 70. J. Dobias, E.I. Suvorova, R. Bernier-Latmani, 'Role of Proteins in Controlling Selenium Nanoparticle Size', *Nanotechnology*, **22**, 195605 (2011).
 71. J. Zhang, X. Wang, T.T. Xu, 'Elemental Selenium at Nano Size (Nano-Se) as a Potential Chemopreventive Agent with Reduced Risk of Selenium Toxicity: Comparison with se-Methylselenocysteine in Mice', *Toxicol. Sci.*, **101**, 22–31 (2008).
 72. H. Wang, J. Zhang, H. Yu, 'Elemental Selenium at Nano Size Possesses Lower Toxicity without Compromising the Fundamental Effect on Selenoenzymes: Comparison with Selenomethionine in Mice', *Free Radic. Biol. Med.*, **42**, 1524–1533 (2007).
 73. P. Vera, Y. Echegoyen, E. Canellas, C. Nerín, M. Palomo, Y. Madrid, C. Cámara, 'Nano Selenium as Antioxidant Agent in a Multilayer Food Packaging Material', *Anal. Bioanal. Chem.*, **408**, 6659 (2016).
 74. M.-M. Pornwilarad, W. Somchue, J. Shiowatana, A. Siripinyanond, 'Flow Field-Flow Fractionation for Particle Size Characterization of Selenium Nanoparticles Incubated in Gastrointestinal Conditions', *Food Res. Int.*, **57**, 208 (2014).
 75. M. Palomo-Siguero, M.I. López-Heras, C. Cámara, Y. Madrid, 'Accumulation and Biotransformation of Chitosan-Modified Selenium Nanoparticles in Exposed Radish (*Raphanus sativus*)', *J. Anal. At. Spectrom.*, **30**, 1237 (2015).

A.2. Elementos traza: ¿qué es la especiación?

Gustavo Moreno-Martín, Yolanda Madrid Albarrán

Estrategias avanzadas para la mejora de la calidad, la seguridad y la funcionalidad de los alimentos; María Luisa Marina Alegre, María Castro Puyana, Merichel Plaza del Moral (Eds.) (2021)

21. Elementos traza: ¿qué es la especiación?

Gustavo Moreno Martín*, Yolanda Madrid Albarrán

*Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas,
Universidad Complutense de Madrid, Madrid.*

Resumen

Conocer la forma química en que se encuentran los elementos traza en una muestra es imprescindible para poder evaluar sus efectos sobre la salud y el medioambiente. Es en este punto donde la especiación juega un papel crucial, ya que se define como aquel proceso que proporciona evidencia de la forma química en que se encuentra un elemento. Su principal objetivo es llevar a cabo una identificación inequívoca de las especies en la muestra. Sin embargo, se ve dificultado por los procesos de tratamiento y almacenamiento de la muestra que pueden alterar la forma química original en que se encuentran los elementos. Además, la ausencia de patrones para todas las especies y la necesidad de herramientas analíticas de alta sensibilidad y selectividad para su detección, no facilitan este proceso.

Este capítulo se puede dividir en dos partes. Una primera donde se muestra mediante ejemplos cómo la forma química de los elementos traza está directamente relacionada con su toxicidad y la importancia, por tanto, de su determinación. Y una segunda que muestra cómo llevar a cabo el proceso de especiación, sus aplicaciones más habituales y los últimos avances que van solucionando las dificultades de este proceso.

1. Elementos Trazas. Importancia de la Especiación

Los elementos traza se encuentran en el medioambiente en concentraciones muy bajas, del orden de mg/kg o µg/kg. Sin embargo, el hecho de que estén en concentraciones tan bajas no implica que no sean nocivos tanto para la salud como para los ecosistemas. Su presencia en el medioambiente es fruto

de actividades naturales y antropogénicas como minería, plantas incineradoras, vertederos, industria, etc. y, además, están en todo compartimento medioambiental (aire, agua y suelo) [1, 2].

La toxicidad de los elementos traza no solo depende de la concentración total, sino de la forma química en la que se encuentren. Para entenderlo mejor, si pensamos en un metal, éste se puede encontrar en el agua en distintas formas químicas dependiendo de las características del agua, principalmente del pH y la fuerza iónica [3]. En la **Figura 1** se puede apreciar cómo la toxicidad depende de la forma química. Siguiendo con el ejemplo de los metales, en un agua dura, aquella que tiene un alto contenido en Ca, Mg y carbonatos [3], los metales se encuentran precipitados en los sedimentos y, por tanto, su toxicidad es menor. De la misma manera, cuando los metales se encuentran asociados a macromoléculas, debido al gran tamaño que éstas presentan la toxicidad del metal en cuestión disminuye. Por el contrario, la mayor toxicidad de los metales se da cuando se encuentran en su forma libre y, por lo general, cuando están asociados a ligandos orgánicos. Por tanto, la forma química en la que se encuentre un elemento va a afectar a su biodisponibilidad [4], capacidad que tiene una sustancia, en este caso un elemento traza, de atravesar las barreras celulares. También se verán afectadas su movilidad [4] y bioacumulación [5], proceso por el que la concentración del elemento acaba siendo mayor en el interior del organismo que en el medio que le rodea. En definitiva, la forma química en la que se encuentren los elementos traza va a influir en su toxicidad.

Por todo ello, la IUPAC define especiación como aquel proceso que proporciona evidencia de la forma química en que se encuentra un elemento [6]. La especiación ha ido ganando complejidad con el paso de los años y ya no solo se intenta diferenciar entre estados de oxidación sino también entre proteínas y metaloproteínas [6].

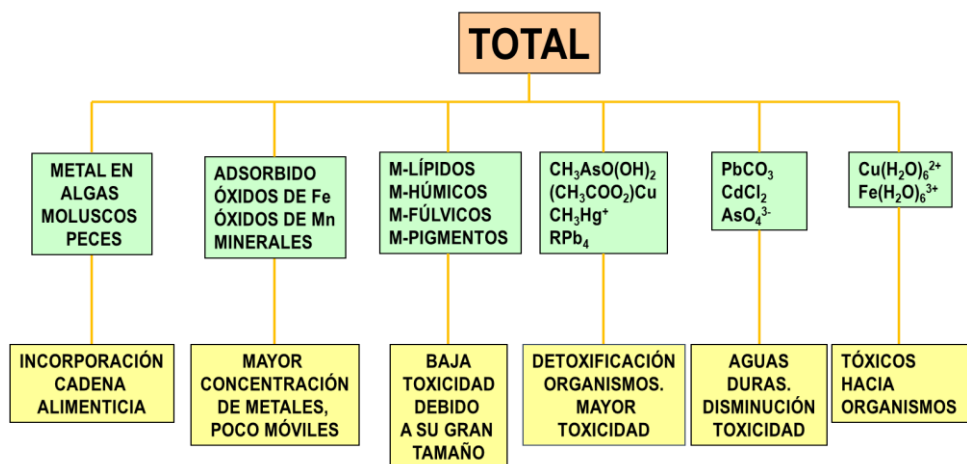


Figura 1. Toxicidad de los metales según su forma química y asociación.

1.1. Arsénico

El arsénico es un elemento químico cuyo símbolo es As y pertenece al grupo de los nitrogenoideos. Lo llamativo de este elemento es que ha sido protagonista y responsable de numerosos envenenamientos y asesinatos a lo largo de la historia [7]. Sin embargo, como se ha estado mencionando, su toxicidad va a depender de la forma química en la que se encuentre. Uno de los parámetros que nos permite evaluar la toxicidad de los compuestos es la dosis letal 50 (LD_{50}), que se define como aquella concentración del compuesto que provoca la muerte del 50% de un grupo de animales de experimentación y cuanto menor sea este LD_{50} , mayor será la toxicidad del compuesto. En el caso del As, la arsina sería la especie más tóxica al presentar el menor valor de LD_{50} (3 mg/kg) mientras que la arsenobetaina y la arsenocolina serían las especies menos tóxicas dado su valor de LD_{50} , que es similar al LD_{50} de la aspirina (1000- 16000 mg/kg) [8, 9].

La utilización de las aguas subterráneas como aguas de consumo está suponiendo un gran problema en muchos países debido a la presencia natural de As en este tipo de aguas [10]. El caso de Bangladesh es uno de los más conocidos ya que, en esta región, más de 70 millones de personas viven con el peligro de envenenamiento por As al existir millones de

manantiales contaminados por este elemento y, por las dificultades para acceder a fuentes de agua limpia principalmente por su localización [11, 12]. Además, en estas regiones las aguas subterráneas también se utilizan como aguas de regadío para el cultivo de arroz, lo que supone un nuevo riesgo para la población al acumularse el As en sus formas más tóxicas (As (III) y As (V)). De hecho, el contenido de As inorgánico en arroz y productos derivados está regulado a nivel europeo por el reglamento 2015/1006, donde se establecen unos niveles máximos de As inorgánico para estos productos comprendidos entre 0.1 y 0.3 mg/kg [13].

Hay que mencionar que el suministro de As en bajas concentraciones y de forma frecuente, lo convierten en un veneno lento que provoca síntomas como la decoloración de la piel y el deterioro del hígado y los riñones, desencadenando la enfermedad conocida como Arsenicosis [14].

1.2. Estaño

El estaño pertenece al grupo de los carbonoideos y su símbolo es Sn. En cuanto a su toxicidad, los valores de LD₅₀ nos indican que los compuestos pertenecientes al grupo R₃SnX (9 mg/kg) son los más tóxicos [15], siendo R un grupo alquilo y X un halógeno. Dentro de este grupo destacan los tributilestaño (TBT), que se han empleado especialmente como biocidas en pinturas para barcos. Su gran aplicación ha provocado una disminución en la producción de moluscos, tales como ostras y mejillones, y malformaciones en moluscos bivalvos [16]. Además, estos compuestos tienen otro peligro asociado, y es que actúan como un disruptor hormonal o endocrino y, por tanto, son capaces de alterar el sistema hormonal del organismo y generar su disfunción [17].

El efecto de los TBT sobre los moluscos se ha observado en la aparición del fenómeno conocido como imposex. Dicho fenómeno se basa en la masculinización de la hembra, es decir, la superimposición de caracteres sexuales masculinos sobre el sistema reproductivo de las hembras [18, 19].

1.3. Mercurio

El mercurio, de símbolo Hg, pertenece al grupo de los metales de transición y no solo se caracteriza por ser un líquido a temperatura ambiente, sino porque también es uno de los elementos traza más tóxicos. De entre las especies de mercurio, el metilmercurio (CH_3Hg) es la especie más tóxica, ya que su valor de LD_{50} es de 5 mg kg^{-1} frente a 20 mg/kg del mercurio inorgánico (Hg^{2+}) [20]. De hecho, el metilmercurio fue el responsable de uno de los accidentes medioambientales más graves de la historia, el desastre ecológico de la bahía de Minamata (Japón). Esto sucedió en el año 1950 cuando una planta de polivinilo emitía grandes cantidades (100 mg/L) de Hg^{2+} a las aguas de la bahía de Minamata. Este mercurio inorgánico era metilado por las bacterias presentes en las aguas formándose la especie CH_3Hg , que era acumulado por los peces de esta zona. Con el tiempo, comenzaron a sucederse cientos de muertes y algunas con malformaciones que se asociaron a una enfermedad neurotóxica desconocida, capaz de transmitirse al feto, cuyos síntomas eran una progresiva debilidad muscular, pérdida de visión, deterior de las actividades cerebrales e incluso parálisis que provocaban el coma o la muerte. El origen de esta enfermedad se encontraba en el pescado procedente de la bahía de Minamata y el causante era el CH_3Hg , acumulado en grandes cantidades en estos peces, tras ser metilado el Hg^{2+} emitido por la planta de polivinilo [21, 22].

Llegados a este punto, podemos decir que el CH_3Hg se caracteriza por ser una de las especies más tóxicas que se bioacumula y biomagnifica a lo largo de la cadena alimenticia [23, 24]. Esto quiere decir que su concentración no solo es mayor en el interior del organismo que en el medio, sino que al ascender en la cadena alimenticia su concentración también va aumentando. Además, presenta una elevada afinidad por los grupos tiol ($-\text{SH}$) de enzimas y proteínas. Y lo que es más importante, se trata de una sustancia neurotóxica que puede provocar problemas neuronales e incluso la muerte con síntomas como la pérdida de visión, falta de coordinación muscular y/o malformaciones [23, 25, 26].

1.4. Selenio

El selenio de símbolo Se pertenece al grupo de los anfígenos y, a diferencia del resto de los elementos anteriores tiene una doble cara, esencial y tóxica. Se considera que es un elemento esencial porque previene de la toxicidad de metales como Hg, pero fundamentalmente porque forma parte de las selenoproteínas, que se caracterizan por sus propiedades antioxidantes y anticarcinogénicas [27]. Esta esencialidad ha hecho que el Se se utilice como suplemento tanto en la alimentación animal como humana [28]. En el caso de los animales, hace ya tiempo que se administra selenio no solo para aumentar sus niveles en las reses sino para prevenir la degeneración de los músculos, también conocida como síndrome del músculo blanco [29, 30]. Sin embargo, al ser suministrado como selenio inorgánico, especie más tóxica, debe controlarse la dosis ya que una ingesta excesiva puede provocar la enfermedad conocida como selenosis, cuyos síntomas son la pérdida de pelo y la aparición de malformaciones [31, 32]. Por el contrario, en la alimentación humana el selenio es suministrado como selenometionina, una de las especies orgánicas de este elemento que se caracteriza por ser menos tóxica que las especies inorgánicas (Se (IV) y Se (VI)) [33, 34].

1.5. Cromo

El cromo pertenece al grupo de los metales de transición y su símbolo es Cr. Este elemento se puede encontrar como Cr (III) o Cr (VI), ambos con características y propiedades antagónicas. Mientras el Cr (III), cuyo principal aporte es a través de la dieta, es un elemento esencial para el organismo ya que está involucrado en el metabolismo de lípidos y forma parte del factor de tolerancia a la glucosa, es decir, es imprescindible para la acción de la insulina. El Cr (VI) provoca graves daños en el ADN que pueden causar mutaciones, aberraciones cromosómicas y/o transformaciones celulares [35, 37].

2. Dificultades de la Especiación

Demostrada en la sección anterior la importancia de determinar la forma química en la que se encuentran los elementos traza a continuación, se describirá la metodología empleada para la determinación de las especies.

Antes de comenzar con la metodología, se debe tener en cuenta que la especiación no es una tarea fácil. La dificultad reside en la necesidad de determinar cada una de las especies de interés a unos niveles de concentración muy pequeños, siendo necesario el empleo de técnicas de elevada sensibilidad y selectividad. A esto se debe añadir, que cualquier etapa que conlleva el proceso analítico puede alterar la forma inicial de las especies y con ello, la representatividad y veracidad del resultado final [38, 39].

2.1. Etapas del proceso analítico. Efecto sobre las especies

El proceso analítico empieza con la toma de la muestra y su almacenamiento, ya que, generalmente, esta no se analiza nada más llegar al laboratorio. A continuación, se realiza el tratamiento de la muestra para extraer los analitos (especies, en este caso) de interés y se lleva a cabo el análisis para su identificación y cuantificación. Por último, los resultados obtenidos se interpretan de manera adecuada.

2.1.1. Almacenamiento de la muestra

Durante el almacenamiento de la muestra se puede producir una degradación de las especies que puede ser de naturaleza biótica, cuando los responsables son los microorganismos, o de naturaleza abiótica, si la luz y/o reacciones químicas relacionadas con el pH o la temperatura son los culpables de dicha degradación. Además, el material del propio contenedor, en el que se almacena la muestra, puede dar lugar a fenómenos de adsorción y/o contaminación de las especies [40].

Uno de los métodos más utilizados para evitar la proliferación de microorganismos en alimentos y mejorar su conservación es la irradiación [41]. Sin embargo, este proceso puede provocar una transformación de las especies. Este efecto fue observado por Pizarro y col. [42] en un trabajo en el que la irradiación de una muestra de arroz provocó la transformación de las especies de arsénico al desaparecer la especie arsenobetaina (AsB) con respecto a las especies encontradas en la muestra no irradiada.

2.1.2. *Tratamiento de la muestra*

Una vez almacenada la muestra de forma adecuada para evitar la transformación y/o degradación de las especies, el siguiente paso es proceder a su extracción. Los dos principales objetivos que se persiguen en esta etapa son:

- i. La extracción de las especies ha de ser cuantitativa.
- ii. La integridad de las especies ha de mantenerse.

Actualmente existen muchos procedimientos de extracción de especies basados en hidrólisis ácida, básica y enzimática e incluso procedimientos de derivatización. En los últimos años la aplicación en la extracción de las especies de técnicas como la extracción asistida por microondas, la microextracción en fase sólida, la sonda y el baño de ultrasonidos, así como la extracción con líquidos presurizados han permitido acelerar este tratamiento de la muestra [43]. A pesar de disponer de una gran variedad de tratamientos para la extracción de las especies, una cosa que se debe tener muy en cuenta es que, para una misma especie, no existe un único tratamiento que sirva para todas las matrices, tal y como demostraron Ruiz-Chancho y col. [44]. Estos investigadores comprobaron que con el extractante metanol:agua, en proporción 1: 9, obtenían una eficiencia de extracción de As en hojas de tabaco Virginia del ($95 \pm 8\%$). Sin embargo, cuando este mismo medio de extracción lo aplicaron para extraer el As en hojas de otro tipo de plantas, comprobaron que la eficiencia de extracción fue en todos los casos inferior al 45%. Por tanto, este ejemplo demuestra que para cada matriz se debe optimizar un procedimiento de extracción, aunque se trate de las mismas especies.

A la hora de extraer las especies de una muestra, siempre se deben probar diferentes medios de extracción ya que, pueden afectar a la integridad de las especies. Esto fue comprobado por Cabañero y col. [45] al optimizar la extracción de CH_3Hg en una muestra de atún. Probaron tres medios de extracción: ácido clorhídrico 5 M, potasa/metanol 25% (w/v) (KOH/MeOH) e hidróxido de tetrametilamonio/ metanol 25% (w/v) (TMAH/MeOH) con unas eficiencias de extracción del 97, 64 y 97%,

respectivamente. Sin embargo, en la **Figura 2** se puede comprobar como cuando realizaron la especiación de CH_3Hg , en el caso del TMAH/ MeOH apareció un pico de dimetilmercurio ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$). Esta especie no aparece en la muestra, sino que se ha generado de forma artificial por reacción del mercurio con el extractante.

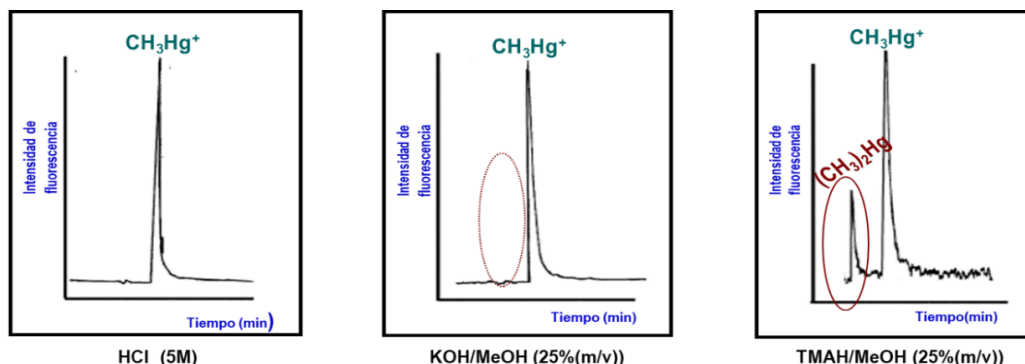


Figura 2. Efecto del agente extractante sobre las especies de Hg. Modificada y reproducida con permiso de [45].

3. Separación, identificación y cuantificación de especies

Una vez extraídas las especies de la muestra, la siguiente etapa consiste en su separación, identificación y cuantificación con el objetivo principal de llevar a cabo la identificación inequívoca de las especies presentes en la muestra. Aunque la carencia de patrones para todas las especies dificulta su identificación inequívoca, el desarrollo de la espectrometría de masas en tándem está ayudando a resolver este problema.

La forma más habitual para llevar a cabo la especiación es mediante las técnicas acopladas, es decir, una técnica de separación, que proporciona la selectividad, junto con una técnica de detección de elevada sensibilidad. Como técnicas de separación, las más habituales son la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) y la cromatografía de gases (GC) que, aunque pueden acoplarse a múltiples detectores, el más empleado para la

especiación es la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) [46].

3.1. HPLC-ICP-MS

El acoplamiento HPLC-ICP-MS es uno de los más utilizados en el campo de la especiación por las características que proporcionan ambas técnicas [47, 48]. La cromatografía de líquidos otorga una gran versatilidad tanto en fases móviles como en fases estacionarias y, no requiere de una etapa previa de derivatización. Por su parte, la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente aporta grandes ventajas al ser una técnica multielemental, que permite medir diferentes elementos de manera simultánea, presentar amplios intervalos lineales (entre 5- 6 órdenes de magnitud), permitir una cuantificación inequívoca a través de la dilución isotópica y tener una elevada sensibilidad, con límites de detección comprendidos entre 1 y 100 ng/L, dependiendo del elemento. Hay que destacar que, para el acoplamiento de ambas técnicas se debe reducir el contenido orgánico de las fases móviles utilizadas en HPLC, dado que desestabilizan el plasma del ICP-MS [49].

Algunos ejemplos de especiación que se han llevado a cabo con este acoplamiento incluyen metabolismo de selenio en plantas, el efecto del procesado de alimentos sobre la integridad de las especies y la determinación de arsénico inorgánico en arroz. Estos estudios quedan detallados en sus correspondientes apartados.

3.1.1. Metabolismo de selenio en plantas

Pedrero y col. [50] estudiaron la formación de especies de selenio por la hortaliza *Raphanus sativus*, cuando fue cultivada en presencia de este elemento en forma de Se (IV) y de Se (VI), a un nivel de concentración de 1 mg Se/L. Para este estudio, los rábanos fueron primero germinados en fibra de coco humedecida con agua desionizada. Después de la germinación, tres lotes de 12 plantas cada uno se hicieron crecer en cultivo hidropónico utilizando perlita como sustrato y solución Hoagland de fuerza 0.1 como nutriente. En dos de los lotes la solución nutritiva contenía además 1 mg Se/L, en forma de Se (IV) y Se (VI), mientras que en el tercero no se

adicionó selenio para tenerlo como control. A los 40 días se recolectaron las muestras y, se determinó tanto el contenido total de selenio que habían acumulado como las especies que se habían formado. Para la determinación del contenido total, las muestras se midieron por ICP-MS previa mineralización ácida en un horno de microondas. Y para el estudio de especiación, se realizó una hidrólisis enzimática que consistía en añadir a 250 mg de muestra fresca, 3 ml de agua y 10 mg de proteasa XIV. A continuación, la mezcla se sonicó en una sonda de ultrasonidos durante 2 minutos y se centrifugó utilizando filtros de corte de 10 KDa antes del análisis por HPLC-ICP-MS. Para la separación de las especies de selenio formadas, utilizaron una columna de intercambio aniónico, PRP-X100, y como fase móvil citrato de amonio 10 mM a pH 5.0 con un 2% de MeOH.

En cuanto al contenido total de selenio no hubo diferencias significativas entre los lotes cultivados con Se (IV) y Se (VI), ya que los valores obtenidos fueron de (112 ± 7) y (120 ± 6) $\mu\text{g Se/g}$, respectivamente. Sin embargo, tras el análisis de las especies (**Figura 3**) observaron, que el lote cultivado en presencia de Se (IV) transformó el 95 % del contenido en selenio a Se orgánico, mientras que en el lote cultivado con Se (VI) el 60% permaneció como Se (VI). Los resultados ponen de manifiesto que el metabolismo del selenio en plantas es dependiente de su forma química.

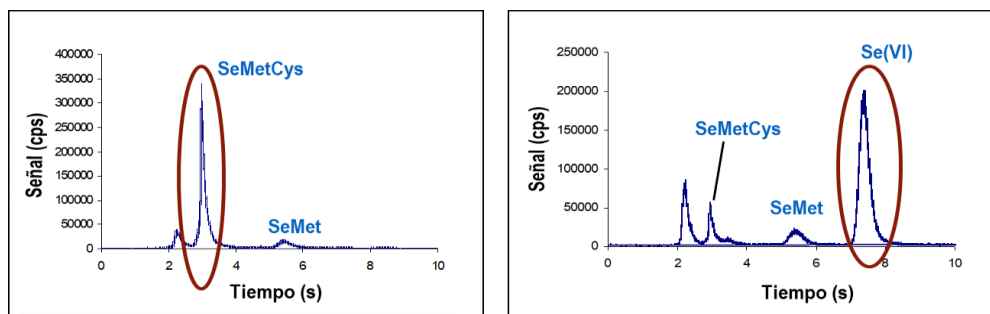


Figura 3. Transformación de Se (IV), izquierda, y Se (VI), derecha, por *Raphanus sativus*. Modificada y reproducida con permiso de [50].

3.1.2. Efecto del procesado del alimento sobre la integridad de las especies

Pedrero y col. [51] estudiaron la integridad de las especies de selenio en la parte comestible del brócoli, antes y después de ser sometido a un proceso de cocción de 10 minutos. El cultivo del brócoli en presencia de selenio, en forma de Se (IV), y el tratamiento posterior para la determinación del contenido total y la identificación de las especies, es idéntico al mencionado en el apartado anterior. La **Figura 4** muestra que el brócoli sería una fuente de seleno-metil-selenocisteína (SeMetCys) si se consumiera crudo. Sin embargo, tras ser cocinado se produce una transformación de esta especie en otras especies orgánicas y Se (VI), no presente en la muestra cruda.

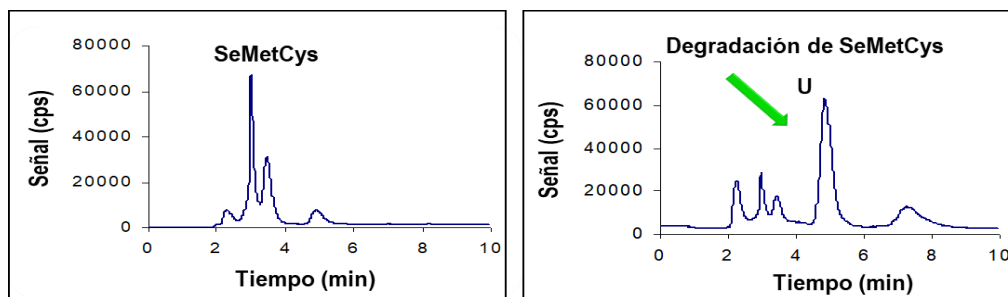


Figura 4. Especies de Se en el brócoli antes (izquierda) y después (derecha) de ser cocinado. Modificada y reproducida con permiso de [51].

3.1.3. Determinación de arsénico inorgánico en productos derivados del arroz

Cunha da Rosa y col. [52] llevaron a cabo la especiación de arsénico en diferentes muestras de leche de arroz compradas en un supermercado local de Brasil. La determinación del contenido total de arsénico se realizó mediante una digestión ácida en microondas, previa a la medida por ICP-MS. Para la determinación de las especies, al tratarse de una muestra líquida no aplicaron ningún procedimiento de extracción, sino que diluyeron la muestra en la fase móvil y las filtraron antes de su inyección por HPLC-ICP-MS. Para la separación de las distintas especies utilizaron una columna de intercambio aniónico, PRP-X100 y como fase móvil hidrógenofosfato de amonio ((NH₄)₂HPO₄) 9.0 mM a pH 6.00. Las especies de As encontradas

en la mayoría de las muestras fueron As (III), As (V), dimetil-arsénico (DMA) y monometil-arsénico (MMA), mostrándose en la **Figura 5** el cromatograma correspondiente a una de las muestras analizadas. Como se ha comentado anteriormente el As inorgánico es la especie más tóxica y debe controlarse en arroz y productos de base arroz.

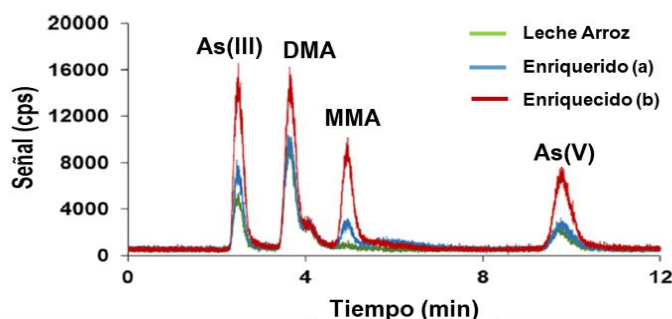


Figura 5. Especies de As en leche de arroz. Modificada y reproducida con permiso de [52].

3.2. GC-ICP-MS

Aunque el acoplamiento GC-ICP-MS no se utiliza tanto como el anterior, su aplicación en especiación está bastante extendida. El motivo podría atribuirse, por un lado, al propio acoplamiento entre el cromatógrafo de gases y el ICP-MS que es la parte crítica ya que, no solo debe ser calentada para evitar la condensación de los analitos, sino que su montaje/desmontaje es bastante laborioso. Y por otro, a las características de la cromatografía de gases, que solo es aplicable a compuestos volátiles y térmicamente estables lo que supone tener que recurrir en ocasiones a reacciones previas de derivatización, para la obtención de productos de fácil volatilización. Sin embargo, a su favor cabe destacar que este tipo de acoplamiento no requiere ni de fases móviles ni de nebulizador, dado que los analitos están en estado gaseoso [49].

La especiación de compuestos organoestánicos es una de las aplicaciones donde más se ha extendido el empleo de este acoplamiento GC-ICP-MS.

3.2.2. Determinación de compuestos organoestánicos

Moens y col. [53] pusieron a punto un método para la determinación de compuestos organoestánicos en sedimentos, basado en la microextracción en fase sólida (SPME) con detección por GC-ICP-MS. La extracción de los compuestos se llevó a cabo mediante agitación ultrasónica del sedimento con ácido acético/ metanol. A continuación, tras un proceso de centrifugación, el extracto fue transferido a un vial donde se adicionó el agente derivatizante, tetraetilborato de sodio ($\text{NaB}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$), para volatilizar los compuestos orgánicos de estaño. La extracción de los analitos se realizó con una fibra de polidimetilsiloxano que se expuso en el espacio en cabeza del vial durante 10 min. Transcurrido este tiempo, la fibra se desorbió térmicamente durante 1 minuto en el puerto de inyección del GC a 250 °C para su posterior detección por ICP-MS. El método desarrollado fue validado con un material de referencia certificado, PACS-1, para la determinación de monobutil, dibutil y tributilestaño.

4. Avances en la identificación de compuestos

Como ya se ha comentado, una de las principales dificultades de la especiación es la identificación inequívoca de las especies por la falta de patrones. Sin embargo, este problema se está comenzando a solucionar con la utilización de la espectrometría de masas en tándem. El acoplamiento de las técnicas cromatográficas a este detector se está utilizando de manera complementaria a los acoplamientos HPLC-ICP-MS y GC-ICP-MS, para la confirmación y elucidación de especies desconocidas [54-58].

4.1. Confirmación y elucidación de especies de Se

Moreno-Martin y col. [59] demostraron como la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS) es una buena herramienta que complementa los estudios de especiación realizados por HPLC-ICP-MS. Los autores cultivaron plantas de rábano en presencia de Se (IV) y nanopartículas de selenio (SeNPs) durante 3 meses. Transcurrido ese tiempo, recolectaron las muestras y determinaron las especies de selenio formadas durante el cultivo. La extracción de las especies se llevó a cabo empleando hidrólisis enzimática con proteasa.

Finalmente, la mezcla se centrifugó y el sobrenadante se analizó por HPLC acoplado a ICP-MS y MS/MS. La disponibilidad de patrones permitió identificar por HPLC-ICP-MS las especies selenometionina (SeMet), seleno-metil-selenocisteína (SeMetSeCys) y γ -glutamyl seleno-metil-selenocisteína (γ -glutamyl-SeMetSeCys) y selenometionina oxidada (SeMetO) en los extractos. A pesar de ello, el análisis del extracto por HPLC-MS/MS (**Figura 6**) permitió confirmar la identidad de las especies previamente detectadas por HPLC-ICP-MS.

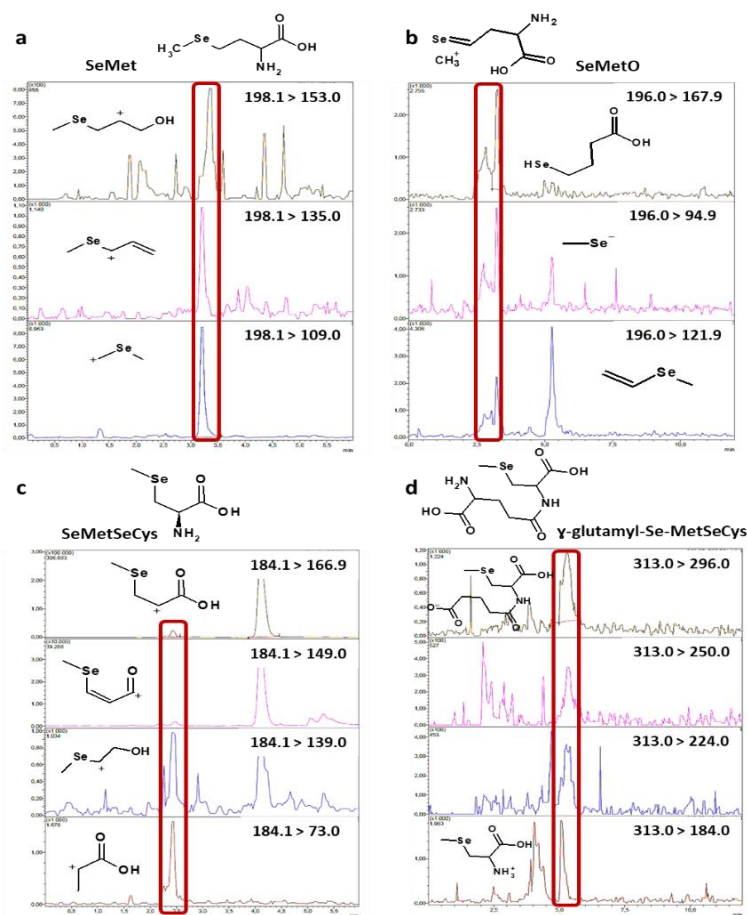


Figura 6. Resultados por HPLC-ESI-MS/MS para la confirmación de especies de selenio en muestras de rábano cultivadas en presencia de selenio. Modificada y reproducida con permiso de [59].

5. Importancia de la especiación

Los aspectos más relevantes y consideraciones acerca de la especiación quedan resumidos en los siguientes puntos:

- Determinar la forma química de un elemento traza es indispensable para conocer su toxicidad.
- Los estudios de especiación permiten conocer la forma química en la que se encuentra un elemento y, son imprescindibles para establecer el efecto de los metales sobre el medioambiente.
- La especiación implica la aplicación de una gran variedad de técnicas y metodologías analíticas que requieren, por tanto, de estudios multidisciplinarios.
- La falta de patrones para la identificación de las especies y la multitud de fuentes de errores durante el tratamiento de la muestra, dificultan este tipo de estudios.
- Los resultados obtenidos de los estudios de especiación son de gran utilidad para medicina, nutrición, biología, bioquímica, toxicología, etc.
- La legislación aún se sigue basando en contenidos totales y no en especies. En la actualidad solo se encuentran legislados en especies, el contenido de Cr (VI) y TBT (tributilestano) en aguas y el As inorgánico en arroz y productos que contienen este cereal.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Ciencia e Innovación (CTQ2017-83569-C2-1-R) y a la Comunidad de Madrid y fondos europeos de los programas FSE y FEDER (proyecto S2018/BAA-4393, AVANSECAL-II-CM) la financiación concedida. Gustavo Moreno Martín agradece a la Universidad Complutense de Madrid su beca predoctoral (CT42/18-CT43/18).

Bibliografia

1. P. B. Tchounwou, C. G. Yedjou, A. K. Patlolla, D. J. Sutton. Heavy Metals Toxicity and the Environment, *Exp. Suppl*, 2012, 101, 133-164.
2. A.L.O. da Silva, P.R.G. Barrocas, S. do Couto Jacob, J.C. Moreira. Dietary intake and health effects of selected toxic elements, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 2005, 17, 79-93.
3. A.K Shanker. Mode of Action and Toxicity of Trace Elements. In: M.N. V. Prasad (Ed) *Trace Elements as Contaminants and Nutrients: Consequences in Ecosystems and Human Health*. John Wiley & Sons, Inc: Canada, 2008, 523-553.
4. V. Cozzolino, L. Perelomov, A. Violante, M. Pigna, A. Caporale. Mobility and Bioavailability of Heavy Metals and Metalloids in Soil Environments, *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2010, 10, 268-292.
5. P. J. Van den Brink, R. M. Mann, M.G. Vijver, W. J. G. M. Peijnenburg. Metals and Metalloids in Terrestrial Systems: Bioaccumulation, Biomagnification and Subsequent Adverse Effects, *Ecological Impacts of Toxic Chemicals*, 2011, 43-62.
6. J. Feldmann, A. Elgazali, M.F. Ezzeldin, Z. Gajdosechova, E. Krupp, F. Aborode, M.M. Lawan, A. Raab, A.H. Petursdottir, K. Amayo. Microwave-Assisted Sample Preparation for Element Speciation. In: E.M. De Moraes Flores (Ed) *Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Determination*. Elsevier. Inc.: United Kingdom, 2014, 281-312.
7. S. Kapaj, H. Peterson, K. Liber, P. Bhattacharya. Human health effects from chronic arsenic poisoning - A review, *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 2006, 41, 2399-2428.
8. M. Bissen, F. H. Frimmel, C. Ag. Arsenic – a Review . Part I: Occurrence , Toxicity, Speciation, Mobility, *Acta Hydrochimica et hydrobiologica*, 2003, 31, 9-18.
9. B. Sadee, M. Foulkes, S. Hill,. Coupled techniques for arsenic speciation in food and drinking water: a review, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2015, 30, 102-118.
10. S. Shankar, U. Shanker, Shikha. Arsenic contamination of groundwater: A review of sources, prevalence, health risks, and strategies for mitigation, *Scientific World Journal*, 2014, 2014, 1-18.
11. M. Kippler, H. Skräder, S. M. Rahman, F. Tofail, M. Vahter. Elevated childhood exposure to arsenic despite reduced drinking water concentrations - A longitudinal cohort study in rural Bangladesh, *Environment International*, 2016, 86, 119-125.
12. M. Argos, T. Kalra, P.J. Rathouz, Y. Chen, B. Pierce, F. Parvez, T. Islam, A.

- Ahmed, M. Rakibuz-Zaman, R. Hasan, G. Sarwar, V. Slavkivich, A. Van Geen, J. Graziano, H. Ahsan. Arsenic exposure from drinking water, and all-cause and chronic-disease mortalities in Bangladesh (HEALS): A prospective cohort study, *Lancet*, 2010, 376, 252-258.
13. Reglamento (UE) 2015/1006 de la Comisión de 25 de junio de 2015 por el que se modifica el Reglamento (CE) 1881/2006 en cuanto al contenido máximo de arsénico inorgánico en los productos alimenticios. D. Of. la Unión Eur. 2015, 14-16.
 14. K.M. Hunt, R.K. Srivastava, C.A. Elmetts, M. Athar. The mechanistic basis of arsenicosis: Pathogenesis of skin cancer, *Cancer Letters*, 2014, 354, 211-219.
 15. M. Hoch. Organotin Compounds in the Environment- an overview, *Applied Geochemistry*, 2001, 16, 719-743.
 16. I. Omae. Organotin antifouling paints and their alternatives, *Applied Organometallic Chemistry*, 2003, 17, 81-105.
 17. S. Mitra, A. Srivastava, S. Khandelwal. Long term impact of the endocrine disruptor tributyltin on male fertility following a single acute exposure, *Environmental Toxicology*, 2017, 32, 2295-2304.
 18. A. Cruz, A.M. Anselmo, S. Suzuki, S. Mendo. Tributyltin (TBT): A review on microbial resistance and degradation, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2015, 45, 970-1006.
 19. B. Antizar-Ladislao. Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment, A review. *Environment International*, 2008, 34, 292-308.
 20. L. Magos, T.W. Clarkson. Overview of the clinical toxicity of mercury, *Annals of Clinical Biochemistry*, 2006, 43, 257-268.
 21. K. Eto. Minamata disease, *Neuropathology*, 2000, 20, S14-S19.
 22. S. Ekino, M. Susa, T. Ninomiya, K. Imamura, T. Kitamura. Minamata disease revisited: An update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning, *Journal of the Neurological Sciences*, 2007, 262, 131-144.
 23. M. Ravichandran. Interactions between mercury and dissolved organic matter - A review, *Chemosphere*, 2004, 55, 319-331.
 24. C. Chen, A. Amirbahman, N. Fisher, G. Harding, C. Lamborg, D. Nacci, D. Taylor. Methylmercury in marine ecosystems: Spatial patterns and processes of production, bioaccumulation, and biomagnification, *Ecohealth*, 2008, 5, 399-408.
 25. P. Li, X. Feng, G. Qiu. Methylmercury exposure and health effects from rice and fish consumption: A review, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2010, 7, 2666-2691.
 26. A. Antunes dos Santos, M. Appel Hort, M. Culbreth, C. Lopez-Granero, M. Farina, J.B.T. Rocha, M. Aschner. Methylmercury and brain development: A review of recent literature, *Journal of Trace Elements in Medicine and*

- Biology*, 2016, 38, 99-107.
27. Z. Gajdosechova, Z. Mester, J. Feldmann, E. M. Krupp. The role of selenium in mercury toxicity. Current analytical techniques and future trends in analysis of selenium and mercury interactions in biological matrices, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2018, 104, 95-109.
 28. M. Navarro-Alarcon, C. Cabrera-Vique. Selenium in food and the human body: A review, *Science of the Total Environment*, 2008, 400, 115-141.
 29. A. Steen, T. Strøm, A. Bernhoft. Organic selenium supplementation increased selenium concentrations in ewe and newborn lamb blood and in slaughter lamb meat compared to inorganic selenium supplementation, *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2008 50, 1-6.
 30. M.P. Lyons, T.T. Papazyan, P.F. Surai. Selenium in food chain and animal nutrition: Lessons from nature - Review, *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 2007, 20, 1135-1155.
 31. K. Bierla, J. Bianga, L. Ouerdane, J. Szpunar, A. Yiannikouris, R. Lobinski. A comparative study of the Se/S substitution in methionine and cysteine in Se-enriched yeast using an inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS)-assisted proteomics approach, *Journal of Proteomics*, 2013, 87, 26-39.
 32. Y.Y. Kim, D.C. Mahan. Biological aspects of selenium in farm animals, *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 2003, 16, 435-444.
 33. G.N. Schrauzer. Nutritional Selenium Supplements: Product Types, Quality, and Safety, *Journal of the American College of Nutrition*, 2001, 20, 1-4.
 34. L. V. Papp, J. Lu, A. Holmgren, K. K. Khanna. From Selenium to Selenoproteins: Synthesis, Identity, and Their Role in Human Health, *Antioxidants & Redox Signaling*, 2007, 9, 775-806.
 35. A.D. Dayan, A.J. Paine. Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: Review of the literature from 1985 to 2000, *Human and Experimental Toxicology*, 2001, 20, 439-451.
 36. M. Costa, C.B. Klein. Toxicity and carcinogenicity of chromium compounds in humans, *Critical Reviews in Toxicology*, 2006, 36, 155-163.
 37. A.M. Zayed. N. Terry. Chromium in the environment: Factors affecting biological remediation, *Plant Soil*, 2003, 249, 139-156.
 38. N.U. Benson, W.U. Anake, I.O. Olanrewaju. Analytical Relevance of Trace Metal Speciation in Environmental and Biophysicochemical Systems, *American Journal of Analytical Chemistry*, 2013, 04, 633-641.
 39. P. Castañé, M. Topalián, R. Cordero, A. Salibián. Influencia de la especiación de los metales pesados en medio acuático como determinante de su toxicidad, *Revista de Toxicología*, 2003, 20, 13-18.
 40. J.L. Gómez Ariza, E. Morales, D. Sánchez-Rodas, I. Giráldez. Stability of chemical species in environmental matrices. *TrAC Trends in Analytical*

- Chemistry*, 2000, 19, 200-209.
41. A. P. Dionísio, R. T. Gomes, M. Oetterer. Ionizing radiation effects on food vitamins. A review, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2009, 52, 1267-1278.
 42. I. Pizarro, M. Gómez, M. A. Palacios, C. Cámara. Evaluation of stability of arsenic species in rice, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003, 376, 102-109.
 43. Z. Lin, J. Wu, R. Xue, Y. Yang. Spectroscopic characterization of Au³⁺ biosorption by waste biomass of *Saccharomyces cerevisiae*, *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2005, 61, 761-765.
 44. M.J. Ruiz-Chancho, T. Pichler, R.E. Price. Arsenic occurrence and speciation in *Cyclope neritea*, a gastropod inhabiting the arsenic-rich marine shallow-water hydrothermal system off Milos Island, Greece, *Chemical Geology*, 2013, 348, 56-64.
 45. A.I.C. Ortiz, Y.M. Albarrán, C.C. Rica. Evaluation of different sample pretreatment and extraction procedures for mercury speciation in fish samples, *Journal Analytical Atomic Spectrometry*, 2002, 17, 1595-1601.
 46. H. Korbekandi, S. Mohseni, R. Mardani Jouneghani, M. Pourhossein, S. Irvani. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Saccharomyces cerevisiae*, *Artificial Cells, Nanomedicine, Biotechnology*, 2016, 44, 235-239 .
 47. M. Marcinkowska, D. Barańkiewicz. Multielemental speciation analysis by advanced hyphenated technique – HPLC/ICP-MS: A review, *Talanta*, 2016, 161, 177-204.
 48. J. Delafiori, G. Ring, A. Furey. Clinical applications of HPLC-ICP-MS element speciation: A review, *Talanta*, 2016, 153, 306-331.
 49. D. Pröfrock, A. Prange. Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) for quantitative analysis in environmental and life sciences: A review of challenges, solutions, and trends, *Applied Spectroscopy*, 2012, 66, 843-868.
 50. Z. Pedrero, Y. Madrid, C. Cámara. Selenium species bioaccessibility in enriched radish (*Raphanus sativus*): A potential dietary source of selenium, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54, 2412-2417.
 51. Z. Pedrero, D. Elvira, C. Cámara, Y. Madrid. Selenium transformation studies during Broccoli (*Brassica oleracea*) growing process by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (LC-ICP-MS), *Analytical Chimica Acta*, 2007, 596, 251-256.
 52. F. C. da Rosa, M.A.G. Nunes, F.A. Duarte, E.M.M. Flores, F.B. Hanzel, A.S. Vaz, D. Pozebon, V.L. Dressler. Arsenic speciation analysis in rice milk using LC-ICP-MS, *Food Chemistry*, 2019, 2, 100028.
 53. L. Moens, T. De Smaele, R. Dams, P. Den Van Broeck, P. Sandra. Sensitive, Simultaneous Determination of Organomercury, -lead, and -tin Compounds with Headspace Solid Phase Microextraction Capillary Gas Chromatography

- Combined with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 1997, 69, 1604-1611.
54. T. Lindemann, H. Hintelmann. Selenium speciation by HPLC with tandem mass spectrometric detection, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2002, 372, 486-490.
 55. K. Bierla, S. Godin, R. Lobinski, J. Szpunar. Advances in electrospray mass spectrometry for the selenium speciation: Focus on Se-rich yeast, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2018, 104, 87-94.
 56. M. Leermakers, W. Baeyens, M. De Gieter, B. Smedts, C. Meert, H.C. De Bisschop, R. Morabito, Ph. Quevauviller. Toxic arsenic compounds in environmental samples: Speciation and validation, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2006, 25, 1-10.
 57. F. Gosetti, P. Frascarolo, S. Polati, C. Medana, V. Gianotti, P. Palma, R. Aigotti, C. Baiocchi, M.C. Gennaro. Speciation of selenium in diet supplements by HPLC-MS/MS methods, *Food Chemistry*, 2007, 105, 1738-1747.
 58. R. Clough, C.F. Harrington, S.J. Hill, Y. Madrid, J.F. Tyson. Atomic Spectrometry Update: Review of advances in elemental speciation, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2018, 33, 1103-1149.
 59. G. Moreno-Martin, J. Sanz-Landaluze, M.E. León-Gonzalez, Y. Madrid. Insights into the accumulation and transformation of ChSeNPs by *Raphanus sativus* and *Brassica juncea*: Effect on essential elements uptake, *Science of Total environment.*, 2020, 725, 138453.

A.3. **Producción científica**

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS INCLUIDOS EN LA TESIS DOCTORAL

Moreno-Martín, G., Espada-Bernabé, E., León-González, M.E., Madrid, Y. Metabolic transformation of selenite and selenium nanoparticles by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* using HPLC/MS-based techniques. *Anal. Chim. Acta.* (enviado).

Moreno-Martín, G., Gómez-Gómez, B., León-González, M.E., Madrid, Y., 2022. Characterization of AgNPs and AuNPs in sewage sludge by single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Talanta* 238, 123033.

Moreno-Martín, G., Sanz-Landaluze, J., León-González, M.E., Madrid, Y., 2021. In vivo quantification of volatile organoselenium compounds released by bacteria exposed to selenium with HS-SPME-GC-MS. Effect of selenite and selenium nanoparticles. *Talanta* 224, 121907.

Moreno-Martín, G., Sanz-Landaluze, J., León-González, M.E., Madrid, Y., 2020. Insights into the accumulation and transformation of Ch-SeNPs by *Raphanus sativus* and *Brassica juncea*: Effect on essential elements uptake. *Sci. Total Environ.* 725, 138453.

Moreno-Martín, G., Sanz-Landaluze, J., León-González, M.E., Madrid, Y., 2019. In vivo solid phase microextraction for quantitative analysis of volatile organoselenium compounds in plants. *Anal. Chim. Acta.* 1081, 72-80.

Moreno-Martín, G., León-González, M.E., Madrid, Y., 2018. Simultaneous determination of the size and concentration of AgNPs in water samples by UV-vis spectrophotometry and chemometrics tools. *Talanta*. 188, 393-403.

Moreno-Martín, G., Pescuma, M., Pérez-Corona, T., Mozzi, F., Madrid, Y., 2017. Determination of size and mass- and number-based concentration of biogenic SeNPs synthesized by lactic acid bacteria by using a multimethod approach. *Anal. Chim. Acta.* 992, 34-41.

OTROS ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Crespo, L., Gaglio, R., Martínez, F.G., Moreno-Martín, G., Franciosi, E., Madrid-Albarrán, Y., Settanni, L., Mozzi, F., Pescuma, M., 2021. Bioaccumulation of selenium-by fruit origin lactic acid bacteria in tropical fermented fruit juices. LWT. 151, 112103.

Martínez, F.G., Moreno-Martín, G., Pescuma, M., Madrid-Albarrán, Y., Mozzi, F., 2020. Biotransformation of selenium by lactic acid bacteria: formation of seleno-nanoparticles and seleno-amino acids. Front, Bioeng. Biotechnol. 8, 506.

CAPÍTULO DE LIBRO

Moreno Martín, G., Madrid Albarrán, Y., 2021. Elementos traza: ¿qué es la especiación? in: Marina Alegre, M.L., Castro Puyana, M., Plaza del Moral, M. (Eds.), Estrategias avanzadas para la mejora de la calidad, la seguridad y la funcionalidad de los alimentos. Universidad Alcalá de Henares, Madrid, pp. 407-427.

CAPÍTULO DE ENCICLOPEDIA

Moreno-Martín, G., Sanz-Landaluze, J., Madrid, Y., 2017. Nanospeciation analysis using field flow fractionation, in: Meyers, R.A. (Ed.), Encyclopedia of Analytical Chemistry. John Wiley & Sons, Ltd., Sussex, pp. 1-24.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

Martínez, F.G., Moreno-Martín, G., Pescuma, M., Mozzi, F., Madrid-Albarrán, Y. Producción de selenocisteína y selenonanopartículas por bacterias lácticas aisladas de frutas. Tipo de comunicación: póster. V Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos. Buenos Aires, Argentina, septiembre de 2019.

Moreno-Martín, G., Palma-Lafuente, D., Sanz-Landaluze, J., León-González, M.E., Madrid, Y. Determinación y cuantificación *in vivo* de compuestos volátiles de selenio producidos por *Escherichia coli* tras su exposición a Cs-SeNPs. Tipo de comunicación: póster. XXII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica. Valladolid, España, julio de 2019.

Moreno-Martín, G., Martínez, F.G., Sanz-Landaluze, J., León-González, M.E., Madrid-Albarrán, Y. The impacts of Cs-SeNPs on *Raphanus sativus* and *Brassica juncea*. Biotransformation and effects on metabolism. Tipo de comunicación: oral. IX International

Congress on Analytical Nanoscience and Nanotechnology. Zaragoza, España, julio de 2019.

Moreno-Martín, G., Sanz-Landaluze, J., León-González, M.E, Madrid-Albarrán, Y. Semiquantification of volatile selenium species from radish (*Raphanus sativus*) exposed to chitosan-modified selenium nanoparticles by GC/MS and headspace solid-phase microextraction. Tipo de comunicación: oral. 40th International Conference on Environmental & Food Monitoring. Santiago de Compostela, España, junio de 2018.

Moreno-Martín, G., León-González, M.E., Madrid-Albarrán, Y. Spectroscopic multivariate kinetic analysis of size and concentration of silver nanoparticles. Application to water samples. Tipo de comunicación: póster. XXI Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica Valencia, España, septiembre de 2017.

Moreno-Martín, G., León-González, M.E., Madrid-Albarrán, Y. Partial least squares a chemometric tool to determine size and concentration of silver nanoparticles in environmental samples. Tipo de comunicación: oral. 9th Franco-Spanish Workshop on Bio-Inorganic Analytical Chemistry. Huelva, España, septiembre de 2017.

ESTANCIAS DE INVESTIGACIÓN

Estancia en la empresa *Advanced Isotopic Analysis* y en el grupo dirigido por David Amouroux del Instituto de Ciencias Analíticas y Química Física para el Medioambiente y los Materiales (IPREM) en Pau (Francia) para el desarrollo de técnicas analíticas para la caracterización de mercurio y selenio en muestras biológicas.

Aventurarse en el mundo de la nanotecnología, e intentar la caracterización inequívoca de las nanopartículas metálicas y de metaloides en muestras complejas supone un reto analítico difícil de afrontar. Si a esto además se le añade el tratar de conocer su comportamiento en el medioambiente, la situación comienza a complicarse aún más. Por eso, la Presente Tesis Doctoral ha abordado esta problemática de la mano de la Química Analítica. En concreto, la combinación de una plataforma multitécnica, el desarrollo de nuevos métodos analíticos, así como la adaptación de técnicas ya existentes, en combinación con las herramientas quimiométricas para el tratamiento de los datos se han convertido en las herramientas analíticas seleccionadas para obtener respuestas dentro de un mundo tan complejo como el de los nanomateriales y la nanotecnología.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DPTO. QUÍMICA ANALÍTICA