

Interacció de nanopartícules metàl·liques de plata amb enciams (*Lactuca Sativa*). Estudis amb cultius hidropònics.

Estudiant: Albert Salado Pratseballs

Grau en Química

Correu electrònic: salado.16@gmail.com

Tutor: Mònica Iglesias Juncà

Cotutor*:

Empresa / institució: Universitat de Girona,

Grup de Química Analítica i Ambiental, Departament de Química

Vistiplau tutor (i cotutor*):

Nom del tutor: Mònica Iglesias Juncà

Nom del cotutor*:

Empresa / institució: UdG, Facultat de Ciències

Correu(s) electrònic(s): monica.iglesias@udg.edu

*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació: 22 de Juliol de 2016

RESUM

Els darrers anys ha augmentat considerablement l'ús de nanomaterials manufacturats, això és degut al fet que les empreses han incrementat la demanda per a productes comercials pel consum humà. Això ha provocat que ens preguntem quines són les possibles conseqüències i/o impactes d'aquests nanomaterials en el medi ambient. Un d'aquests nanomaterials més utilitzats per les seves propietats òptiques i-elèctriques i les seves propietats antimicrobianes són les nanopartícules de plata.

Tot i que recentment s'estan fent molts estudis, hi ha poca informació de com aquestes nanopartícules de plata s'assimilen per les plantes o com són transportades i acumulades en el medi ambient. També, hi ha poca informació de quin és el possible impacte o el risc toxicològic que aquestes nanopartícules poden tenir.

L'objectiu principal d'aquest treball és dur a terme un estudi sobre la interacció de les nanopartícules de plata amb plantes, concretament enciams, i comprovar si és produeix una translocació de la plata des de les arrels cap a la part aèria de l'enciam. Per desenvolupar aquest objectiu s'han plantejat diferents estudis on es va quantificar la plata dels enciams mitjançant ICP-OES i va utilitzar la tècnica de ICP-MS en mode de partícula aïllada per tal de discriminar la plata en forma de nanopartícula d'altres formes de plata. Per fer les determinacions, es van realitzar cultius hidropònics d'enciams amb solució nutrient de Hoagland, i aquestes solucions es van fortificar amb nanopartícules de plata. Un cop cultivats, abans de les determinacions aquests enciams es van digerir amb dos tipus de digestions: una digestió completa amb forn microones i una digestió enzimàtica per tal de mantenir la integritat de la nanopartícula.

Els resultats obtinguts en aquest treball han permès confirmar que els enciams assimilaven i incorporaven la plata de les solucions nutritives mitjançant les arrels. A més, també s'ha pogut quantificar la plata mitjançant la digestió completa amb forn microones i la digestió enzimàtica. Per altra banda, també s'ha verificat que es produeix una translocació de la plata de les arrels cap a la part aèria dels enciams. Tot i que caldria fer més proves, sembla que les arrels assimilen millors les nanopartícules de mida més petita, però que les de mida més gran transloquen millor a les parts aèries. Per últim, s'ha pogut comprovar la presència de nanopartícules i discriminar-les de la plata lliure en diferents mostres d'arrels i part aèria de l'enciam.

RESUMEN

En los últimos años ha aumentado considerablemente el uso de nanomateriales manufacturados debido a que las empresas han incrementado la demanda para productos comerciales para el consumo humano. Esto ha provocado que nos preguntemos cuáles son las posibles consecuencias y/o impactos de estos nanomateriales en el medio ambiente. Uno de los nanomateriales más utilizados por sus propiedades ópticas y eléctricas y sus propiedades antimicrobianas son las nanopartículas de plata.

Aunque recientemente se están haciendo muchos estudios, hay muy poca información de cómo estas nanopartículas de plata se asimilan en plantas o como son transportadas y acumuladas en el medio ambiente. También, hay poca información de cuál es el posible impacto o el riesgo toxicológico que estas nanopartículas pueden tener.

El objetivo principal de este trabajo es llevar a cabo un estudio sobre la interacción de las nanopartículas de plata con plantas, concretamente lechugas, y comprobar si se produce una translocación de la plata desde las raíces hacia la parte aérea de la lechuga. Para desarrollar este objetivo se han planteado diferentes estudios donde se cuantificó la plata de las lechugas mediante ICP-OES y se utilizó la técnica ICP-MS en modo de partícula aislada para discriminar la plata en forma de nanopartícula de las diferentes formas de plata. Para hacer estas determinaciones, se realizaron cultivos hidropónicos de lechugas con solución nutritiva de Hoagland, y estas soluciones se fortificaron con nanopartículas de plata. Una vez cultivados, antes de las determinaciones estas lechugas se digirieron con dos tipos de digestiones: una digestión completa con horno microondas y una digestión enzimática para mantener la integridad de la nanopartícula.

Los resultados obtenidos en este trabajo han permitido confirmar que las lechugas asimilaban e incorporaban la plata de las soluciones nutritivas mediante las raíces. Además, también se ha podido cuantificar la plata mediante la digestión completa y la digestión enzimática. Por otra parte, también se ha verificado que se produce una translocación de la plata de las raíces hacia la parte aérea de las lechugas. Aunque habría que hacer más pruebas, parece que las raíces asimilan mejor las nanopartículas de tamaño más pequeño, pero que las de mayor tamaño translocan mejor en las partes aéreas. Por último, se ha podido comprobar la presencia de nanopartículas y discriminarlas de la plata libre en diferentes muestras de raíces y parte aérea de la lechuga.

ABSTRACT

In recent years, the use of manufactured nanoparticles has increased considerably, due to the fact that companies have increased the demand for commercial products for human consumption. This has led us to wonder what are the possible consequences and/or impacts of these nanoparticles on the environment. One of the most used nanoparticles for its optical properties and electrical as well as its antimicrobial properties are the silver nanoparticles.

Despite the many recent studies that have been carried out, there is very little information on how these silver nanoparticles are assimilated in plants or how they are transported and accumulate in the environment. In general, there is very little information on the possible impact or toxicological risk that these nanoparticles may pose.

The main purpose of this work is carry out a study on the interaction of the silver nanoparticles with the plants, specifically with lettuces (*Lactuca Sativa*), and ascertain if a translocation of the silver takes place from the roots to the aerial part of the lettuce. To achieve this objective, various studies have been proposed for quantifying the silver in the lettuces by means of ICP-OES and was used SP-ICP-MS for discriminating AgNPs of the different forms of silver. For this, hydroponic crops of lettuces were produced with a Hoagland nutrient solution, and these solutions were spiked with AgNPs. Once grown, before the determinations, these lettuces were digested using two types of digestion methods: complete digestion with a microwave and an enzymatic digestion in order to keep the integrity of the nanoparticle.

The results obtained in this work, it was able to be confirmed that the lettuces assimilate and incorporate the silver from the nutritive solutions through their roots. Furthermore, the silver could be quantified by complete digestion with a microwave and enzymatic digestion methods. On the other hand, it has also been verified that there is a silver translocation from the roots to the aerial part of the lettuce. Although more evidence it should be done, it seems that the roots better assimilate smaller nanoparticles, but the larger size translocate better to the aerial parts. Finally, it has been able check for the presence of nanoparticles and discriminate them from the free silver in different samples of roots and aerial part of the lettuce.

ÍNDEX

1-INTRODUCCIÓ	1
1.1- Les nanopartícules i la seva problemàtica ambiental.....	1
1.2- Interacció de nanopartícules amb el medi.....	3
1.3- Tècniques analítiques emprades per a la determinació de nanopartícules.....	3
2-OBJECTIUS	6
2.1- Objectives.....	6
3-METODOLOGIA	7
3.1- Reactius i materials.....	7
3.2- Aparells i instruments.....	7
3.3- Nanopartícules.....	8
3.4- Procediment experimental.....	8
3.4.1- Cultiu Hidropònic.....	8
3.4.2- Tractament de mostres.....	10
3.4.3- Determinació mitjançant ICP-MS i ICP-OES.....	11
4-RESULTATS I DISCUSSIÓ	12
4.1- Estudis d'assimilació i translocació de plata en enciams. Digestió completa amb forn microones.....	12
4.1.1- Efecte del tipus de recobriment.....	12
4.1.2- Efecte de la concentració de plata.....	14
4.1.3- Efecte de la mida de la nanopartícula.....	16
4.2- Estudis de caracterització de plata en enciams. Digestió enzimàtica.	17
4.2.1- Efecte del tipus de recobriment.....	18
4.2.2- Efecte de les concentracions.....	19
4.2.3- Aplicació de la tècnica SP-ICP-MS per a la identificació de nanopartícules de plata..	20
5- ÈTICA I SOSTENIBILITAT	26
5.1- Ètica i sostenibilitat.....	26
6-CONCLUSIONS	27
6.1- Conclusions.....	27
7-BIBLIOGRAFIA	28

1-INTRODUCCIÓ

1.1-Les nanopartícules i la seva problemàtica ambiental:

Els nanomaterials són definits com aquells materials que tenen, com a mínim, una de les seves dimensions per sota dels 100nm. Existeixen diferents tipus de nanomaterials, alguns exemples són els nanotubs de carboni, els nanocristalls semiconductors (també coneguts com a quantum dots) i les nanopartícules. Els nanomaterials d'interès per aquest treball són les nanopartícules manufacturades metàl·liques. S'entén per nanopartícula un tipus de nanomaterial que té totes les seves dimensions d'un interval d'entre 1 i 100nm.(1) Solen estar formades per metalls i/o òxids de metalls i són molt usats en productes comercials a causa de les seves propietats fisicoquímiques. D'aquestes propietats en destaca la seva elevada superfície de contacte. Una de les aplicacions principals d'aquestes nanopartícules és com a filtres solars a causa de la seva capacitat d'absorció de la llum UV.(2,3)

Aquests nanomaterials sempre han estat presents al medi ambient, però els darrers anys ha augmentat considerablement la seva presència a causa de l'augment de l'ús de nanopartícules metàl·liques, ja que les empreses han incrementat la demanda per a productes comercials pel consum humà.(4) Aquest fet ha provocat que les quantitats de nanomaterials que van a parar al medi ha augmentat també de manera important. Durant el 2004 es va calcular que la producció anual de nanopartícules manufacturades era de l'ordre de 10^3 tones, mentre que es va calcular que aquest valor havia incrementat entre 10^4 - 10^5 tones anuals després del 2010.(3) Tot seguit s'adjunta una taula 1, on es mostra quina és la producció anual de nanomaterials manufacturats:

Taula 1: Estimació a la baixa i a l'alça de quina és la producció anual de nanomaterials manufacturats en tones per any a Estats Units.(5)

Producte	Estimació a la baixa (Tpy)	Estimació a l'alça (Tpy)
nano-TiO ₂	7800	38000
nano-Ag	2,8	20
nano-CeO ₂	35	700
CNT	55	1101
fullarens	2	80

Així doncs, les dades indiquen que hi ha un gran increment en la producció de nanomaterials manufacturats. És per això que molts autors s'han plantejat quin és l'impacte d'aquests nanomaterials sobre la salut i el medi ambient.(4,6)

Les nanopartícules arriben al medi per diferents vies, ja sigui per emissions a l'atmosfera (incineració), però sobretot abocaments incontrolats a l'aigua o al sòl per part de les empreses o també degut a l'ús de productes en la vida quotidiana que contenen nanopartícules.(4) L'alliberació, l'exposició i l'acumulació de les nanopartícules al medi ambient és relativament senzilla. Per exemple, després de la utilització de productes cosmètics, els residus d'aquests es dissolen amb aigua per acabar en les aigües residuals. Independentment de quina sigui la font

d'emissió, les nanopartícules arriben per diferents vies a les aigües residuals i després a les depuradores. Allà es poden donar dues opcions: principalment poden quedar retingudes o adsorbides als fangs de la depuradora o mantenir-se dissoltes en les aigües que es tornen a abocar al medi ambient. Tot i que no existeixen dades rellevants de quin és el comportament de les nanopartícules en els medis aquàtics i terrestres.

Un cop dipositades en el medi, aquestes nanopartícules són exposades als diferents organismes vius. Hi ha estudis que s'han centrat més en el mecanisme pel qual aquestes nanopartícules poden ser assimilades. Alguns d'aquests estudis postulen que les nanopartícules poden entrar a les cèl·lules per difusió a través de les membranes cel·lulars així com per endocitosis.(2) Tot seguit s'adjunta la figura 1 on es descriu els possibles mecanismes de la toxicitat d'un nanomaterial en un bacteri:

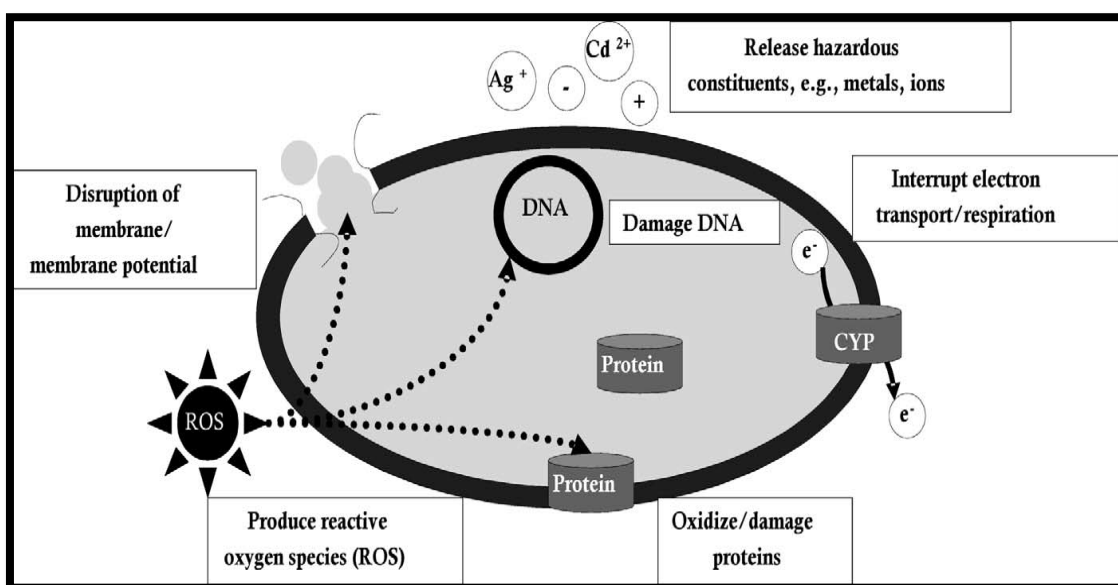


Figura 1: Possibles mecanismes de toxicitat dels nanomaterials en un bacteri.(2)

Molts d'aquests nanomaterials han estat dissenyats per interactuar amb proteïnes, àcids nucleics o membranes cel·lulars per diferents propòsits però sobretot com a medicaments. Això és un benefici quan s'utilitzen com a medicaments, però a partir d'aquí, quan aquestes nanopartícules o nanomaterials són al medi es pot donar una interacció no intencionada amb els éssers vius. Això pot causar un impacte al medi ambient que no està controlat i que pot tenir un efecte molt advers en la biota. (2) Tot i que hi ha estudis que demostren l'impacte que poden tenir aquests nanomaterials sobre plantes i animals encara manca molta informació sobre quins són els mecanismes de transport, assimilació, comportament i acumulació d'aquests.

Com s'ha dit anteriorment, hi ha diferents tipus de nanomaterials i nanopartícules. Per aquest treball de final de grau, les nanopartícules d'interès són les nanopartícules de plata (AgNPs). Aquestes són produïdes en grans quantitats per les seves propietats òptiques i elèctriques, que

fa que siguin utilitzades en diferents aparells electrònics, així com per les seves propietats com a antimicrobià, fungicida i antiviral.

1.2-Interacció de nanopartícules de plata amb el medi:

Hi ha manca d'informació sobre quin és el comportament de les nanopartícules de plata en el medi ambient. És necessari investigar més per respondre preguntes claus, ja que la interacció i efecte d'aquestes nanopartícules depèn de molts factors. Algunes d'aquestes preguntes són: quina és la concentració de nanopartícules en els diferents medis aquàtics, terrestres o aeris, com es poden caracteritzar de manera exacta i quines són les vies d'exposició de les nanopartícules, quins són exactament els mecanismes que permeten que les nanopartícules passin a través de membranes i parets cel·lulars i quines són les propietats i mecanismes que estan relacionats amb la toxicitat d'aquestes nanopartícules. (3)

Com s'ha dit anteriorment, és inevitable que totes aquestes nanopartícules quedin acumulades en el medi ambient, ja que cada vegada es fabriquen i s'utilitzen més. Però és molt difícil conèixer quina és la concentració exacta d'aquestes nanopartícules en els diferents entorns. Aquestes tendeixen a agregar-se i depenent de la seva mida i recobriment queden més o menys retingudes en un medi o un altre.(7)

Tot i que hi ha manca d'informació per tal d'entendre els mecanismes d'interacció i assimilació d'aquestes nanopartícules de plata amb la biota, s'han fet diferents estudis amb plantes per tal d'intentar conèixer quins són aquests mecanismes. Hi ha estudis d'exposició foliar d'enciams amb AgNPs on es donen les primeres dades sobre la localització i l'especiació. Els resultats d'aquest estudi mostren que les nanopartícules tenen la capacitat de traspasar l'epidermis i arribar als teixits i proposa alguns camins que aquestes poden fer servir. (8) També hi ha un estudi on s'ha fet cultius amb blat de moro i col amb presència de AgNPs. Aquest estudi revela diferents canvis en la morfologia de les plantes amb la presència d'aquestes nanopartícules. (9) S'han trobat un estudi on s'introdueixen les AgNPs en la germinació. Aquest estudi s'ha fet amb arròs i revela uns efectes fitotòxics sobre les plantes d'arròs. A més, determinen que l'efecte d'aquestes nanopartícules depèn de la mida i la concentració de les AgNPs.(10)

1.3-Tècniques analítiques emprades per a la determinació de nanopartícules:

Les nanopartícules han estat caracteritzades i quantificades fins ara per múltiples tècniques analítiques, però en l'anàlisi de mostres ambientals encara requereix el desenvolupament i la millora dels mètodes. A l'hora de determinar nanopartícules, els investigadors tenen dificultats de trobar un mètode capaç de detectar concentracions de l'ordre dels ppb i sense que aquest es vegi alterat per les interferències de la matriu especialment en sòls. (6)

Les etapes de mostreig i tractament de mostra per a la determinació de nanopartícules són molt complexes, ja que les matrius solen ser molt complicades i diverses. Són etapes clau per dur a terme la determinació correcta de les nanopartícules. Els processos de sonicació i la centrifugació són dels més utilitzats en el tractament de la mostra. Aquests permeten l'homogeneïtzació de la solució i la separació dels sòlids.

Per a la caracterització de la morfologia de les nanopartícules les tècniques més utilitzades són: la microscòpia electrònica de transmissió (TEM), la microscòpia de forces atòmiques

(AFM) i la microscòpia electrònica de rastreig (SEM), aquesta darrera juntament amb l'espectroscòpia de raig X per dispersió d'energies (EDS). Aquestes tècniques permeten identificar i obtenir informació sobre la mida, la forma i l'estructura de les nanopartícules. Per altra banda, les dades de EDS permeten obtenir informació sobre la composició química d'aquestes partícules. (11)

Les tècniques analítiques més recomanades per la quantificació de nanopartícules metàl·liques són l'espectroscòpia de masses amb font de plasma induït per alta freqüència (ICP-MS) i espectroscòpia d'emissió atòmica amb plasma induït per alta freqüència (ICP-OES). Són tècniques de determinació elemental i els avantatges d'aquestes tècniques és que presenten límits de detecció baixos i realitzen anàlisis multi elementals en temps relativament curts. (12,13)

Una aplicació de la tècnica del ICP-MS que s'usa per a la caracterització de nanopartícules i la seva discriminació respecte als components en solució és l'ICP-MS en mode de partícula aïllada (SP-ICP-MS). (12-14) Aquesta aplicació és més complexa, i per entendre-la cal detallar com es produeix l'arribada de les nanopartícules al detector. En un ICP-MS, un cop es vaporitza, s'atomitza i s'ionitza la mostra, aquesta arriba a l'espectròmetre de masses on els ions generats són separats segons la seva relació massa/càrrega. Si el metall està en solució, el senyal que es detecta és constant i estable perquè en tot moment està entrant metall a l'instrument i arribant al detector (Figura 2, gràfic B). Per contra, si el metall està en forma de nanopartícula, i el temps d'integració és suficientment petit, no obtenim un senyal constant (Figura 2, gràfic C). El motiu d'això és que si es donen les condicions d'anàlisi necessàries (la solució ha d'estar suficientment diluïda, ja que així ens assegurem que entra com a màxim una nanopartícula en cada temps d'integració) el detector només detecta metall en el moment que les nanopartícules entren, però en molts moments no detecta res i per tant, el senyal no és constant. Això es veu clarament en la representació del senyal amb el temps o en els histogrames (freqüència de senyal respecte al senyal) que són els gràfics característics per aquest tipus de mètode. Quan la solució és homogènia el senyal és constant i només s'observa un pic a l'histograma (Figura 2, gràfic E). Per contra, quan hi ha nanopartícules es veu que hi ha diversos pics (Figura 2, gràfic F): un pic a zero (o molt pocs contes) a causa dels registres en què no hi ha nanopartícules (o a uns pocs contes si hi ha plata en solució) i un pic més ample a causa de les nanopartícules, i sovint un tercer pic a causa de la presència de dues nanopartícules durant el mateix temps d'integració anomenats dobles events. En aquesta figura X també s'adjunta el gràfic A i D que correspon a una solució d'aigua ultrapura, on es pot veure que gairebé no hi ha cap senyal:

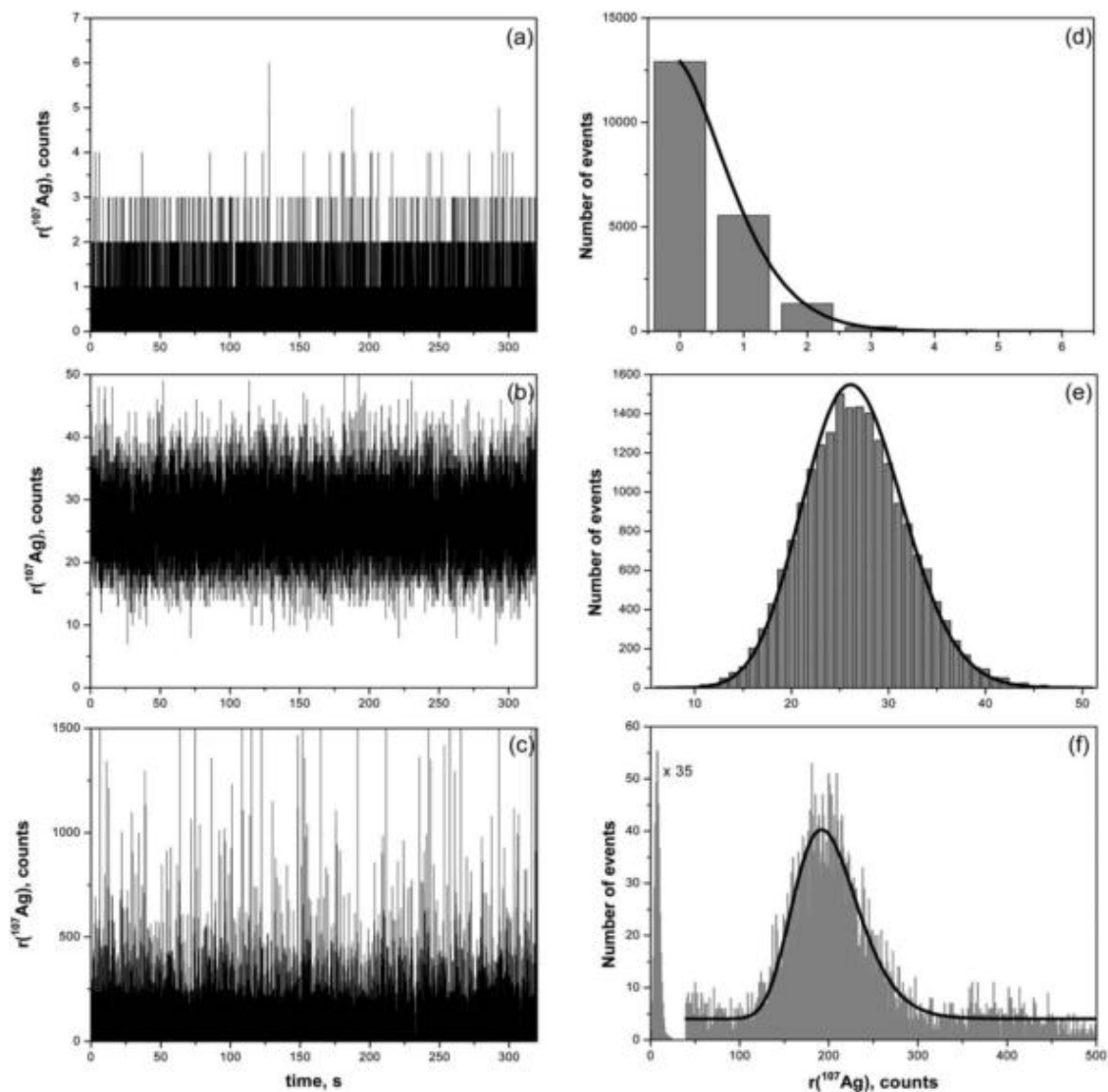


Figura 2: Senyal en funció del temps d'una solució d'aigua ultrapura, una solució de plata de 300ng/L i una suspensió de nanopartícules de plata de 113nm amb una concentració de 800ng/L (A,B,C) i els histogrames respectius (D,E,F).(13)

Algunes tècniques de separació permeten conèixer quin és el contingut elemental per a cada mida de partícula, discriminant el metall en forma soluble, quan s'acoblen a tècniques espectroscòpiques com les de ICP comentades abans. Les més usuals per separar les nanopartícules són el Field-Flow Fractionation (FFF), la cromatografia per exclusió de mida (SEC) o l'electroforesi capil·lar.(6)

2-OBJECTIUS

2.1- Objectives:

The recent impact that silver nanoparticles have in the environment is due to their great range of applications. Furthermore, there is a lack of studies on the mobility and biodisponibility of these nanoparticles in the environment. Thus the main objective of this final degree project has been to investigate the interaction of silver nanoparticles with plants and their possible translocation inside the plant. Specifically, in this work we cultivated lettuces (*Lactuca sativa*) in hydroponic solution.

To develop this goal, we should adapt already known techniques to quantify and characterize the silver nanoparticles. Concretely in this study, the aim is to determine and to quantify by ICP-OES the total silver content in lettuces (roots and aerial part) after hydroponic cultivation for 9 days with silver nanoparticles spiked solutions. The silver nanoparticles behavior should also be compare with that ionic silver solution. A further aim is to ascertain if enzymatic digestion allows maintaining the integrity of the nanoparticle form and to characterize it by SP-ICP-MS.

And lastly, the aim has also been to learn the basic techniques and skills of an analytical chemical laboratory. And furthermore it reinforces the fundamentals and learning of the applications of instruments such as ICP-OES and ICP-MS.

3-METODOLOGIA

3.1- Reactius i materials:

- HNO₃ Hiperpur 69%, Panreac (Canadà)
- H₂O₂ 30%, Sigma-Aldrich (USA)
- Silver Standard Solution (AgNO₃ en HNO₃), Merck (Alemanya), 1000 mg/L
- H₂O MilliQ Plus column (Millipore)
- Flascó Poliestirè, Deltalab (Barcelona), 30 mL
- Flascó polipropilè, Deltalab (Barcelona), 100 mL
- Flascó Polietilè, Deltalab (Barcelona), 150 mL
- Flascó Polietilè, Deltalab (Barcelona), 200 mL
- Filtre acetat de cel·lulosa, Filterlab (Barcelona), 0'45 µm
- Filtre acetat de cel·lulosa, Filterlab (Barcelona), 1 µm
- Xeringa ús únic Polietilè, Terumo (Bèlgica), 5 mL
- Xeringa ús únic Polietilè, Terumo (Bèlgica), 10 mL
- Pipeta Pasteur Polietilè, Rubilabor (Mèxic), 3 mL
- Micropipeta BioPettePlus, Labnet (Polònia), 1mL
- Micropipeta BioPettePlus, Labnet (Polònia), 100-1000µl
- Micropipeta BioPettePlus, Labnet (Polònia), 20-200µl
- Sulfat de zinc monohidratat, Panreac (Canadà)
- Triòxid de molibdè, Panreac, (Canadà)
- Nitrat de calci tetrahidratat, Panreac, (Canadà)
- Sulfat d'amoni fèrric dodecahidrat, Panreac, (Canadà)
- Clorur de manganès tetrahidratat, Panreac, (Canadà)
- Nitrat de potassi, Merck, (Alemanya)
- Sulfat de coure pentahidratat, Panreac, (Canadà)
- Àcid bòric, Merck, (Alemanya)
- Sulfat de magnesi, Sigma-Aldrich, (USA)
- Hidrogenfosfat amònic, Sigma-Aldrich, (USA)
- Àcid cítric anhidre, Panreac, (Canadà)
- Enzim Macerozyme R-10 from Rhizopus sp, Serva Electrophoresis GmbH, (Alemanya)

3.2- Aparells i instruments:

- ICP-OES System, Agilent 5100 Vertical Dual View, Agilent Technologies, (Japan)
- ICP-MS Agilent 7500c, Agilent Technologies, (Japan)
- Balança analítica, SI-234 Denver Instruments, (USA)
- Balança analítica, Mettler Toledo AX205 (Barcelona)
- Balança analítica, Cobos Presicion ATX224 (Barcelona)
- Ultrasons, P Selecta (Barcelona)
- Centrífuga, Hettich Rotofix 32A (Alemanya)
- Sistema digestiu microones, ETHOS PLUS Milestone, (Italy)
- Sistema digestiu microones, Speedwave xpert, Berghof (Alemanya)
- Agitador incubador, Multitron Standard, Infors HT (Suïza)

3.3-Nanopartícules:

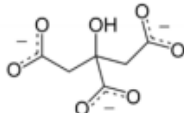
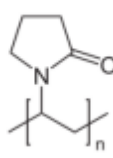
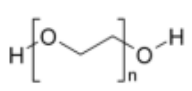
Les nanopartícules que es van emprar en l'estudi eren de plata i tenien diferents recobriments i diferents mides. Tot seguit s'adjunta la taula 2 on hi ha el llistat, la mida, la concentració i l'empresa que distribueix les nanopartícules emprades:

Taula 2: Llistat de nanopartícules.

Recobrint	Mida (nm)	Empresa distribuïdora	Concentració (mg Ag/ml)
Citrat	100	Sigma-Aldrich (USA)	0,020
PEG	100	NanoComposix (USA)	0,023
PVP	100	NanoComposix (USA)	0,020
PVP	75	NanoComposix (USA)	5,51

A continuació s'adjunta la taula 3 amb les característiques de la superfície de les nanopartícules que han estat consultades a la web de l'empresa que les distribueix. (19)

Taula 3: Característiques de les diferents AgNPs.

Tipus AgNP	Superfície/Solvent	Estructura	Càrrega de la superfície
Citrat de 100nm	Citrat/2nM Citrat		Molt negativa
PVP de 75 i 100nm	Polivinilpirrolidona(PVP)/ 2nM Citrat		Negativa
PEG 100nm	Polietilenglicol (PEG)/H2O		Neutre

3.4-Procediment experimental:

Per dur a terme l'estudi de la interacció de les nanopartícules de plata amb plantes es van proposar diferents experiments utilitzant un cultiu d'enciams (LACTUCA SATIVA) amb medi hidropònic el qual va ser fortificat amb diferents nanopartícules de plata així com també amb plata iònica. Es va plantejar un estudi amb un nombre de mostres variable en funció de l'objectiu de cada estudi.

3.4.1- *Cultiu hidropònic:*

Es va observar que la majoria d'experiments de la literatura utilitzaven la solució nutritiva de Hoagland com a medi hidropònic. (15-18). És per això que es va seleccionar aquest medi cultiu per aquests experiments.(20)

La solució de Hoagland que es va utilitzar en el cultiu hidropònic es fortificava amb les nanopartícules de plata o la plata iònica fins a concentracions de 1, 5 i 10 mg.Kg⁻¹ en funció de

l'objectiu de l'experiment. Per una banda, la preparació de la solució de plata iònica es feia diluint el patró amb aigua milli-Q. Per altra banda, la preparació de la solució de nanopartícules requeria un procediment més llarg i rutinari per tal d'obtenir una bona homogeneïtzació. Abans de diluir el patró calia fer un procés de sonicació de 5 minuts i llavors calia agitar vigorosament 1 minut més. Aquest procediment es va extreure dels estudis que es van fer anteriorment en el grup per tal d'obtenir una bona homogeneïtzació.



Figura 3: preparació de les mostres amb les rodets de poliestirè expandit.

subjecte (Figura 3). Cada mostra era composta pel volum calculat de la solució fortificant (de nanopartícules o de plata iònica) i s'afegia fins a 100g la solució de Hoagland per pesada. Finalment cada flascó es va recobrir amb una capa de paper d'alumini per tal que la llum no afectes a la solució de nanopartícules. Tot seguit a la figura 4 s'adjunta un esquema de com va quedar cada mostra:

Les mostres es van distribuir aleatòriament sota llum artificial. Es va preparar una distribució simètrica en forma de files, on la llum era equivalent a qualsevol de les posicions on hi havia mostra. Tot seguit a la figura 5 s'adjunta una imatge d'una de les distribucions realitzades:



Figura 5: Distribució dels cultius hidropònics.

Els enciams que es compraven en un viver el mateix dia d'inici de l'experiment, es van col·locar dins un flascó de poliestirè de 100ml, però abans de col·locar-los al flascó es van rentar amb cura per tal de què no hi hagués cap resta de sòl. L'enciam era subjectat per unes rodetes de poliestirè expandit. Aquestes rodetes tenien un petit orifici al centre per on passava l'arrel de l'enciam i aquest quedava

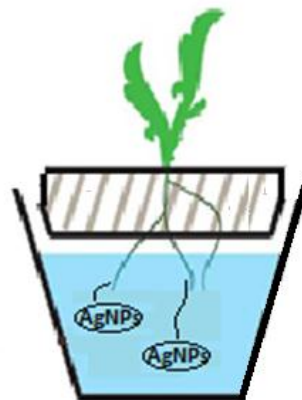


Figura 4: Esquema de una mostra.

El cultiu d'aquests enciams amb la solució de Hoagland amb nanopartícules de plata o plata iònica tenia una durada de 9 dies. Durant aquests 9 dies les condicions eren de 16h de llum i 8h de fosc. Els enciams tenien la presència de llum artificial des de les 6 del matí fins a les 10 de la nit. Les condicions de temperatura del cultiu era de $21 \pm 2^\circ\text{C}$. Durant els 9 dies no es va canviar la solució de Hoagland. Es va considerar que no era necessari canviar-la, ja que durant el cultiu es van realitzar diferents controls i es va veure que els enciams consumien molt poca solució de Hoagland

i es mantenien en bones condicions.

3.4.2- Tractament de les mostres:

Un cop fet el cultiu dels enciams, es va procedir a digerir-los. Per aquest estudi es van portar a terme dos tipus de digestions: la digestió completa de la mostra realitzada amb microones i una digestió enzimàtica per tal de mantenir la integritat de les nanopartícules. Aquestes digestions tenen procediments diferents. Tot seguit s'expliquen aquests procediments:

+Digestió completa mitjançant forn microones:

Abans de posar els enciams al digestor, es van separar arrels de fulles fent un tall amb un



Figura 6: Representació de com es separa arrels i fulles.

bisturí tal com es mostra a la figura 6. Un cop separades, aquestes es van assecat durant 24h a 60°. Per comprovar que s'havien assecat totes les mostres, es van fer dues pesades amb mitja hora de diferència. Si el valor el pes resultava constant, es portava la mostra al digestor, ja que volia dir que havia perdut la humitat. Aquestes dades de pes es van anotar per fer càlculs posteriors. Un cop al digestor, les mostres (les arrels i la part aèria per separat) es van triturar amb una vareta de vidre perquè tota la mostra fos coberta pels reactius. Per aquesta digestió, es van afegir 9mL d'àcid nítric suprapur i 1mL de

peròxid d'hidrogen. El programa de digestió va ser de 5 minuts d'escalfar fins a una temperatura a 180°C, mantenir els 180°C durant 10 minuts més i finalment 20 minuts de venteig per baixar la temperatura. Posteriorment, es va extreure la solució del digestor i es va diluir convenientment en un envàs tarat i es determinava el pes total de la solució. Finalment, es mantenia refrigerat i s'analitzava mitjançant ICP-OES en un màxim de 24 hores després de la digestió. Aquestes condicions i el procediment de la digestió es va extreure d'un mètode estàndard de la US Environmental Protection Agency (EPA).(17,18)

+Digestió Enzimàtica:



Figura 7: Mostres agitant al agitador-incubador.

Per la digestió enzimàtica també va ser necessari separar arrels i fulles. En aquest cas, un cop separades s'havia de procedir a rentar-les 3 vegades amb aigua milli-Q. Llavors aquestes mostres es van tallar en talls petits. Tot seguit, es va afegir 8 mL d'un tampó d'àcid cítric 2mMolar que havia de tenir un pH entre 3,5-7. Per últim es va afegir 2mL del Maceroenzim R-10. Aquesta barreja havia d'estar en agitació en l'agitador-incubador durant 24h a 37°C. A la figura 7 es pot veure com les mostres estaven realitzant el procés

d'agitació en l'agitador-incubador. Passat aquest temps, es va deixar reposar 1h i posteriorment es centrifugava a 1000rpm durant 7min. Llavors, es va filtrar el sobrenedant. Per fer-ho, primer es van utilitzar filtres d'un sol ús d'acetat de cel·lulosa de 1µm i posteriorment amb filtres d'acetat de cel·lulosa de 0,45 µm. Finalment, aquest sobrenedant es va analitzar el mateix dia per ICP-OES per tal de quantificar el contingut total de plata i després de la corresponen dilució es va fer la determinació per SP-ICP-MS per tal de comprovar si la plata estava en forma iònica o en forma de nanopartícula. Aquestes condicions i procediments van ser extretes i adaptades de la bibliografia d'un experiment on l'objectiu era detectar nanopartícules d'or en mostres de tomàquet. (16)

3.1.3- Determinació mitjançant ICP-OES i ICP-MS:

Com ja s'ha comentat, un cop digerits els enciams aquests eren analitzats als instruments. Per tal de quantificar la plata total que s'havia extret dels enciams es va utilitzar l'ICP-OES dels serveis tècnics de recerca. A continuació en la taula 4 s'adjunten les condicions de treball del ICP-OES:

Taula 4: Condicions del ICP-OES.

ICP-OES Agilent 5100	
Potència (W)	1.200
λ (longitud d'ona)	328,068 i 338,289
Temps de lectura (s)	1
Velocitat bomba (rpm)	12
Flux plasma (L/min)	12
Temps estabilització (s)	20
Visió	Axial
Replicats per mesura	3
Nebulitzador	Concèntric
Cambrà	Ciclònica de doble pas

Per tal de discriminar les nanopartícules de plata de la plata iònica es va utilitzar la tècnica del SP-ICP-MS. Aquesta tècnica requeria l'ús del ICP-MS dels serveis tècnics de recerca. Tot seguit s'adjunta la taula 5 amb les condicions de treball del ICP-MS en mode de partícula aïllada:

Taula 5: Condicions pel ICP-MS.

ICP-MS Agilent 7500 c	
Potència (V)	1550
Massa mesurada	107 i 109
Temps d'adquisició de mesura (ms)	10
Temps de lectura (s)	60
Temps estabilització (s)	20
Velocitat bomba (rpm)	12
Flux de plasma (L/min)	15
Nebulitzador	Babington
Cambrà	Scott doble pas

4-RESULTATS I DISCUSIONS

Per tal d'avaluar l'assimilació de nanopartícules de plata amb plantes, concretament enciams amb cultius hidropònics, es van fer experiments amb diferents objectius. Com s'ha dit anteriorment les mostres van ser tractades de dues maneres: la digestió completa amb microones i la digestió enzimàtica. A continuació es detallaran els resultats i discussions dels diferents tractaments:

4.1- Estudis d'assimilació i translocació de plata en enciams. Digestió completa amb forn microones:

L'objectiu principal d'aquests primers experiments va ser confirmar si l'enciam assimilava la plata de la solució hidropònica i si aquesta es quedava a l'arrel o translocava a la part aèria. Un altre objectiu era veure si hi havia diferències entre les nanopartícules amb diferent recobriment i també amb la plata iònica. Com ja s'ha comentat per assolir tots aquests objectius es realitzava una digestió completa que es duia a terme amb forn microones. Tot seguit es detallen tots els estudis que s'han realitzat amb la digestió completa amb microones:

4.1.1-Efecte del tipus de recobriment:

L'estudi va comptar amb un total de 32 cultius individuals. Aquests cultius de 100 mL de solució hidropònica de Hoagland es van fortificar amb solucions de AgNPs de 100nm amb recobriment de PEG, PVP i CIT amb una concentració de $1\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$. A més, també es van fortificar solucions amb plata iònica a la mateixa concentració. D'aquests 32 cultius individuals, hi havien 7 replicats per cada tipus de recobriment i per la plata iònica.

A més, per tal de comprovar la viabilitat de l'experiment i possibles contaminacions amb agents desconeguts es van preparar diferents tipus de controls: el primer tipus de control va consistir a fortificar les mostres amb les solucions però no s'hi van afegir plantes. S'exposaven les solucions fortificants durant els 9 dies en les mateixes condicions que les mostres amb plantes; de manera que els 7 replicats de cada recobriment, 2 eren sense planta. Pel que fa a el segon tipus de control va consistir a fer el cultiu de la planta sense fortificar amb nanopartícules o plata iònica. Es a dir, es van fer 4 replicats on es situava la planta en un flascó amb solució de Hoagland sense plata.

Un cop fet el cultiu durant 9 dies, la mostra es digerida seguint el procediment i s'analitzava convenientment. Es van recollir les dades i es van tractar. Tot seguit s'adjunten els gràfics de la concentració en pes de plata en l'arrel i en la part aèria de l'enciam. Per tal d'obtenir aquesta dada es va fer el càlcul del pes de plata a partir dels resultats obtinguts en la determinació del contingut de plata en la solució de digestió mitjançant la tècnica de quantificació amb ICP-OES. Aquestes dades es dividien pel pes obtingut de l'arrel o part aèria de l'enciam abans de ser digerit.

Cal comentar els resultats dels controls. El primer tipus de control pel qual es fortificava la solució de Hoagland però no s'afegia la planta, en general s'han obtingut concentracions de plata més elevades que la resta de replicats, tot i que no s'arriba a la concentració inicial. Cal pensar que al no haver-hi planta, la plata no era absorbida però quedava en part retinguda al flascó de poliestirè. Pel que fa a el segon tipus de control, pel qual es cultivava la planta sense

fortificar la solució, hem obtingut concentracions de plata per sota el límit de detecció de la tècnica, per tant, es pot descartar que hi hagi qualsevol tipus de contaminació per part d'un agent desconegut.

S'adjunta la figura 8, on es mostra el gràfic de la concentració en pes de plata a l'arrel pels diferents recobriments i la plata iònica:

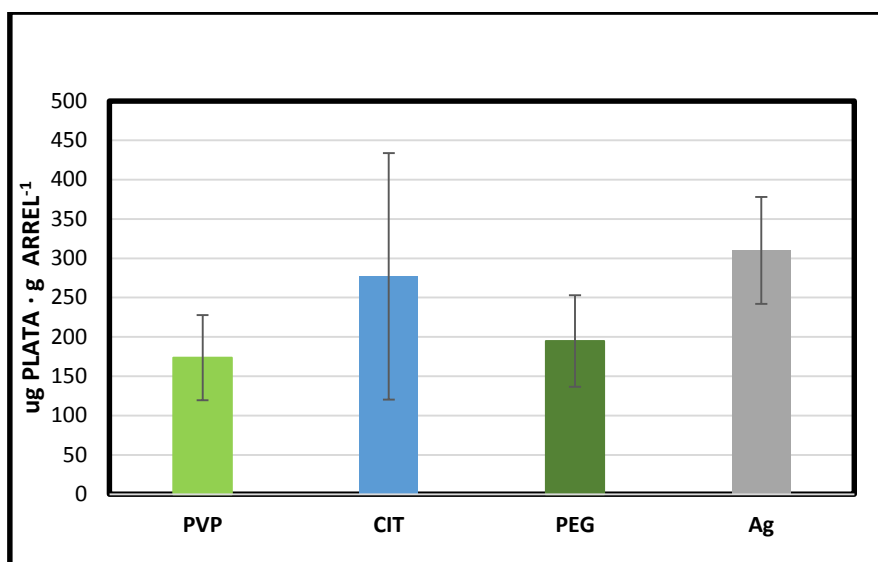


Figura 8: Concentració de Ag a l'arrel després de 9 dies de cultiu amb AgNPs de diferent recobriments i plata iònica. [Ag]=1mg·Kg⁻¹. n=5

A continuació, s'adjunta la figura 9, on es mostra el gràfic de la concentració en µg de plata per la part aèria de l'enciam per les nanopartícules amb diferents recobriments i la plata iònica:

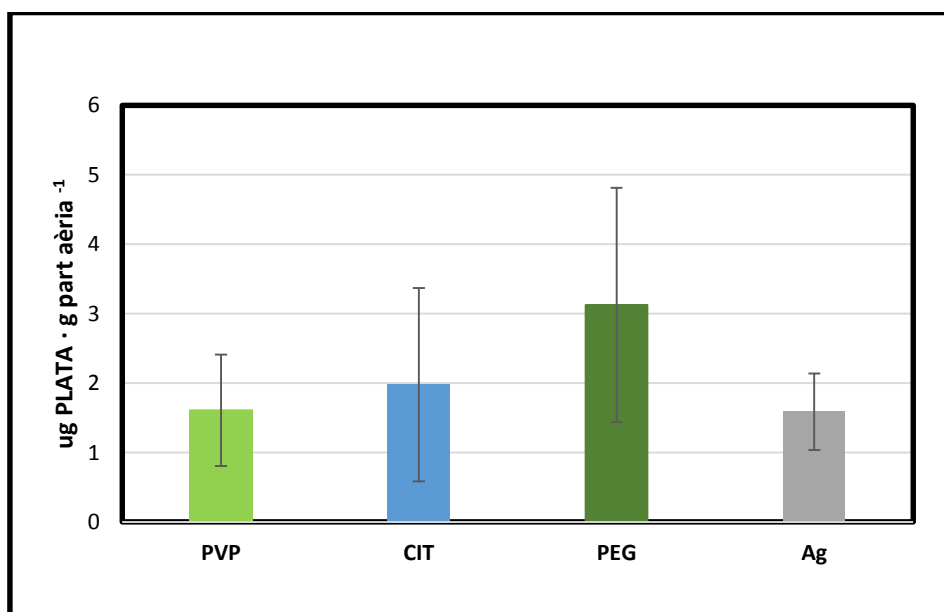


Figura 9: Concentració de Ag a la part aèria després de 9 dies de cultiu amb AgNPs de diferent recobriments i plata iònica. [Ag]=1mg·Kg⁻¹. n=5

Es pot veure en els gràfics que les concentracions a l'arrel són aproximadament 100 vegades superiors a les que trobem a la fulla. A més, també es pot verificar que hi ha translocació de plata a la part aèria de l'enciam.

Pel que fa a l'efecte del recobriment, no es pot afirmar que hi hagi diferències significatives entre els diferents tipus de recobriments de AgNPs i per arrels ni part aèria de l'enciam. Per verificar estadísticament si hi ha diferències significatives o no s'ha realitzat un test estadístic anomenat test ANOVA. El test diu que perquè hi hagi diferències significatives el valor de p ha de ser més petit de 0,05. En aquest cas el valor és més gran, per tant, es confirma que no hi ha diferències significatives. Sembla que la plata iònica és la que dona una concentració més elevada a l'arrel i en canvi és la que dona una concentració lleugerament inferior a la part aèria. Encara que les diferències no siguin significatives, això podria indicar que les arrels retenen més la plata iònica que les nanopartícules, però en canvi, els hi costa més translocar la plata iònica cap a la part aèria que les nanopartícules. Per tant, semblaria que les nanopartícules són capaces de translocar amb més facilitat. Caldria però fer més experiments per confirmar aquest fet.

Per últim, es pot veure que les desviacions estàndard són grans. La causa d'aquestes desviacions estàndards elevades pot ser deguda a la dificultat de reproduir les mateixes condicions per a cada cultiu individual. L'estudi amb mostres vegetals comporta unes matrius molt diverses i complexes i alhora cal controlar molts factors que poden influir en la reproductibilitat dels resultats.

4.1.2-Efecte de la concentració de plata:

En els experiments anteriors es va veure que la quantitat de plata que arribava a la fulla era molt petita. Per tant, es va decidir fer un estudi de diferents concentracions de plata per tal de comprovar si la translocació a la part aèria augmentava al augmentar la concentració de la solució nutritiva de Hoagland..

Aquest estudi va comptar amb 35 cultius individuals. Aquest cop la solució de Hoagland dels cultius individuals es va fortificar amb concentracions d'1, 5 i 10 mg·Kg⁻¹. En aquest cas el recobriment de les nanopartícules seleccionat, va ser de PVP de 75nm, ja que és l'estoc més abundant que disposa el grup. Es van fer 7 replicats per a cada concentració. A més, com a l'estudi anterior també es va fer la comparativa amb la plata iònica. Aquestes solucions de plata iònica es van fortificar amb les mateixes concentracions d'1, 5 i 10 mg·Kg⁻¹. Es van fer 5 replicat de concentració 1 mg·Kg⁻¹ i 3 replicats de concentració 5 i 10 mg·Kg⁻¹.

En aquest estudi també es van fer dos tipus de blanc. Pel primer tipus, es van fer dos blancs amb la solució fortificada i sense planta. Aquests es van fer per la concentració de 5 mg·Kg⁻¹ pel cas de les nanopartícules i la plata iònica. Pel segon tipus, es va fer un sol replicat en el qual no es va fortificar la solució i si es va cultivar la planta.

Cal comentar els controls: Pel que fa a el primer tipus de blanc en el qual es fortifica la solució però no es cultiva la planta es repeteix el resultat. Obtenim valors més elevats que la resta de replicats, tot i que no s'arriba a la concentració inicial. Pel que fa al segon tipus, el que no

fortifiquem la solució i cultivem la planta, hem obtingut valors per sota al límit de detecció, per tant es descarta qualsevol tipus de contaminació per part d'agents desconeguts.

Un cop fet el cultiu durant 9 dies, la mostra es digerida seguint el procediment i s'analitzava convenientment. Es van recollir les dades i es van tractar. A continuació s'adjunta la figura 10 on es mostra el gràfic de la concentració en pes de plata en l'arrel per les diferents concentracions de nanopartícules i plata iònica:

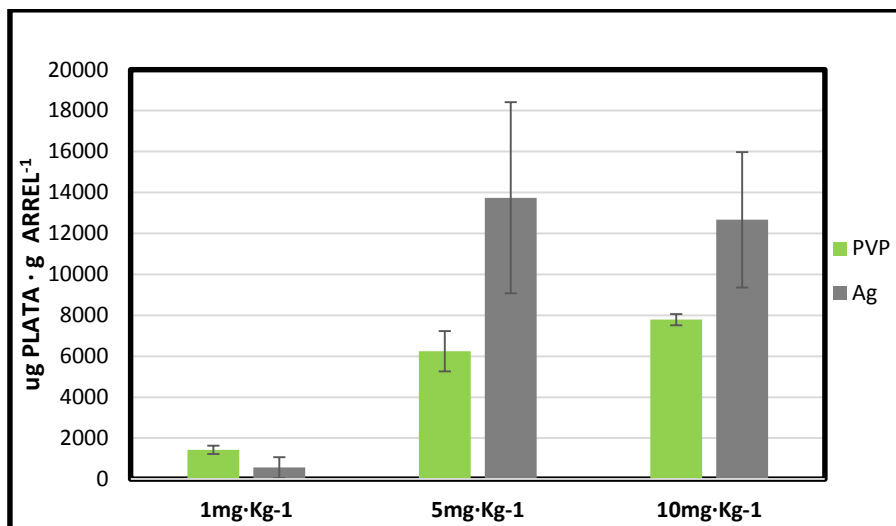


Figura X: Concentració de Ag a l'arrel després de 9 dies de cultiu per les diferents concentracions de nanopartícules de 75nm i recobriment de PVP i per la Ag iònica. $n(\text{PVP})=5$; $n(\text{Ag})=3$ (excepte 1mg·Kg⁻¹ on $n=5$).

Tot seguit, s'adjunta la figura 11, on es mostra el gràfic de la concentració en pes de plata en la part aèria per les diferents concentracions de nanopartícules i plata iònica:

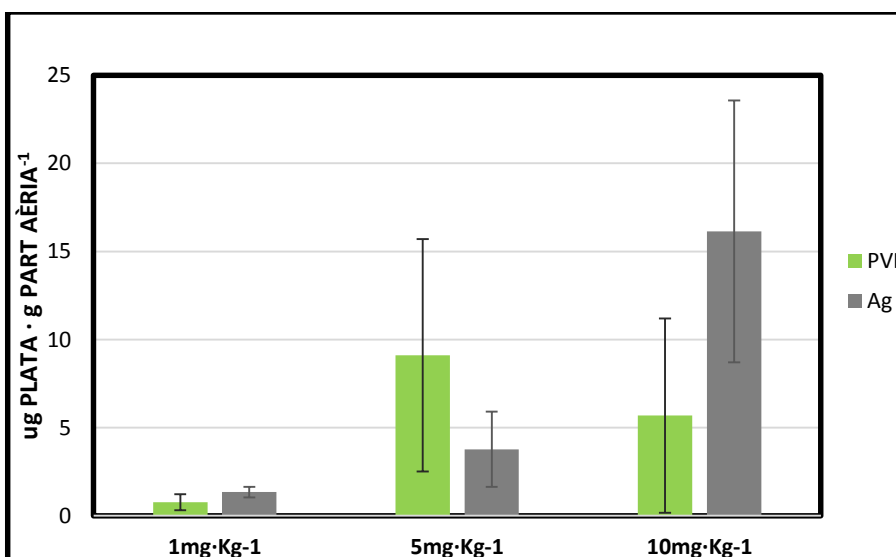


Figura 11: Concentració de Ag a la part aèria després de 9 dies de cultiu per les diferents concentracions de nanopartícules de 75nm i recobriment de PVP i per la Ag iònica. $n(\text{PVP})=5$; $n(\text{Ag})=3$ (excepte 1mg·Kg⁻¹ on $n=5$).

Com en l'estudi anterior, s'observa de nou clarament una concentració de plata és molt més elevada a les arrels. A més, pel cas de les arrels en augmentar la concentració de plata en la solució de cultiu la concentració a l'arrel augmenta.

Pel cas de les arrels podem veure que hi ha diferències significatives (valor de p més petit que 0,05) entre la plata iònica i les nanopartícules. Es pot veure que a $1 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ la concentració en pes de nanopartícules és més elevada que la de plata iònica, per contra, al augmentar la concentració a les solucions fortificants, la tendència s'inverteix i s'assimila molta més plata iònica. A més, també es pot observar que de 1 a $5 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ hi ha un augment de la concentració en pes, però de 5 i $10 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ no hi ha un augment tan marcat.

Pel cas de la part aèria no es pot treure cap conclusió, ja que hem obtingut unes desviacions estàndards grans. Cal afegir que estem treballant a concentracions molt baixes i obtenim un error molt gran. Tot i això, es pot dir que s'ha observat un augment de la concentració d' 1 a $5 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ a la part aèria. En canvi, de 5 a $10 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ no s'ha vist aquest augment. Aquestes concentracions més elevades, ens permeten confirmar la translocació. És a dir, que la plata que es capta a l'arrel és portada a la part aèria de l'enciam.

Per últim cal comentar que pels motius que s'han esmentat anteriorment, es donen unes desviacions estàndard elevades. Tot i això, per les arrels hem obtingut unes desviacions suficientment bones per distingir el comportament de la plata iònica respecte de les nanopartícules.

4.1.3-Efecte de la mida de la nanopartícula:

Les dades dels experiments anteriors ens va permetre fer una comparació de l'efecte de la mida de la nanopartícula. A continuació s'adjunta la figura 12, on es mostra el gràfic que ens permet comparar l'efecte de la mida de les nanopartícules en l'arrel:

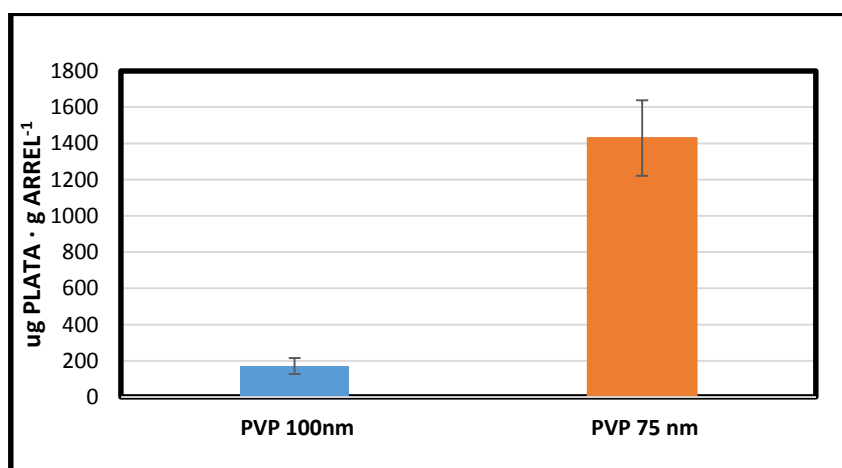


Figura 12: Concentració de Ag a les arrels respecte diferents mides de nanopartícules. [Ag]= $1 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$. n=5

Tot seguit, s'adjunta la figura 13, que ens permet comparar l'efecte de la mida de les nanopartícules sobre la translocació a la part aèria de l'enciam:

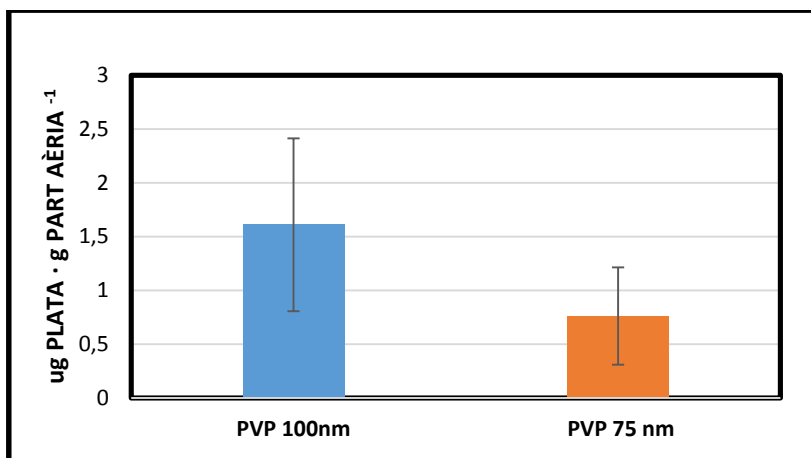


Figura 13: Concentració de Ag a la part aèria de l'enciam respecte diferents mides de nanopartícules.
[Ag]=1mg·Kg⁻¹.n=5

En aquest cas, es pot veure que hi ha diferències significatives entre les dues mides. (valor de p més petit de 0,05). Es pot veure com les nanopartícules de 75nm tenen una concentració més elevada a l'arrel i en canvi, en la part aèria, tenen una concentració més baixa. Això ens indica que les arrels assimilen clarament millor les nanopartícules de 75nm (les més petites) però en canvi, transloquen millor les nanopartícules de 100nm (una mica més grans). Aquests resultats concorden amb els resultats que s'han obtingut en un estudi de exposició d'AgNPs en la germinació d'arròs. (10)

4.2- Estudis de caracterització de plata en enciams. Digestió enzimàtica:

En la digestió àcida i oxidant que es duia a terme amb el microones la forma nanopartícula es perdia, és a dir, la nanopartícula era completament digerida i transformada en plata iònica. Per tant, va ser necessari buscar una digestió que ens permetés mantenir la forma de nanopartícula fins al moment d'analitzar la mostra, per tal de poder verificar la seva presència com a tal. En la literatura es va trobar un tipus de digestió enzimàtica utilitzada en tomàquets que permetia detectar les nanopartícules d'or mitjançant la tècnica SP-ICP-MS. Es va seleccionar aquest enzim i es va adaptar la digestió als enciams i a les nanopartícules de plata. (16)

Abans d'utilitzar la tècnica SP-ICP-MS també es va quantificar plata extreta amb aquesta digestió enzimàtica mitjançant l'instrument ICP-OES. Aquesta quantificació prèvia ens va permetre tenir una idea de quina concentració tenien les mostres i això ens va permetre saber quins eren els rangs de dilució que s'havien de portar a terme per utilitzar la tècnica del SP-ICP-MS. Com s'ha esmentat anteriorment aquesta tècnica ens permetia discriminar la forma de nanopartícula de la resta de components en solució, però les solucions han de ser molt diluïdes per poder fer aquesta determinació.

4.2.1-Efecte del tipus de recobriment:

Per aquesta determinació es van fer 12 cultius individuals. Aquests cultius van ser fortificats amb solucions de AgNPs amb recobriments de PVP, PEG i CIT de 100nm i a una concentració d' $1\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$. A més, també es va fer la digestió enzimàtica amb cultius fortificats amb solució de plata iònica. Aquestes tenien una funció de blanc pel cas de la tècnica del SP-ICP-MS. Es van fer 3 replicats de cada tipus de recobriment i de plata iònica. La quantificació es va dur a terme tant a les arrels com a la part aèria. En aquest cas no vam dur a terme cap blanc, ja que per la digestió completa en tots els casos vam veure que no hi havia cap contaminació creuada, vam concloure que era innecessari fer blancs en aquest cas.

Com s'ha vist en els estudis anteriors, la concentració de plata que hi havia en la part aèria era molt petita, és per això que en aquest primer estudi de la digestió enzimàtica no s'ha pogut quantificar la plata de la part aèria, ja que tenien tan poca plata que les solucions donaven valors per sota el límit de detecció de l'ICP-OES.

Tot seguit a la figura 14 s'adjunta la comparació dels micrograms de plata que s'extreuen a l'arrel mitjançant la digestió enzimàtica pels diferents recobriments i de la solució de plata iònica:

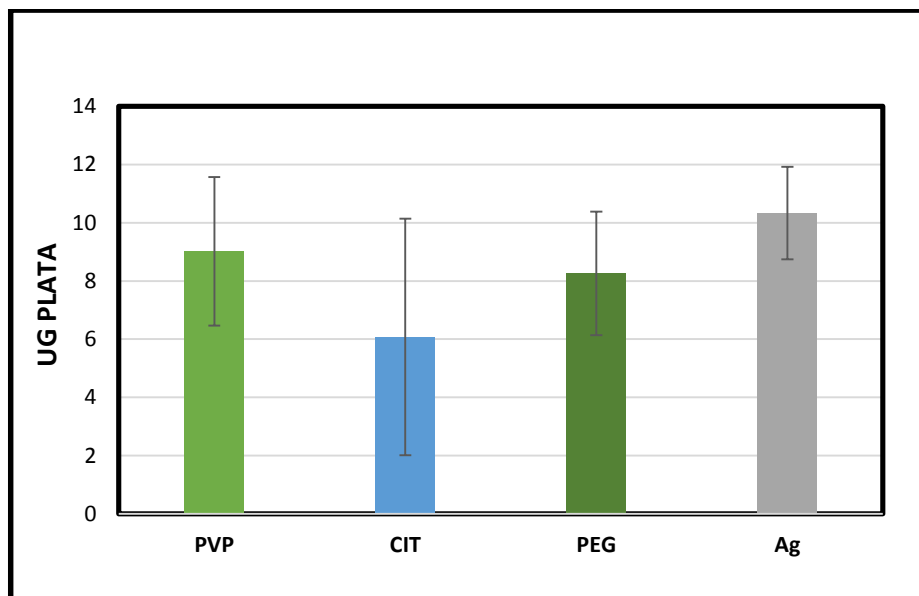


Figura 14: Micrograms de plata en la solució de digestió enzimàtica de les arrels amb enciams cultivats amb solucions hidropòniques de AgNPs de diferents recobriments i de plata iònica. $[Ag]=1\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, $n=3$

Es pot veure en la figura 14 que no s'observen diferències significatives (valor de p més que 0,05) entre els diferents recobriments. De nou, tot i que les desviacions estàndards són grans la plata determinada a la solució enzimàtica dels enciams cultivats en plata iònica és lleugerament superior que els diferents recobriments.

4.2.2-Efecte de les concentracions:

Aquest estudi va comptar amb 15 cultius individualitzats. Aquests cultius van ser fortificats amb solucions de nanopartícules de plata amb recobriment de PVP de 75nm i de diferents concentracions: 1, 5 i 10 mg·Kg⁻¹. En aquest cas, si es va obtenir senyal per les diferents mostres tant part aèria de l'enciam com arrels. Tot seguit s'adjunta la figura 15 on es mostra els micrograms de plata que s'extreu de l'arrel mitjançant la digestió enzimàtica respecte a les diferents concentracions:

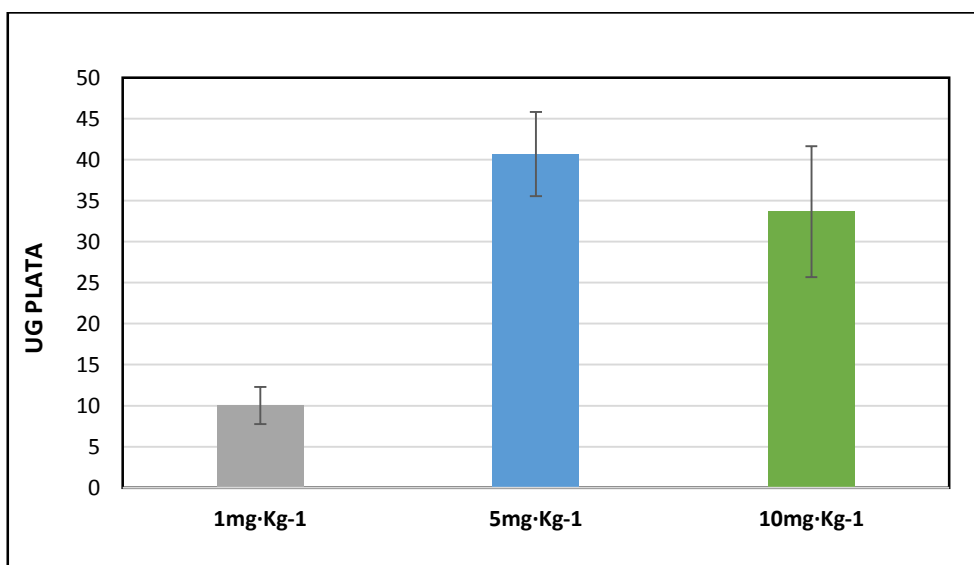


Figura 15: Micrograms de plata en la solució de digestió enzimàtica de les arrels per les diferents concentracions.
n=3

A continuació, s'adjunta la figura 16 on es mostra la comparació dels micrograms de plata que hi ha en la part aèria de l'enciam mitjançant la digestió enzimàtica de les diferents concentracions:

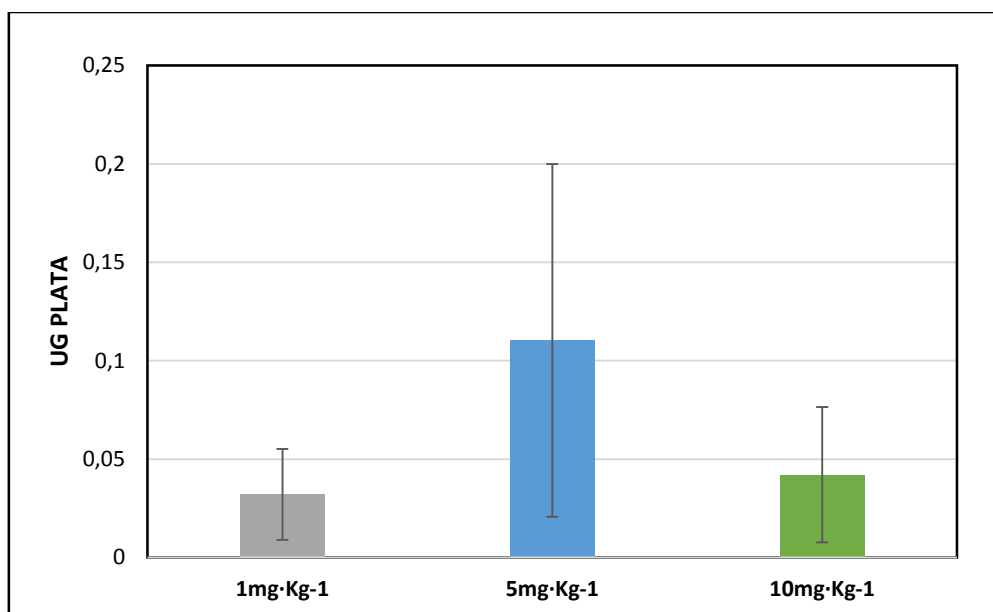


Figura 16: Micrograms de plata en la solució de digestió enzimàtica de la part aèria de l'enciam per les diferents concentracions. $n=3$.

L'extracció enzimàtica segueix la tendència d'obtenir més plata en l'arrel que en la part aèria de les fulles. Cal afegir pel cas de la part aèria però, que la quantitat de plata és molt petita i això fa que qualsevol desviació encara sigui més elevada. En qualsevol dels casos, per la part aèria no es poden veure diferències significatives (p valor més gran que 0,05) entre les diferents concentracions.

Tot i això, per les arrels que semblaria que hi ha més plata pel cas de les concentracions de 5 i 10 mg·Kg⁻¹. Fet que és lògic, ja que de bon inici fortifiquem el cultiu amb una concentració més elevada. A més, pel cas si ens fixem en els increments, de 1 a 5 mg·Kg⁻¹ augmentem unes 4 vegades, en canvi de 5 a 10 mg·Kg⁻¹ hi ha fins i tot una petita baixada. Això podria indicar que l'arrel no pot assimilar més plata, per tant la concentració ja no augmenta encara que la solució fortificada tingui més concentració.

4.2.3- Aplicació de la tècnica SP-ICP-MS per a la identificació de nanopartícules de plata:

Després de verificar la presència de plata en els cultius individualitzats, tant a l'arrel com a la part aèria de l'enciam, el següent objectiu era caracteritzar aquesta plata mitjançant la tècnica del SP-ICP-MS per tal de veure si aquesta es troba en forma de plata iònica o de nanopartícula. Per aquest estudi no es van poder analitzar els 27 cultius individualitzats que es van digerir per la digestió enzimàtica, ja que en algunes d'aquestes digestions no es va poder obtenir suficient solució per a quantificar i caracteritzar. Tot i això, tenint en compte que cada cultiu es dividia en arrel i part aèria, si sumem aquestes dues parts de l'enciam de l'estudi de recobriment i de l'estudi de concentració es van aconseguir passar 25 mostres d'arrels i 17 mostres de part aèria de l'enciam. Per tant, es van obtenir 42 histogrames per tal d'intentar concretar la forma en què es troba la plata, és a dir, si està en forma nanopartícula o en forma iònica.

En general per l'estudi de l'efecte dels diferents recobriments amb nanopartícules de plata de 100 nm s'ha pogut confirmar la presència de plata en forma de nanopartícula a les arrels per tots els tipus. A més, en el cultiu amb la plata iònica que tenia una funció de blanc, no s'han trobat nanopartícules en cap dels replicats. En totes les mostres s'ha trobat una barreja de plata soluble i nanopartícules. Tot seguit s'adjunta la figura 17 on es veu els comptes respecte al temps de 3 exemples d'arrel i diferents tipus de recobriments de nanopartícules:

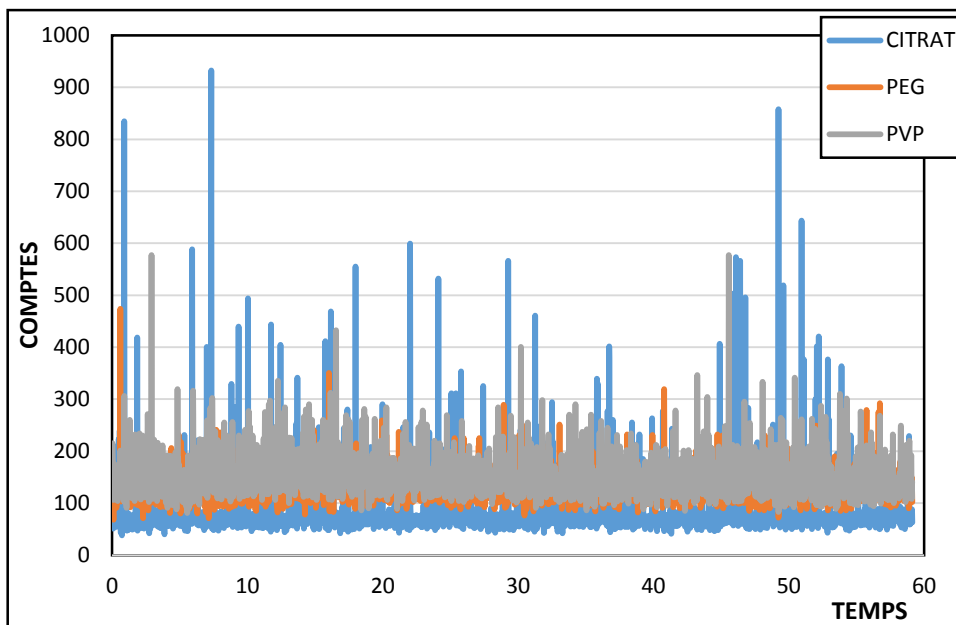


Figura 17: Comptes respecte al temps pels tres exemples d'arrel amb diferent recobriments de nanopartícules.

Clarament es poden veure pics per sobre de 250 comptes, cosa que ens porta a afirmar que hi ha presència de nanopartícules. Tot seguit a la figura 18 s'adjunta l'histograma de la solució obtinguda amb l'extracció enzimàtica de l'arrel per les nanopartícules amb recobriments de citrat per acabar de confirmar que hi ha presència de nanopartícules:

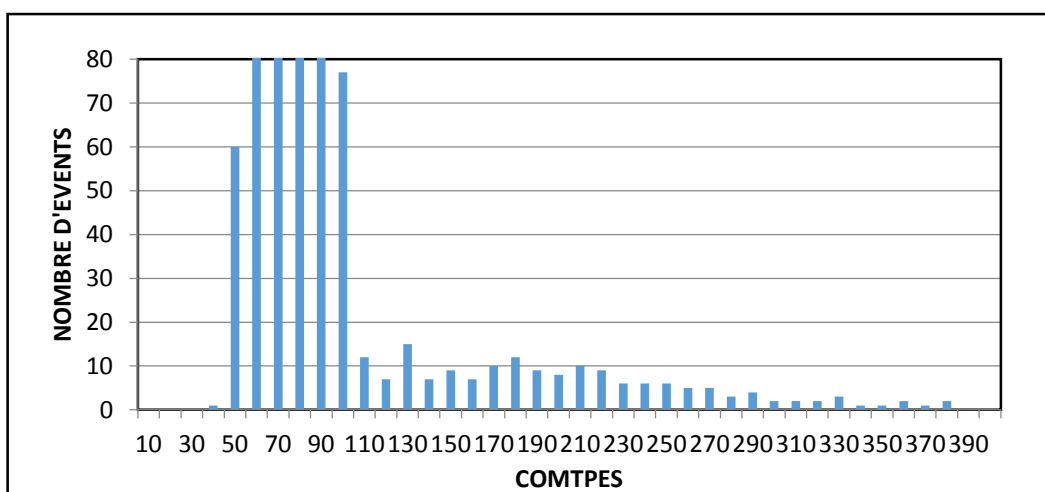


Figura 18: Histograma de l'arrel pel recobriments de citrat.

Com s'ha explicat anteriorment, la forma de doble pic és un clar indicador de què hi ha presència de nanopartícules, i en el cas de citrat, al voltat de 180 comptes veiem una segona pujada que ens indica que hi ha una presència clara de nanopartícules. Tot i això, també es veu entre 50 i 100 comptes uns pics molt elevats que ens indiquen una clara presència de plata en solució.

Per la part aèria de l'enciam, com s'ha comentat anteriorment no es va poder ni caracteritzar ni quantificar, ja que no es va poder extreure prou solució en la digestió enzimàtica.

Pel que fa a l'estudi de les diferents concentracions amb nanopartícules de 75nm i recobriments de PVP. S'ha pogut confirmar la presència de nanopartícules a les arrels per a totes les concentracions estudiades. Com en el cas anterior, en totes les solucions de les digestions enzimàtiques s'observa una barreja de plata soluble i nanopartícules. Tot seguit s'adjunta la figura 19 on es veu els comptes respecte al temps de 3 exemples d'arrel i diferents tipus de concentració:

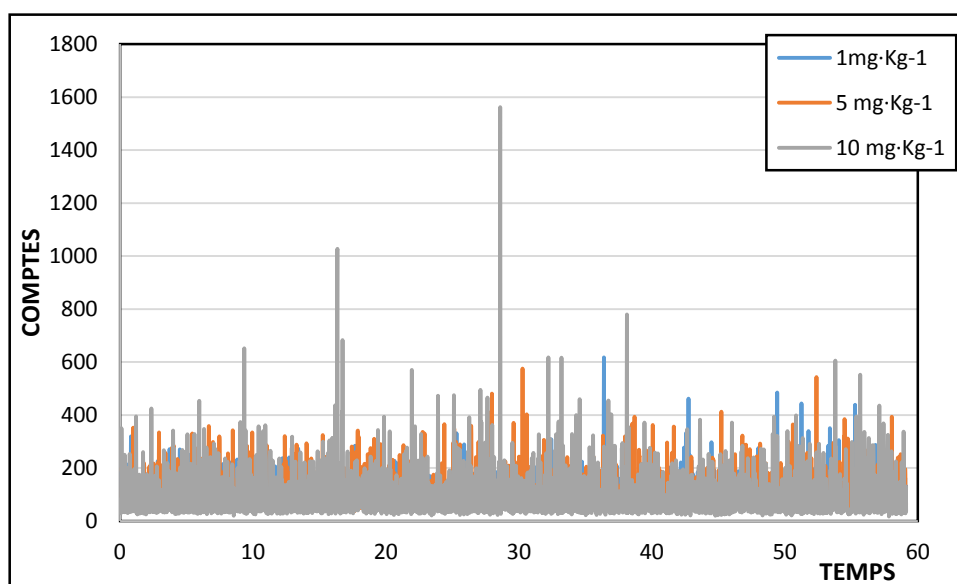


Figura 19: Comptes respecte al temps pels tres exemples d'arrel amb diferent concentració.

Clarament es poden veure pics per sobre de 250 comptes, cosa que ens porta a afirmar que hi ha presència de nanopartícules. Tot seguit a la figura 20 s'adjunta l'histograma de l'arrel de concentració 1mg·Kg⁻¹ per acabar de confirmar que hi ha presència de nanopartícules:

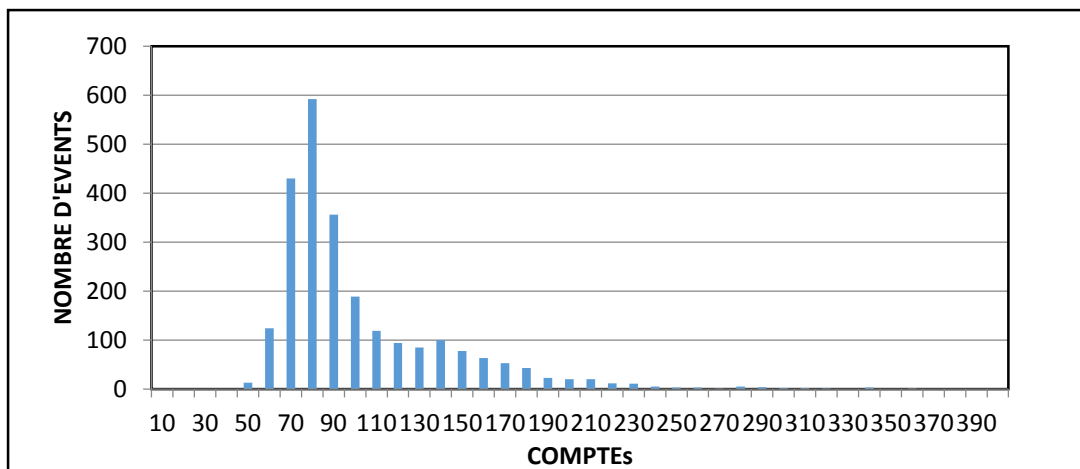


Figura 20: Histograma de l'arrel per la concentració d'1mg·kg⁻¹.

Com s'ha explicat anteriorment, la forma de doble pic és un clar indicador de què hi ha presència de nanopartícules, i en el cas de la concentració d'1mg·kg⁻¹, al voltant de 140 comptes veiem una segona pujada que ens indica que hi ha una presència clara de nanopartícules. Tot i això, també es veu entre 50 i 100 comptes uns pics molt elevats que ens indiquen una clara presència de plata en solució.

Pel cas de la part aèria de l'enciam, es pot afirmar que hi ha presència de plata en solució per a tots els diferents replicats a diferents concentracions. A més, en alguns casos s'ha pogut confirmar la presència de nanopartícules. Tot seguit en la figura 21 s'adjunta l'histograma d'un replicat de concentració de 5mg·kg⁻¹, on s'ha pogut confirmar la presència de nanopartícules:

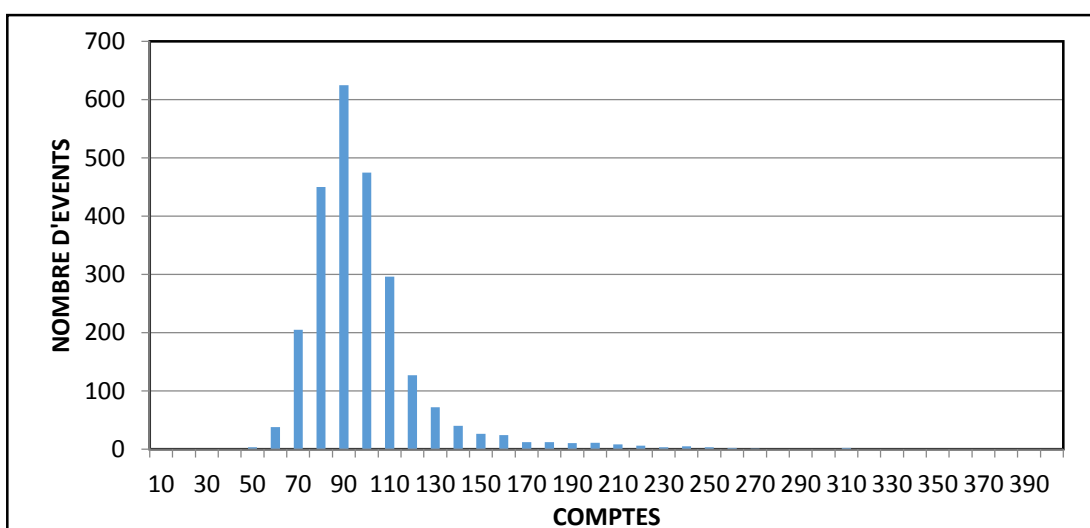


Figura 21: Histograma de la part aèria per la concentració de 5mg·kg⁻¹.

Tot i que es veu un petit pic sobre 160 comptes, amb l'histograma no queda del tot clar la presència de nanopartícules, ja que la presència de plata en solució fa que no sigui una imatge clara.

A continuació, per acabar de confirmar la presència de nanopartícules s'adjunta la figura 22 on es veu els comptes respecte al temps del mateix replicat de $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$:

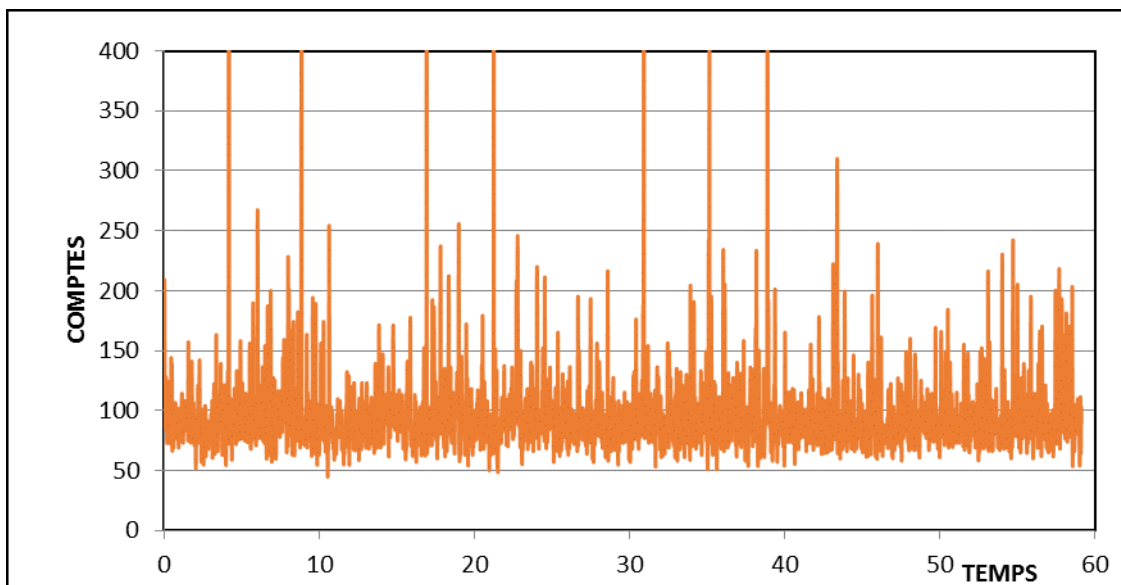


Figura 22: Comptes respecte al temps de la part aèria per la concentració de $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

En el gràfic podem veure que el senyal de fons és plata en solució, que dona senyal entre 50-150 comptes. Però tot i la plata en solució, es pot veure que hi ha forces pics per sobre de 150 comptes. Aquest fet ens confirma la presència de nanopartícules de plata.

Com s'ha dit anteriorment només s'ha pogut confirmar la presència de nanopartícules en alguns casos de la part aèria. Tot seguit, a la figura 23, s'adjunta un histograma d'un replicat de concentració de $1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de la part aèria, on no s'ha pogut confirmar la presència de nanopartícules:

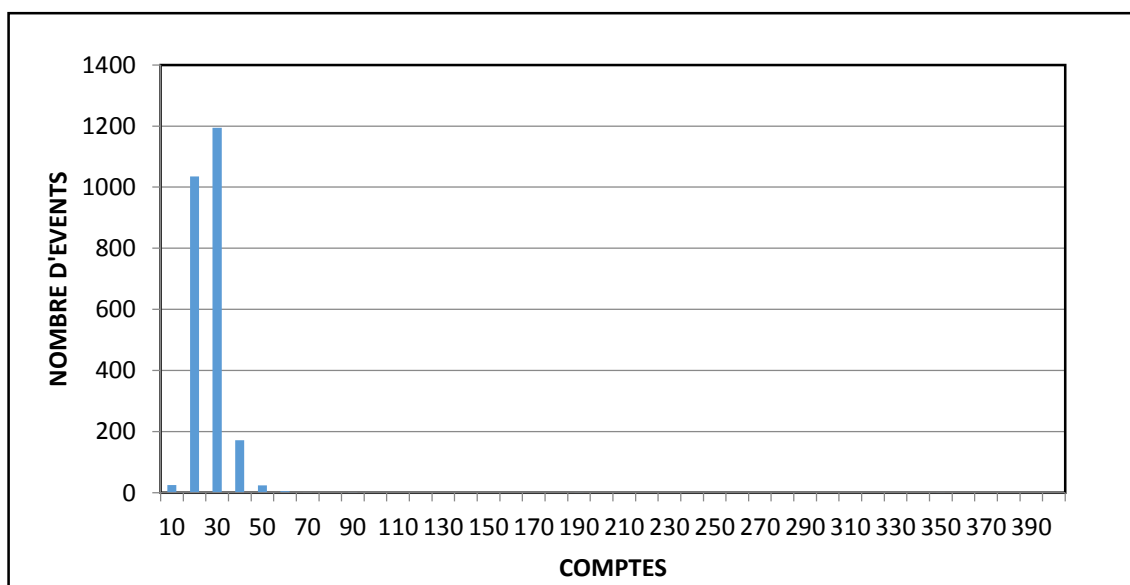


Figura 23: Histograma de la part aèria per la concentració d' $1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

En el gràfic es pot veure la presència de plata en solució, ja que tenim molts events entre 10 i 50 comptes. Aquí no es pot veure que hi hagi presència de nanopartícules, ja que no hi ha més pics al llarg de l'histograma.

A continuació, per acabar de confirmar la no presència de nanopartícules s'adjunta la figura 24 on es veu els comptes respecte al temps del mateix replicat de $1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$:

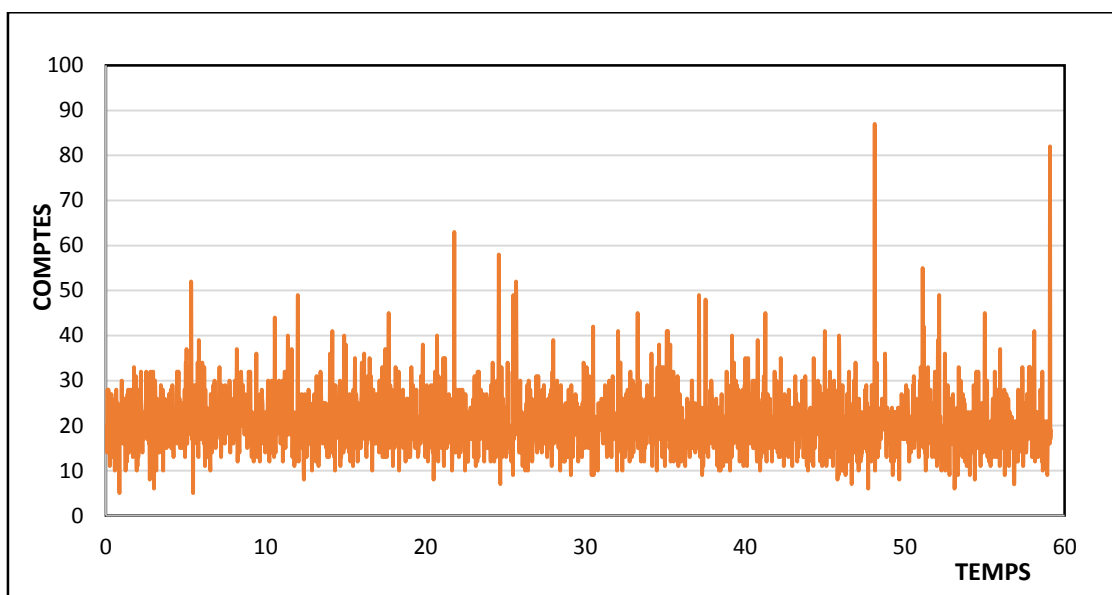


Figura 24: Comptes respecte al temps de la part aèria per la concentració de $1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

En el gràfic es pot veure la presència d'un soroll de fons entre 10-30 comptes. Això ens indica clarament la presència de plata en solució. Per contra, no es pot veure que hi hagi pics per sobre de 100 comptes, això ens confirma la no presència de nanopartícules de plata.

5-ÈTICA I SOSTENIBILITAT

5.1- Ètica i sostenibilitat:

Aquest treball tenia com a objectiu principal aportar més informació sobre les nanopartícules de plata i quin efecte poden tenir aquestes sobre el medi ambient. És clar, que com a finalitat s'ha intentat estudiar quin impacte poden tenir aquestes nanopartícules sobre les plantes. Per tant, l'objectiu principal d'aquest treball està relacionat en millorar o intentar aportar informació per minimitzar l'impacte de contaminants en el medi.

En tot moment, s'ha fet una gestió dels residus adequada tal com indicaven els protocols de la universitat. Les solucions que contenien metalls pesants han sigut dipositades en els contenidors que eren indicats.

També s'ha intentat reduir la quantitat que s'utilitzava dels reactius més tòxics o perillosos com per exemple l'àcid nítric. I sempre que s'ha necessitat treballar amb aquests s'ha fet amb les mesures de protecció necessàries. Tant per la persona que treballava com pel lloc on es treballava.

Durant la realització d'aquest treball en cap moment s'ha intentat apropiari informació de cap autor. Sempre que s'ha aportat informació aquesta ha estat degudament referenciada.

6-CONCLUSIONS

6.1- Conclusions:

The studies and the results obtained in this final degree project allow us to achieve the following conclusions:

- It was confirmed that the lettuce assimilated and incorporated the silver from hydroponic solution to the roots. We have also been able to quantify their content through complete digestion with microwave and enzymatic digestion.
- It has been observed that the concentration in the root is higher than in the aerial part of the lettuce in all our experiments.
- It has been verified the silver translocation from the roots to the aerial part of the lettuce through different concentration studies with spiked solutions with 75 nm AgNPs.
- It has been discriminated the nanoparticle form of the other silver forms in solution through an enzymatic digestion. This was possible by the roots and the aerial part of the lettuce by SP-ICP-MS.
- It has been observed that there aren't significant differences in silver uptake and translocation using AgNPs with different coats.
- It has been determined that smaller nanoparticles are more easily assimilated to the root but they have more difficulty to translocate to the aerial part of the lettuce.
- During this final degree project it has been confirmed that standard deviations of the culture experiments were big due to the difficulty of reproduce the same conditions for each individual crop. The studies with plants include a lot of factors that may influence the reproducibility of the results as well as complex and varied matrices.

7- BIBLIOGRAFIA

1. Krystek P, Ulrich A, Garcia CC, Manohar S, Ritsema R. Application of plasma spectrometry for the analysis of engineered nanoparticles in suspensions and products. *J Anal At Spectrom.* 2011;26(9):1701–21.
2. Klaine SJ, Alvarez PJ., Batley GE, Fernandes TF, Handy RD, Lyon DY, et al. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects stephen. *Environ Toxicol Chem.* 2008;27(9):1825–51.
3. Navarro E, Baun A, Behra R, Hartmann NB, Filser J, Miao AJ, et al. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology.* 2008;17(5):372–86.
4. Tourinho PS, van Gestel CAM, Lofts S, Svendsen C, Soares AMVM, Loureiro S. Metal-based nanoparticles in soil: Fate, behavior, and effects on soil invertebrates. *Environ Toxicol Chem.* 2012;31(8):1679–92.
5. Hendren CO, Mesnard X, Wiesner MR. Estimating Production Data for Five Engineered Nanomaterials As a Basis for Exposure Assessment - Environmental Science & Technology (ACS Publications). 2011;2562–9.
6. Simonet BM, Valcárcel M. Monitoring nanoparticles in the environment. *Anal Bioanal Chem.* 2009;393(1):17–21.
7. Liu J, Jiang G. Silver nanoparticles in the environment. *Silver Nanoparticles Environ.* 2015;1–152.
8. Larue C, Castillo-Michel H, Sobanska S, Cécillon L, Bureau S, Barthès V, et al. Foliar exposure of the crop *Lactuca sativa* to silver nanoparticles: Evidence for internalization and changes in Ag speciation. *J Hazard Mater.* 2014;264:98–106.
9. Pokhrel LR, Dubey B. Evaluation of developmental responses of two crop plants exposed to silver and zinc oxide nanoparticles. *Sci Total Environ.* Elsevier B.V.; 2013;452-453:321–32.
10. Thuesombat P, Hannongbua S, Akasit S, Chadchawan S. Effect of silver nanoparticles on rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105) seed germination and seedling growth. *Ecotoxicol Environ Saf.* Elsevier; 2014;104(1):302–9.
11. Silva BF da, Perez S, Gardinalli P, Singhal RK, Mozeto AA, Barcelo D. Analytical chemistry of metallic nanoparticles in natural environments. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2011;30(3):528–40.
12. Laborda F, Bolea E, Jiménez-Lamana J. Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: A powerful tool for nanoanalysis. *Anal Chem.* 2014;86(5):2270–8.
13. Laborda F, Jiménez-Lamana J, Bolea E, Castillo JR. 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.* 2011;26(7):1362.

14. Tuoriniemi J, Cornelis G, Hassellöv M. Size discrimination and detection capabilities of single-particle ICPMS for environmental analysis of silver nanoparticles. *Anal Chem.* 2012;84(9):3965–72.
15. Song U, Jun H, Waldman B, Roh J, Kim Y, Yi J, et al. Ecotoxicology and Environmental Safety Functional analyses of nanoparticle toxicity : A comparative study of the effects of TiO₂ and Ag on tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *Ecotoxicol Environ Saf.* 2013;93:60–7.
16. Dan Y, Zhang W, Xue R, Ma X, Stephan C, Shi H. Characterization of gold nanoparticle uptake by tomato plants using enzymatic extraction followed by single-particle inductively coupled plasma-mass spectrometry analysis. *Environ Sci Technol.* 2015;49(5):3007–14.
17. Margui E, Queralt I, Carvalho ML, Hidalgo M. Comparison of EDXRF and ICP-OES after microwave digestion for element determination in plant specimens from an abandoned mining area. *Anal Chim Acta.* 2005;549(1-2):197–204.
18. Fallis A. Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices. *J Chem Inf Model.* 2013;53(9):1689–99.
19. NanoComposix [Internet]. Europe; Nanocomposix. [Citat el 27/07/2016]. Disponible a: http://cdn.shopify.com/s/files/1/0257/8237/files/Standard_Capping_Agents.pdf
20. Sigma-Aldrich [Internet]. USA; Sigma-Aldrich. [Citat el 27/07/2016]. Disponible a: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/classic-plant-media.html>