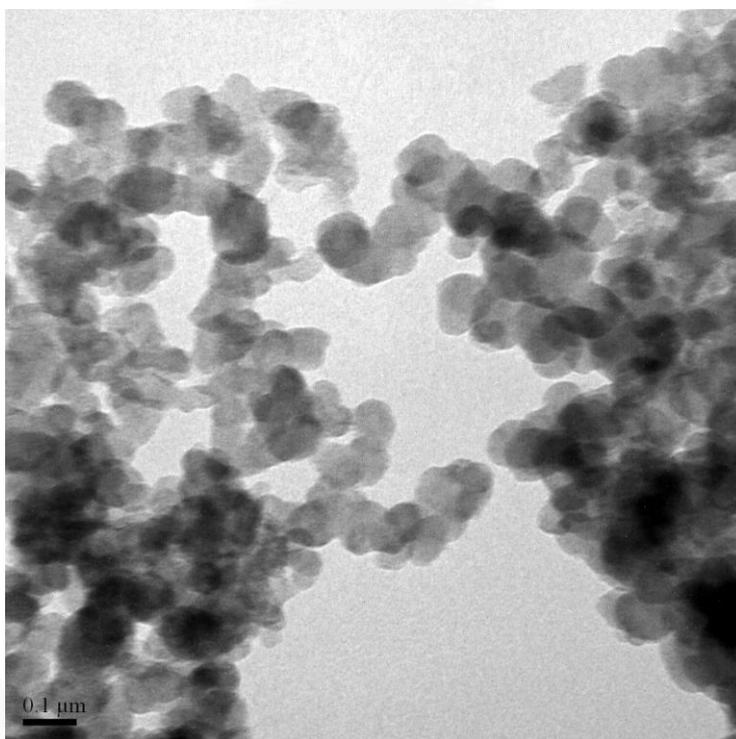


# TRABAJO FIN DE GRADO

## BIOTECNOLOGÍA

Caracterización de nanopartículas metálicas en productos  
cosméticos



Carlotta Giacobone Casadidio

Área de Química Física y Analítica/Universidad  
de Oviedo

Julio/2023



UNIVERSIDAD DE OVIEDO  
FACULTAD DE BIOLOGÍA





## Resumen

Hoy en día todas las personas utilizan algún tipo de producto cosmético, ya sea para perfumar, limpiar o modificar el aspecto de la piel durante un periodo de tiempo. La composición de los cosméticos es variada y, en España se encuentran bajo la regulación del Real Decreto 1559/1997 del 17 de octubre. Pueden contener conservantes, antioxidantes, colorantes, filtros UV etc. Un componente común en estos productos son los metales, que pueden encontrarse tanto en forma iónica como en forma nanoparticulada. Una nanopartícula es una partícula donde al menos una de las dimensiones que la forman se encuentra entre 1 y 100 nm. En este trabajo se analizaron tres muestras comerciales de una sombra de ojos, una crema solar de protección solar 50+ y un spray para cuerpo y cabello. Se aplicó un procedimiento de digestión ácida en microondas para una cuantificación de la concentración total iónica de los metales seleccionados mediante espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS); paralelamente, se prepararon suspensiones de las muestras empleando dodecil sulfato sódico (SDS) para extraer las nanopartículas, obteniendo número y tamaño de las mismas, mediante Single-Particle ICP-MS (SP-ICP-MS). Por último, estas se visualizaron mediante microscopio electrónico de transmisión (TEM). Las nanopartículas observadas coincidían en tamaño con nanopartículas de aluminio y titanio, aunque para conocer su composición, se tendría que hacer otro tipo de pruebas como TEM de alta resolución o dispersión de rayos X.

## Abstract

Nowadays all people use some kind of cosmetic product, either to perfume, clean or modify the appearance of the skin for a period of time. The composition of cosmetics is varied and, in Spain are under the regulation of Royal Decree 1559/1997 of 17 October. They may contain preservatives, antioxidants, dyes, UV filters etc. A common component in these products are metals, which can be found in both ionic and nanoparticle form. A nanoparticle is a particle where at least one of the dimensions that form it is between 1 and 100 nm. Three commercial eye shadow samples, a 50+ sunscreen and a body and hair spray were analyzed. Microwave acid digestion were performed to quantify the total ionic concentration of the metals selected by means of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS); dilutions of the samples were prepared with a solution of sodium dodecyl sulfate (SDS), obtaining the number and size of the nanoparticles present by Single-Particle ICP-MS (SP-ICP-MS) and finally, these were visualized by means of transmission electron microscope (TEM). The nanoparticles observed coincided in size with aluminum and titanium nanoparticles, although to know their composition, other types of tests would have to be done such as high resolution TEM or X-ray dispersion.

## INDICE

Resumen/Abstract	
1. Introducción.....	6
1.1 Composición de cosméticos y productos de belleza.....	6
1.2 Metales en cosméticos.....	7
1.3 Cuantificación de metales en productos cosméticos.....	7
1.4 Nanopartículas: Definición y toxicología.....	8
1.4.1 NPs de oro.....	9
1.4.2 NPs de óxido de aluminio.....	9
1.4.3 NPs de dióxido de titanio y óxido de zinc.....	9
1.5 Objetivos.....	10
2. Material y métodos.....	10
2.1 Muestras .....	10
2.2 Cuantificación de la concentración total iónica mediante ICP-MS 4.....	11
2.3 Preparación de los patrones de calibrado para la medida por ICP-MS.....	12
2.3.1 Preparación de las muestras .....	13
2.3.1.1 Limpieza del microondas .....	13
2.3.1.2 Digestión .....	13
2.3.1.3 Diluciones de las muestras .....	13
2.4 Cuantificación de nanopartículas mediante SP-ICP-MS .....	14
2.4.1 Preparación de las muestras para SP-ICP-MS.....	16
2.4.2 Diluciones de las muestras .....	16
2.5 Microscopio electrónico de transmisión (TEM).....	16
3. Resultados y discusión.....	17
3.1 Concentración total iónica .....	17
3.1.1 Optimizaciones de las condiciones de la digestión.....	17
3.1.2 Calibrado.....	17
3.1.3 Aluminio.....	18
3.1.4 Titanio.....	18
3.1.5 Zinc.....	19
3.1.6 Oro.....	20
3.2 Extracción y caracterización de nanopartículas.....	20
3.2.1 Optimizaciones de las condiciones de la extracción .....	20
3.2.2 Eficacia de transporte y calibrado.....	21
3.2.3 Aluminio.....	21
3.2.4 Titanio.....	23



3.3 Microscopio electrónico de transmisión (TEM).....	24
4. Conclusiones .....	26
5. Bibliografía .....	26

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Composición de cosméticos y productos de belleza

Hoy en día la mayoría de las personas utilizan algún tipo de producto cosmético. Según el BOE se considera producto *cosmético* “a toda sustancia o preparado destinado a ser puesto en contacto con las diversas partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto y/o corregir los olores corporales y/o protegerlos o mantenerlos en buen estado”. También se define el concepto de *cosmético decorativo* que “por poseer sustancias coloreadas y por su poder cubriente, se aplican sobre diferentes zonas del cuerpo para acentuar temporalmente su belleza o enmascarar o disimular diversas imperfecciones cutáneas” [1].

Estos cosméticos están formados por una gran diversidad de compuestos, como minerales (talco, TiO<sub>2</sub>, ZnO etc.); polvos vegetales (harina de arroz, almidón de maíz etc.); aceites, grasas y ceras (mantequilla de cacao, vaselina etc.); tintes, colorantes y pigmentos; conservantes; filtros UV y otros componentes (perfumes, agua, antioxidantes etc.) [2].

Estos compuestos pueden tener efectos sobre la salud humana, por esto en España y en la Unión Europea existen regulaciones legales donde se establecen los requisitos y limitaciones para el uso de los mismos.

Esta regulación se basa en el Real Decreto 1599/1997, del 17 de octubre, donde se definen los productos cosméticos (las diferentes categorías de productos, una lista de sustancias prohibidas en la composición de los productos cosméticos, al igual que una lista con las sustancias permitidas siempre y cuando no superen cierta concentración y en condiciones diferentes a las indicadas), se determinan las condiciones técnico-sanitarias, un control sanitario, los requisitos de las instalaciones donde se producen, las de importación de productos que provienen de otros países, la regulación del etiquetado y su publicidad, la inspección que puede llevar a infracciones y sanciones [1]. En la *Figura 1* se muestra un fragmento del Anexo II (1).

<b>ANEXO II (1)</b>	
<b>Lista de sustancias prohibidas en la composición de los productos cosméticos</b>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 2-acetilamino-5-clorobenzoxazol.</li> <li>2. Acetilcolina y sus sales.</li> <li>3. Aceglumato de deanol (a).</li> <li>4. Espironolactona (a).</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>43. Arsénico y sus compuestos.</li> <li>44. «Atropa belladonna l» y sus preparaciones.</li> <li>45. Atropina, sus sales y derivados.</li> <li>46. Bario (sales de) con excepción de:            Sulfato y sulfuro en las condiciones previstas en el anexo III (1.ª parte).            Lacas, pigmentos o sales preparadas a partir de colorantes que figuran con la referencia (3) en el anexo IV.</li> </ol>

*Figura 1: Fragmento obtenido del Anexo II (1) del Real Decreto 1599/1997 del 17 de octubre [1], donde se muestra la «lista de sustancias prohibidas en la composición de los productos cosméticos». En ella se pueden ver algunos metales como As*

## 1.2. Metales en cosméticos

Los productos cosméticos, como se menciona anteriormente, están formados por muchos compuestos, algunos de los cuales pueden ser compuestos metálicos o metales puros. Estos metales pueden estar en forma iónica o en forma de nanopartículas (NPs).

La mayoría de las sustancias que se encuentran en los cosméticos se han añadido de forma intencionada para conseguir algún efecto cosmético concreto. Sin embargo, otras sustancias pueden aparecer de forma no intencional. Por ejemplo, concentraciones bajas de algunos metales pueden aparecer como contaminaciones de las materias primas, o de forma residual por el desgaste de partes metálicas del instrumental utilizado durante la producción.

Algunos metales que pueden encontrarse comúnmente en productos cosméticos son el cromo (Cr), hierro (Fe), cobre (Cu), o aluminio (Al) [3]. El cromo en forma de óxido de cromo se utiliza como pigmento inorgánico verde [4]. Para su utilización debe estar exento del ion cromato [5]. El hierro en forma de óxido de hierro se utiliza como colorante en diferentes tonos como pueden ser el negro, amarillo o rojo [6]. Para su utilización como pigmento amarillo no debe tener menos del 60% del hierro total, expresado en hierro, mientras que para los colorantes rojo y negro, no debe tener menos del 68% [7]. El cobre es usado gracias a sus propiedades antiinflamatorias y cicatrizantes [8] además de ser imprescindible para algunas enzimas y para la fabricación de la hemoglobina [9].

Los metales pesados como el plomo (Pb), cadmio (Cd), níquel (Ni), arsénico (As) o mercurio (Hg) están totalmente prohibidos en la composición de los productos cosméticos por su toxicidad. Por ello, su presencia debe ser controlada a muy bajos niveles de concentración.

Elementos en forma iónica como níquel (Ni) y cromo (Cr) se acumulan en el estrato córneo (capa más superficial de la epidermis [10]) pudiendo causar dermatitis. Mientras que mercurio (Hg), plomo (Pb), cadmio (Cd) y aluminio (Al) pasan a través de las capas de la piel hasta los vasos sanguíneos, donde se transportan hacia los órganos y se acumulan causando efectos tóxicos. Aunque la absorción a través de la piel de este tipo de metales es mucho menor que mediante vía gastrointestinal o inhalación [3].

## 1.3. Cuantificación de metales en productos cosméticos

Hay diferentes técnicas con las que cuantificar la concentración iónica de metales en los productos cosméticos. Una de ellas es espectroscopía de absorción atómica de llama (FAAS). Es una técnica muy sensible (límites de detección del orden de ppb) y específica ya que las líneas de absorción atómica son estrechas, del rango de 0.002 nm a 0.005 nm. Además, las energías de transición electrónicas son únicas para cada elemento. Consiste en un haz emitido por una fuente de radiación, que puede ser monocromática o policromática, que atraviesa el sistema de atomización, donde se encuentra la muestra en estado de gas atómico. El haz llega al

monocromador, el cual deja pasar al detector la radiación absorbida. Esta es procesada y amplificada [11].

Otra técnica es la espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito (GFAAS) que al igual, que FAAS, se basa en la longitud de onda a la cual un elemento específico absorbe la luz, pero en este caso la atomización de la muestra tiene lugar en un tubo de grafito [12].

Otro tipo de espectrometrías para cuantificar la concentración iónica de metales en cosméticos es la espectroscopía de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES). La sensibilidad de esta técnica puede llegar al orden de ppb y se pueden cuantificar todos los elementos, a excepción de carbono (C), nitrógeno (N), oxígeno (O), hidrogeno (H), flúor (F), gases nobles y algunos elementos poco comunes. Las muestras se introducen en forma líquida y, mediante el nebulizador, se forman pequeñas gotas y se excitan con un plasma de argón. Las emisiones de los átomos que son excitados van a un policromador con detectores y, de esta forma se obtienen los espectros de emisión [13].

#### **1.4. Nanopartículas: Definición y toxicología**

Recientemente, en la industria cosmética se ha comenzado a utilizar nanopartículas. Las nanopartículas se definen como partículas donde al menos una de las dimensiones que la forman está entre 1 y 100 nm, las cuales tienen diferentes características dependiendo del tamaño y funcionalidades superficiales, que son diferentes a las propiedades de la misma materia en forma no nanoparticulada [14].

Las nanopartículas se utilizan en la industria cosmética, ya que aportan una mejor protección frente a los rayos UV, mejor penetración de los productos en la piel, mayor estabilidad de los diferentes principios activos que forman los productos y aumenta el color y calidad final de los mismos [3].

Las nanopartículas pueden clasificarse en naturales o antrópicas, estas últimas, además, se dividen en dos grupos: accidentales o manipuladas. Las NPs accidentales son resultado de las actividades del hombre, normalmente sus tamaños y formas están mal controlados y pueden ser una mezcla de varios elementos. En cambio, las NPs manipuladas son intencionales. Pueden ser poliméricas, orgánicas e inorgánicas, y están diseñadas y sintetizadas por seres humanos [15].

Las NPs también pueden clasificarse según su composición. Puede ser orgánicas, fabricadas con proteínas, carbohidratos, lípidos etc., a base de carbono, contienen solamente átomos de carbono o, inorgánicas que no contienen carbono ni materiales orgánicos.

Otra forma de clasificación es según propiedades fisicoquímicas. Pueden tener propiedades mecánicas, relacionadas con resistencia, dureza, plasticidad etc., propiedades termales, relacionadas con conductividad térmica, capacidad calorífica etc., propiedades

magnéticas, electrónicas y ópticas, relacionadas con absorción lineal, emisión de fotoluminiscencia etc. y, propiedades catalíticas, relacionadas con reactividad y selectividad [16].

La toxicidad de las NPs depende de la vía de administración o exposición. La exposición a las NPs puede ocurrir por su ingesta, mediante inyección, inhalación o contacto con la piel. En productos cosméticos, la exposición a nanopartículas puede ser intencional, buscando una penetración a través de la piel para la realización de alguna función aunque, también puede ser accidental, por ejemplo al entrar por una vía no deseada en el organismo (inhalación pulmonar) [14].

Una vez las nanopartículas han sido absorbidas por el organismo, estas pueden ser distribuidas a través de la circulación sanguínea y acumularse, con consecuencias variables, en diferentes órganos en función de sus características físicoquímicas. A continuación, se expondrán algunos efectos de algunos de los tipos de nanopartículas metálicas que más frecuentemente pueden encontrarse en productos cosméticos.

#### **1.4.1. NPs de oro**

En el caso de las NPs de Au tienen propiedades antibacterianas, antifúngica y antiinflamatoria. El oro no muestra propiedades antimicrobianas por sí mismo, sino que tiene que incorporarse con otras biomoléculas para poder emplearse en aplicaciones biomédicas. Estas nanopartículas se entrecruzan con colágeno de manera que pueden integrarse en moléculas como polisacáridos, factores de crecimiento o péptidos, mostrando propiedades como biocompatibilidad y biodegradabilidad, siendo útil en regeneración de heridas. Sus dos posibles mecanismos consisten en, entrar en la célula bacteriana alterando su potencial de membrana e inhibiendo la ATP sintasa, reduciendo así los niveles de ATP que llevan a un colapso en el metabolismo energético y por tanto, la muerte celular y, segundo, provocar la muerte en bacterias resistente a distintos fármacos usando mecanismos independientes de las especies reactivas del oxígeno (ROS) [17].

#### **1.4.2. NPs de óxido de aluminio**

Las NPs de óxido de aluminio se puede presentar en diferentes fases cristalinas siendo la alfa más estable. Se utilizan como agente abrasivo, por ejemplo, en dentífricos. También puede actuar como agente absorbente sobre la piel, por ejemplo, en forma de desodorante, tapando los poros de las glándulas sudoríparas; en bases de maquillaje y correctores, ya que difumina la luz y disimula las arrugas [18], [19].

### **1.4.3. NPs de dióxido de titanio y óxido de zinc**

Las NPs de dióxido de titanio y óxido de zinc pueden aparecer como partículas dispersas con un diámetro entre 5 y 20 nm pero, debido a su tendencia a agregarse, es frecuente que se encuentren agregados, de entre 30 y 150 nm o, aglomerados, que pueden llegar a ser mayores de 1000 nm [20].

Estas NPs con un tamaño de 20 nm se utilizan en protectores solares como filtros de rayos UV. Además, se sugiere que las NPs de dióxido de titanio son más efectivas en la exposición frente a los rayos más perjudiciales, los UVB (310 nm) que a los de UVA (400 nm) [3].

Estas nanopartículas no se consideran dañinas, aunque existe una cierta controversia. Algunos estudios han encontrado que los agregados en contacto con la piel mantienen su estructura, evitando la liberación de partículas primarias, y por tanto siendo inofensivas [15]. Sin embargo, otros estudios [21] apuntan a que estas nanopartículas pueden presentar efectos tóxicos en función de la dosis, tamaño y fase en la que se encuentran. Por ejemplo, para  $TiO_2$  en fase anatasa se vio más toxicidad que en rutilo. Además, estos productos pueden sufrir modificaciones en contacto con el agua, humedad, temperatura, radiación UV y abrasión con la arena [22]. Otros estudios [23] aseguran que el principal problema es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) bajo radiación UV. Para solucionar esto, las NPs de  $TiO_2$  se recubren con materiales de magnesio, sílice, alúmina o circonio [2].

## **1.5. OBJETIVOS**

El objetivo de este trabajo es estudiar la composición elemental de diferentes muestras de productos cosméticos mediante espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) y caracterizar las posibles nanopartículas metálicas que puedan encontrarse en ellos mediante Single-Particle ICP-MS (SP-ICP-MS) y corroborar el diámetro calculado a partir de las intensidades obtenidas, observando las muestras al microscopio electrónico de transmisión (TEM).

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1. Muestras**

En este trabajo se han analizado tres muestras de productos cosméticos: una crema de protección solar, una sombra de ojos y un líquido en forma de spray para cabello y cuerpo. A continuación, se especifican los productos utilizados y la composición declarada por el fabricante:

- Crema solar en forma de spray 50+ Solar Line de Mercadona con composición: Aqua, octocrylene, alcohol, C12-15 alkyl benzoate, glycerin, butyl methoxybenzoylmethane, ethylhexyl salicylate, phenylbenzimidazole sulfonic acid, propylheptyl caprylate,

- vp/hexadecene copolymer, triacontanyl pvp, bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine, panthenol, microcrystalline cellulose, parfum, tocopheryl acetate, sodium hydroxide, acrylates copolymer, acrylates/C10-30 alkylacrylate crosspolymer, caprylyl glycol, ethylhexylglycerin, galactoarabinan, disodium edta, cellulose gum, linalool, benzyl alcohol, limonene, benzyl salicylate, eugenol, citronellol, coumarin, geraniol, tocopherol.
- Sombra de ojos número 74 “Walking in the sand” de Sephora con composición: talc, mica, calcium sodium borosilicate, CI 77891 (titanium dioxide), dimethicone, octyldodecyl stearoyl stearate, dimethiconol stearate, diisostearyl malate, CI 77491 (iron oxides), maltodextrin, caprylyl glycol, CI 77492 (iron oxides), phenoxyethanol, lauroyl lysine, hexylene glycol, CI 77499 (iron oxides), tin oxide, *Camellia sinensis* leaf extract.
  - Spray para cabello y cuerpo “Minnie shimmer hair and body mist” de Primark con composición: aqua (water), peg-40 hydrogenated castor oil, parfum (fragrance), butylene glycol, phenoxyethanol, ammonium acryloyl dimethyltaurate/carboxyethyl acrylate crosspolymer, ethylhexylglycerin, synthetic fluorphlogopite, hydrolyzed corn starch, titanium dioxide (CI 77891), *Beta vulgaris* (beet) root extract, ppg-26-buteth-26, silica, ethylhexyl methoxycinnamate, lactic acid, butyl methoxydibenzoylmethane, ethylhexyl salicylate, tin oxide, p-anisic acid, geraniol, citronellol, linalool, eugenol, citral, CI 42090 (blue 1), CI 17200 (red 33), CI 19140 (yellow 5).

## 2.2. Cuantificación de la concentración total iónica mediante ICP-MS

La espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) es una técnica muy sensible (con límites de detección del orden de ppt), capaz de cuantificar casi todos los elementos de la tabla periódica con un potencial de ionización menor que el potencial de ionización del argón [24].

En ICP-MS, la muestra se introduce en forma líquida a través de un sistema de introducción, formado generalmente por un nebulizador, que genera un aerosol que, a continuación, es filtrado en una cámara de nebulización. Solo las gotas más pequeñas de este aerosol son capaces de salir de esta cámara e introducirse directamente en el centro del plasma de argón, donde se vaporizan, se atomizan y se ionizan. Los iones monoatómicos generados, la mayoría de ellos con una única carga positiva, se separan en el analizador de masas en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ), para finalmente ser detectados [25].

Uno de los problemas que pueden aparecer en ICP-MS son las interferencias poliatómicas que se pueden formar por la combinación de átomos del analito con los de elementos atmosféricos. Así, por ejemplo, la medida del isótopo mayoritario del titanio ( $^{48}\text{Ti}$ ) puede verse afectada por la interferencia resultante de la combinación de un átomo de azufre (S) con una de oxígeno ( $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$ ) que tiene la misma masa nominal que la de  $^{48}\text{Ti}^+$ . Para resolver este problema

sin utilizar un analizador de masas con una resolución mucho mayor, se utilizan sistemas que, o bien rompan la interferencia en sus especies atómicas por colisión con un gas inerte como el helio (He), o bien utilicen un gas reactivo, como el oxígeno, para que el analito forme una nueva especie con una masa diferente. Así, en el caso de a medida de  $^{48}\text{Ti}$  puede utilizarse oxígeno para formar el dímero  $^{48}\text{Ti}^{16}\text{O}^+$ , cuya  $m/z$  es 64, diferente de la de interferencia  $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$ .

Para todas las medidas, se utilizó un ICP-MS de triple cuadrupolo, modelo iCAP TQ de Thermo Fisher Scientific. Este instrumento tiene una configuración que incluye tres cuadrupolos que permiten, el primero de ellos, seleccionar la masa de interés. El segundo puede funcionar como una celda de reacción o colisión con un gas reactivo o inerte, respectivamente. En el tercer cuadrupolo, se selecciona la masa final de interés libre de interferencias. Este sistema puede funcionar en modo triple cuadrupolo o, cuadrupolo sencillo, en el que el primer cuadrupolo, funcionaría solo como una guía de iones. Además, puede utilizar diferentes gases en la celda de reacción/colisión.

Los metales seleccionados para las medidas fueron Al, Zn, Au y Ti. Para la cuantificación del contenido total de estos metales se monitorizaron los isótopos  $^{27}\text{Al}$ ,  $^{64}\text{Zn}$ ,  $^{66}\text{Zn}$ ,  $^{197}\text{Au}$ ,  $^{46}\text{Ti}$  y  $^{48}\text{Ti}$ . Los isótopos de Al, Zn y Au pueden medirse directamente por no estar interferidos por ninguna especie poliatómica. Sin embargo, los isótopos de Ti están interferidos por las especies  $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$  y  $^{32}\text{S}^{14}\text{N}^+$ , entre otras. Por lo tanto, en el caso de la medida de Ti se decidió utilizar  $\text{O}_2$  como gas de reacción para monitorizar la especie  $^{48}\text{Ti}^{16}\text{O}^+$ .

Antes de utilizar el ICP-MS, se hace una optimización de los parámetros de la interfase y de la celda de colisión/reacción, incluyendo el flujo de oxígeno en la misma. Los parámetros obtenidos se muestran en las *Tablas 1 y 2*.

Parámetros	Valor
Velocidad de la bomba peristáltica	40.00 rpm
Energía del plasma	1550.00 W
Flujo auxiliar	0.80 L/min
Flujo del nebulizador	1.00 L/min

*Tabla 1: Condiciones de ICP-MS y SP-ICP-MS durante las medidas*

Parámetros	Valor
Flujo $\text{O}_2$	0.35 mL/min

*Tabla 2: Condiciones del flujo de  $\text{O}_2$  para medir  $^{46}\text{Ti}$  y  $^{48}\text{Ti}$  en ICP-MS y SP-ICP-MS*

Una vez el equipo está optimizado, se prepararon las disoluciones de calibrado. Estas servirán para calcular las concentraciones de los elementos estudiados en las muestras.

### 2.3. Preparación de los patrones de calibración para la medida por ICP-MS

Para el calibrado se utilizaron stocks de 1000 ppm de los elementos Al, Ti, Zn y Au. Para conseguir las diferentes concentraciones en cada punto, primero se hizo una disolución intermedia para cada elemento de 1 ppm. Se hicieron cinco puntos con las concentraciones mostradas en la *Tabla 3*, de cada uno de ellos.

Punto	Al (ppb)	Ti (ppb)	Zn (ppb)	Au (ppb)
1	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.25	5.00	3.75	5.00
3	0.50	10.00	7.50	10.00
4	0.75	15.00	11.25	15.00
5	1.00	20.00	15.00	20.00

*Tabla 3: Resumen de las concentraciones del calibrado para medir la concentración iónica de cada elemento en las muestras estudiadas*

#### 2.3.1. Preparación de la muestra

Para la medida del contenido elemental total en las muestras, estas deben mineralizarse para poner en disolución todos los elementos de la matriz y los analitos. Para ello, se optó por una digestión en el horno microondas Ethos 1 de Milestone, utilizando insertos de pequeño volumen que se colocan dentro de las bombas, de forma que se minimiza el consumo de muestra y ácidos y, se aumenta el rendimiento, ya que se pueden digerir tres muestras independientes en cada bomba [26].

##### 2.3.1.1. Limpieza del microondas

Previamente a la digestión de las muestras y, entre diferentes digestiones, el microondas debe ser limpiado para evitar posibles contaminaciones y eliminar cualquier impureza. Para la limpieza se añadieron a cada microinserto 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$  al 65% (v, v), 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% (v, v) y 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ.

El programa de temperaturas utilizado consistió en una rampa de 10 minutos hasta alcanzar 150°C. Se mantuvo 10 minutos a esta temperatura y, por último, 1 hora para enfriar.

##### 2.3.1.2. Digestión

Para la digestión de las muestras se llevó a cabo por triplicados, pesando 0,1g de muestra en cada réplica. También se digieren tres blancos de reacción. Después se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$  al 65% (v, v) y 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% (v, v) a cada microinserto.

El programa de temperaturas utilizado consistió en una rampa de 30 minutos hasta llegar a los 150°C, donde se mantuvo 1 hora. Para finalizar, se dejó enfriar 1 hora.

### 2.3.1.3. Diluciones de las muestras

Una vez finalizado el proceso de digestión, el contenido de los insertos se vertió en tubos, previamente pesados y se enrasó con  $\text{HNO}_3$  al 2% hasta llegar a los 10 mL aproximadamente, ya que después se corregiría por pesada.

Dado que no se conocían de antemano las concentraciones de los diferentes elementos, se llevó a cabo una optimización de las diluciones necesarias para cada una de las muestras, de forma que estuviesen en el rango lineal del calibrado. Se determinaron las siguientes diluciones para cada muestra, que se llevaron a cabo por pesada y utilizando  $\text{HNO}_3$  al 2% para el enrase.

- Para la crema solar: 1/10
- Para la sombra de ojos: 1/10000
- Para el spray de cabello y cuerpo: 1/100

Tras las digestiones, se observó que, en el caso de la sombra de ojos y el spray quedaba un residuo sólido brillante, similar a la purpurina que contenían las muestras que no se había digerido en las condiciones utilizadas. Probablemente, este material está constituido por alguna especie química, como  $\text{SiO}_2$ , que necesitaría la presencia de HF para poder ser digerida. Sin embargo, este ácido no es compatible con las partes de vidrio y cuarzo del sistema de introducción de muestras, por lo que se decidió eliminar los residuos sólidos mediante filtrado con filtros de jeringa de PVDF hidrofílico con un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  o 0,45  $\mu\text{m}$  OlimPeak de Teknokroma.

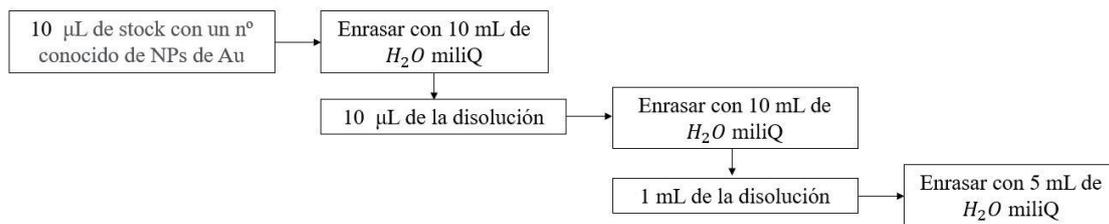
### 2.4. Cuantificación de nanopartículas mediante SP-ICP-MS

Gracias a la alta sensibilidad del ICP-MS esta técnica permite, bajo ciertas condiciones, el análisis de nanopartículas individuales. Cuando se introduce una suspensión de nanopartículas suficientemente diluida, cada nanopartícula individual genera una nube de iones al llegar al plasma, que alcanza el detector en un periodo de tiempo muy corto. Si el tiempo de integración utilizado en la medida es lo suficientemente corto, el ICP-MS es capaz de detectar cada una de las nubes de iones que provienen de cada una de las nanopartículas individuales de la muestra como un pico muy intenso de muy corta duración, que se denomina evento o “spike”. La frecuencia de estos eventos es proporcional a la concentración en número de nanopartículas en la muestra. La intensidad de cada uno de estos eventos es proporcional a la masa del elemento en cada partícula. La intensidad del fondo continuo es proporcional a la concentración del elemento en la muestra en forma iónica (no nanoparticulada).

La proporcionalidad entre la intensidad de los eventos y la masa de elemento por nanopartícula se establece mediante una recta de calibrado utilizando patrones del elemento de concentración conocida. Para ello, es necesario saber la cantidad de elemento que llega al plasma

de cada patrón. Dado que el transporte de los patrones se ve afectado por la eficacia de transporte, el valor de esta debe ser calculado y corregido [27].

La eficiencia de transporte se calcula analizando un stock de nanopartículas de oro con una concentración conocida. Se hacen 3 diluciones seriadas, donde la última es la que se introduce en el ICP-MS. Se miden triplicados de la dilución preparada, cuya concentración final es de 30000 NPs de Au/mL. En la *Figura 1* se exponen los pasos seguidos para preparar la dilución que se mide.



*Figura 2: Pasos seguidos para la preparación de la disolución para la medida de la eficiencia de transporte*

En primer lugar, se realizaron medidas de los elementos Al, Zn, Au y Ti. En esta primera aproximación, solo se encontraron eventos de Al y Ti, por lo que fueron estos los elementos elegidos para la caracterización.

Para la preparación de los patrones de calibrado se prepararon disoluciones intermedias de los stocks de 1000 ppm de cada elemento, y se diluyeron a 1 ppm. Las concentraciones de cada elemento en los cuatro puntos se muestran en la *Tabla 4*. Se filtró previamente el stock de Ti con un filtro de 3KDa de Sigma Aldrich, ya que tras un screening inicial se observó que contenía un gran número de eventos por sí solo, por lo que las concentraciones que se recogen en la tabla para este elemento son aproximadas.

Punto	Al (ppb)	Ti (ppb)
1	0.00	0.00
2	0.10	5.00
3	0.17	10.00
4	0.25	15.00

*Tabla 4: Resumen de las concentraciones del calibrado para medir las NPs de las muestras estudiadas*

En la recta de calibrado se comparan las intensidades (CPS) que devuelve el SP-ICP-MS con los femtogramos de los puntos del calibrado preparados a partir de las disoluciones intermedias de cada elemento. La pendiente del calibrado se emplea para convertir la intensidad de cada elemento obtenido por SP-ICP-MS en la masa del elemento por NP a través de la *Ecuación 1* [28].

$$m = \frac{\eta \cdot f \cdot dt \cdot I}{b}$$

*Ecuación 1: Ecuación empleada para calcular la masa del elemento por NP*

Siendo  $\eta$  es la eficiencia de transporte,  $f$  es el flujo de introducción de la muestra,  $dt$  es el tiempo de integración (*dwel time*),  $I$  es la intensidad neta del evento y  $b$  es la pendiente de la recta de calibrado.

Una vez obtenido estos datos (fg/NP) mediante la *Ecuación 2* [28] y asumiendo que las partículas son esféricas, se puede estimar el diámetro de las mismas.

$$d_p = \sqrt[3]{\frac{6 \times m_p}{\pi \times \rho} \times 10^6}$$

*Ecuación 2: Ecuación que relaciona diámetro de la NPs con su masa y densidad del elemento*

Siendo  $d_p$  el diámetro de la partícula en nanómetros,  $m_p$  la masa de las partículas en femtogramos y  $\rho$  la densidad de la partícula en g/cm<sup>3</sup>.

Las masas de las partículas se obtienen mediante un procedimiento iterativo que consiste en seleccionar todos los puntos obtenidos por SP-ICP-MS que son tres veces la desviación estándar por encima de la media. La media previamente se calculó con el conjunto completo de datos. Los datos restantes se someten de nuevo al mismo procedimiento y, así sucesivamente hasta que no queden valores por encima de la media más tres veces la desviación estándar [29].

#### **2.4.1. Preparación de las muestras para SP-ICP-MS**

Para el análisis de nanopartículas se preparó una disolución 0,1% de SDS [2], pesando 0,5g de SDS y se enrasó con H<sub>2</sub>O miliQ hasta los 50 mL. Esta disolución se filtró utilizando un tamaño de poro 3 KDa con los filtros “Centrifugal Filter Units for concentration and purification of biological solutions” de Sigma Aldrich, con ayuda de una centrifuga durante 5 minutos a 10000 rpm.

A continuación, se pesaron triplicados de 0,2 g de la muestra de spray y 0,1 g de la muestra de sombra de ojos, enrasando hasta 10 mL con la disolución de SDS. Estos tubos se llevaron a sonicar durante 30 minutos en un baño de ultrasonidos de Selecta.

#### **2.4.2. Diluciones de las muestras**

Las muestras seleccionadas para el análisis de las nanopartículas fueron el spray y la sombra de ojos, ya que tras hacer un screening no se observaron cambios significativos en la crema solar respecto al blanco. Antes de introducirlas al SP-ICP-MS se prepararon las siguientes diluciones, enrasando con H<sub>2</sub>O miliQ.

- Para el spray 1/1000
- Para la sombra de ojos 1/10000

## **2.5. Microscopio electrónico de transmisión (TEM)**

Como confirmación de los resultados obtenidos por SP-ICP-MS, el tamaño y la morfología de las NPs se estudió mediante un microscopio electrónico de transmisión (TEM). Este microscopio utiliza un haz de electrones que van a alta velocidad. Estos electrones atraviesan la muestra, la cual se encuentran en condiciones de alto vacío. En función de la transparencia a este haz, las diferentes estructuras presentes en una muestra absorberán y/o dispersarán más o menos los electrones, haciendo que la imagen sea más oscura en las zonas donde se transmiten menos, como, por ejemplo, donde haya una nanopartícula, permitiendo así su visualización. [15], [30]

Para la preparación de las muestras que se observaron al TEM el procedimiento fue igual que para la extracción de las nanopartículas y, en este caso no se prepararon diluciones, sino que se utilizaron las muestras obtenidas tras sonicar y filtrar.

## **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.1. Concentración total iónica**

#### **3.1.1. Optimizaciones de las condiciones de la digestión**

- Temperatura

Primeramente, el proceso se intentó como está descrito en el artículo [2], pero una de las muestras, en concreto la de sombra de ojos, la digestión no se llegó a completar del todo, quedando restos sólidos y un color marrón (debido a los óxidos de hierro que contiene [3]) y por tanto, causando la obstrucción del sistema de introducción de muestra. Por ello, se intentó otro programa con temperaturas más altas. Para la sombra de ojos se obtuvo un líquido de color blanquecino, un poco turbio y con la purpurina aun sin digerir, para la crema solar un líquido amarillento y para el spray un líquido incoloro con purpurina sin digerir.

- Filtración de las muestras

Como se menciona en el apartado anterior, la purpurina de las muestras no lograba solubilizarse por completo con los reactivos empleados, ya que su composición principal, seguramente sea óxido de silicio y este solo se digiere con ácido fluorhídrico. Se decidió no utilizar este ácido, ya que podía dañar el sistema de introducción de muestra del ICP-MS, por lo que se incluyó un paso de filtrado para eliminar el residuo sólido en estas muestras. Este paso implica que puedan perderse algunas nanopartículas en el proceso, aunque la intención de este trabajo no era obtener resultados cuantitativos.

### 3.1.2. Calibrado

Se calcularon las ppb reales de Al, Ti, Zn y Au en cada punto de calibrado, teniendo en cuenta las diluciones realizadas.

El ICP-MS devuelve intensidades (CPS), comparando las CPS con las concentraciones reales de cada elementos en los puntos se obtienen las rectas de calibrado, mostradas en la *Tabla 5*.

Elemento	Ordenada en el origen (CPS)	Sensibilidad (ppb/CPS)	R2
Al	-2925.51	610631.11	0.96
Ti	-6052.30	61931.00	0.99
Zn	+66867.00	86813.00	0.99
Au	-78028.00	96124.00	0.98

*Tabla 5: Parámetros de las rectas de calibrado para los distintos elementos*

Una vez se tuvieron las ecuaciones de los calibrados, para calcular las concentraciones reales de cada elemento, se sustituyeron las CPS obtenidas para cada muestra en la respectiva ecuación de calibrado y teniendo en cuenta las diluciones realizadas anteriormente, se obtuvo la concentración total iónica en la muestra. El blanco de reacción se tuvo en cuenta para corregir la contribución de los reactivos a las medidas.

### 3.1.3. Aluminio

Las concentraciones obtenidas para el aluminio se muestran en la *Tabla 6*.

	Media (ppm)	Desviación estándar (ppm)
Spray	15.52	± 1.46
Crema solar	0.18	± 0.03
Sombra de ojos	3191.98	± 182.52

*Tabla 6: Concentraciones de Al obtenidas por totales en ICP-MS en las muestras estudiadas*

El aluminio de la sombra de ojos probablemente provenga de la mica y la concentración sea tan alta ya que el aluminio actúa como agente absorbente, dando un aspecto más liso y regular al párpado, propiedad muy importante al hablar de este tipo de productos.

El spray tiene también cierta cantidad de aluminio que probablemente proceda de la fluorflogopita sintética, es decir la mica sintética [31].

La mica son minerales que forman parte de un grupo numeroso de silicatos de alúmina, hierro, calcio, magnesio y minerales alcalinos que se caracterizan por su fácil descamación en finas láminas flexibles, elásticas y brillantes [32].

El aluminio de la crema solar probablemente provenga o del agua que forma el propio producto o de la matriz en la que están preparadas las disoluciones, ya que el aluminio no forma parte de ninguno de sus ingredientes.

### 3.1.4. Titanio

Las concentraciones obtenidas para el titanio se muestran en la *Tabla 7*.

	<b>Media (ppm)</b>	<b>Desviación estándar (ppm)</b>
Spray	29.60	± 2.03
Crema solar	0.31	± 0.19
Sombra de ojos	284.05	± 7.18

*Tabla 7: Concentraciones de Ti obtenidas por totales en ICP-MS en las muestras estudiadas*

El titanio se encuentra en siete isótopos (44, 45, 46, 47, 48, 49, 50), siendo el 48 el más abundante con un 73.94%, seguido del 46 con un 7.93% [33].

Tanto en la sombra de ojos como en el spray en la etiqueta se indica que contienen TiO<sub>2</sub>, por eso se puede explicar sus concentraciones más elevadas respecto a la crema solar, que apenas contiene titanio y no figura entre sus ingredientes. En estos productos el dióxido de titanio se puede utilizar como tinte blanco. Aunque hay estudios que afirman que en el caso tanto de polvos sueltos, como es la sombra de ojos y en aerosoles como el spray, que al ser inhalado puede provocar toxicidad e inflamación pulmonar, incluso cáncer [34]. El Comité científico de Seguridad de los Consumidores (CCSC) adoptó medidas en cuanto al dióxido de titanio inhalable en polvo con una concentración del 1% o más en partículas con un tamaño inferior o igual a 10 µm. Se dictó que es seguro en productos faciales en forma de polvos sueltos hasta una concentración máxima del 25% y en productos del cabello en forma de spray con una concentración máxima del 1,4%. En cuanto al uso profesional en forma de spray del mismo, es seguro en una concentración máxima del 1,1% [35].

En cuanto a la crema solar, el titanio quizá provenga o del agua del propio producto o de la matriz con la que se prepararon las disoluciones.

### 3.1.5. Zinc

Las concentraciones obtenidas para el zinc se muestran en la *Tabla 8*.

	<b>Media (ppm)</b>	<b>Desviación estándar (ppm)</b>
Spray	190.10	± 4.09
Crema solar	1.00	± 0.09
Sombra de ojos	3859.90	± 641.12

*Tabla 8: Concentraciones de Zn obtenidas por totales en ICP-MS en las muestras estudiadas*

El zinc tiene 11 isótopos, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 69, 70, y 72, siendo el más abundante el 64 con un 48.6%, seguido del 66 con un 27.9% [36].

La alta concentración de zinc en la sombra de ojos se puede explicar ya que contiene extracto de raíz de *Camelia sinensis*, planta de la cual provienen tés como el negro, verde, oolong y blanco. Se compone de catequinas, cafeína, L-teanina y entre otros el zinc [37]. Esta planta en cosmética se utiliza como antioxidante y además de combatir los radicales libres inducidos por las radiaciones UV, también actúa como antiinflamatorio, inhibiendo la acción de la colagenasa, ayudando a mantener la firmeza y elasticidad de la piel [38].

En el caso del spray la concentración de zinc quizás provenga del extracto de raíz de *Beta vulgaris* (remolacha) ya que esta contiene hierro, calcio, fosforo, potasio, sodio y zinc [39]. La remolacha actúa como un humectante natural, la cual hidrata de manera inmediata y a largo plazo la piel [40].

En el caso de la crema solar el zinc tiene una concentración muy baja por lo que puede que provenga del agua del propio producto o de la matriz con la que se prepararon las disoluciones.

### 3.1.6. Oro

Las concentraciones obtenidas para el oro se muestran en la *Tabla 9*.

	<b>Media (ppm)</b>	<b>Desviación estándar (ppm)</b>
Spray	6.23	± 1.05
Crema solar	0.73	± 0.03
Sombra de ojos	777.41	± 36.11

*Tabla 9: Concentraciones de Au obtenidas por totales en ICP-MS en las muestras estudiadas*

En cuanto al oro solo tiene un isótopo estable, el 197 y, 36 radioisótopos sintetizados [41]. En este caso, sorprende la elevada concentración de oro obtenida, especialmente, en la sombra de ojos, ya que en ninguno de los productos estudiados se menciona como ingrediente el oro ni

ningún compuesto con él. Sin embargo, el oro, o alguna sal áurea, podrían estar presentes en el caso de la sombra de ojos como parte de los pigmentos que no se especifican en la composición. En cualquier caso, convendría repetir las medidas para confirmar este resultado.

Por lo tanto, como vemos en todas las tablas, las muestras donde el elemento estudiado viene indicado en sus ingredientes contienen una mayor concentración del mismo, a excepción del oro. Destaca la sombra de ojos en cuanto a la elevada concentración en todos los elementos, esto quizás se deba a que, al ser un producto en polvo, los compuestos se encuentren más concentrados.

### 3.2. Extracción y caracterización de nanopartículas

En el apartado anterior, se estudió el contenido total de los elementos sin poner atención a su estado físico, ya que se llevó a cabo una digestión total de las muestras previa a la medida. En este caso, se estudió la presencia de nanopartículas formadas por los mismos metales que se cuantificaron previamente, y solo fue posible detectar nanopartículas conteniendo Al y Ti.

#### 3.2.1. Optimizaciones de las condiciones de extracción

- Filtración de la disolución de SDS y stock de titanio

Al llevar a cabo las primeras pruebas con el protocolo de referencia [2], se observó que tanto la disolución de SDS como el patrón de titanio tenían una elevada contaminación en forma de nanopartículas de titanio. Por ello, se añadió un paso de filtración para ambos reactivos como se detalla en el apartado de “Material y Métodos”.

#### 3.2.2. Eficacia de transporte y calibrado

Para la eficacia de transporte se obtuvo un valor de  $42.94\% \pm 7.55\%$  y las rectas de calibrado se muestran en la *Tabla 10*.

Elemento	Ordenada en el origen (CPS)	Sensibilidad (fg Al)	R2
Al	+76.34	4808.90	0.91
Ti	-107.23	1009.10	0.99

*Tabla 10: Parámetros de las rectas de calibrado*

#### 3.2.3. Aluminio

En el estudio de las NPs de aluminio, la densidad del  $Al_2O_3$  es de  $3,97 \text{ g/cm}^3$ . En este caso solo se vieron NPs en las muestras de sombra de ojos y spray. En el caso de la crema solar, el blanco de reacción tenía un número de eventos muy similar por lo que se concluye que no contiene nanopartículas de aluminio o que no son detectables con el sistema empleado por la contribución de los blancos [42]. En las *Figuras 2 y 4* se muestran las señales sin tratar obtenidas de las muestras de sombra de ojos y spray respectivamente, mientras que en las *Figuras 3 y 5*, se

muestran los histogramas donde se representa la frecuencia con la que se repiten los diámetros de las nanopartículas frente a los diámetros en nm para las muestras de sombra de ojos y spray respectivamente.

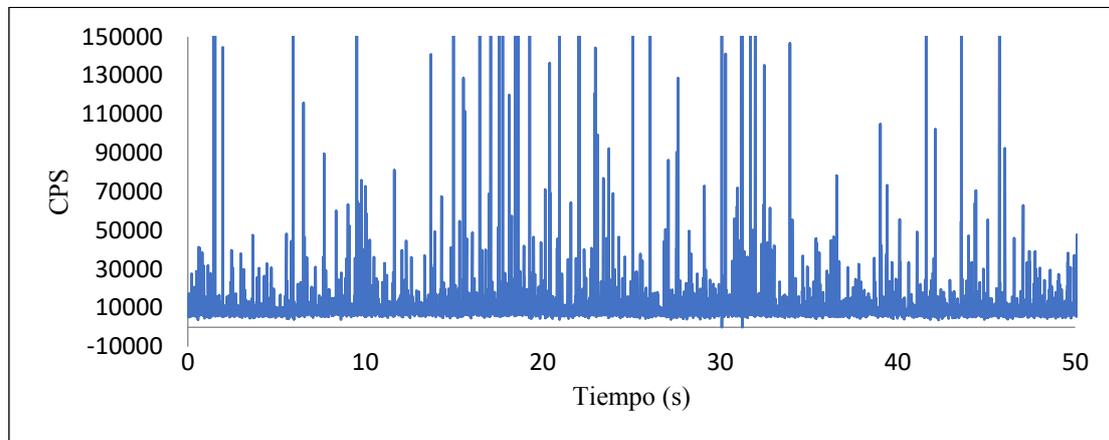


Figura 3: Señales sin tratar de aluminio para la muestra de sombra de ojos (dilución 1/10000)

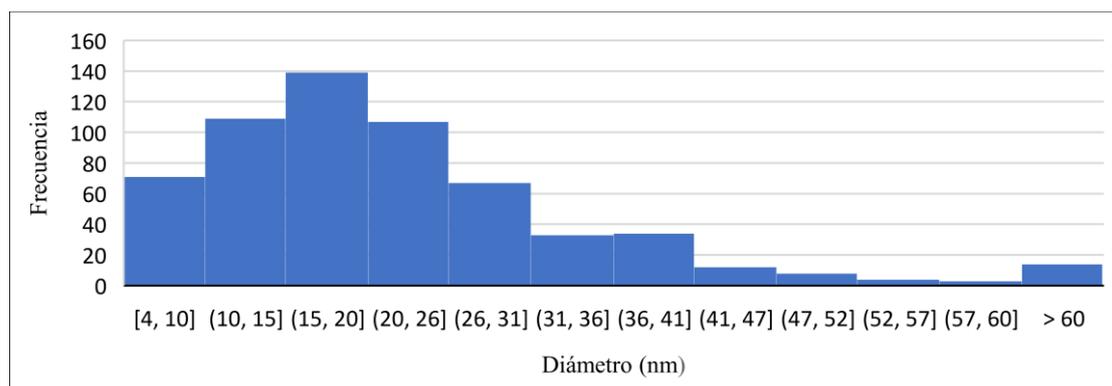


Figura 4: Histograma del diámetro de NPs de aluminio en la muestra de sombra de ojos (dilución 1/10000)

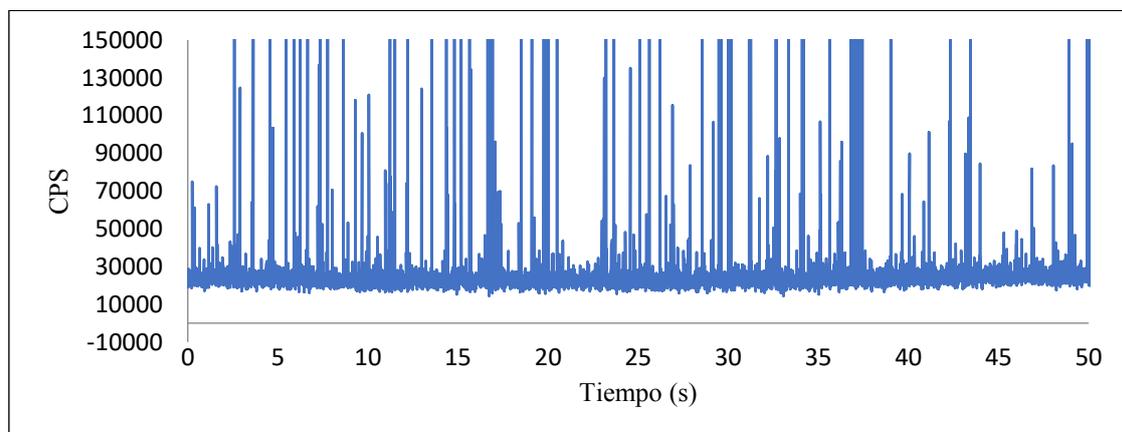


Figura 5: Señales sin tratar de aluminio para la muestra de spray (dilución 1/1000)

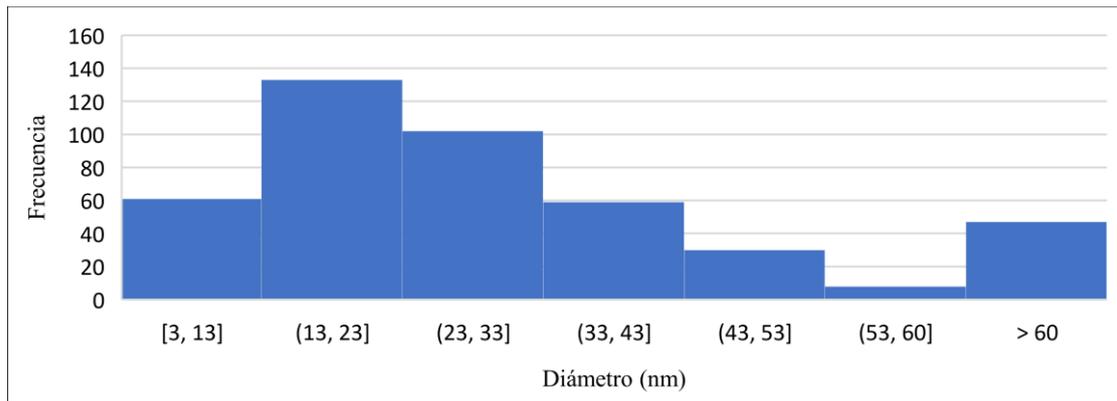


Figura 6: Histograma del diámetro de NPs de aluminio en la muestra de spray (dilución 1/1000)

En ambas gráficas, tanto para la sombra como para el spray el diámetro de las NPs observadas es muy similar. Para el caso de la sombra de ojos la media de los diámetros es de  $22 \text{ nm} \pm 12.70 \text{ nm}$ . Para el caso del spray, la media es de  $32 \text{ nm} \pm 22.38 \text{ nm}$ . Los resultados obtenidos concuerdan con la bibliografía donde se indica que el diámetro está entre 20-120 nm [43].

### 3.2.4. Titanio

En el estudio de las NPs de titanio, la densidad del  $\text{TiO}_2$  es de  $4,1 \text{ g/cm}^3$ . Solo se pudo detectar la presencia de las mismas en las muestras de sombra de ojos y spray. Al analizar los eventos tanto del blanco de reacción como la crema solar se vio que el número de eventos era muy similar, por lo que se concluye la ausencia de NPs de titanio en esta muestra [44]. En las Figuras 6 y 8 se muestran las señales sin tratar obtenidas de las muestras de sombra de ojos y spray respectivamente, mientras que en las Figuras 7 y 9, se muestran los histogramas de los diámetros obtenidos para las muestras de sombra de ojos y spray respectivamente.

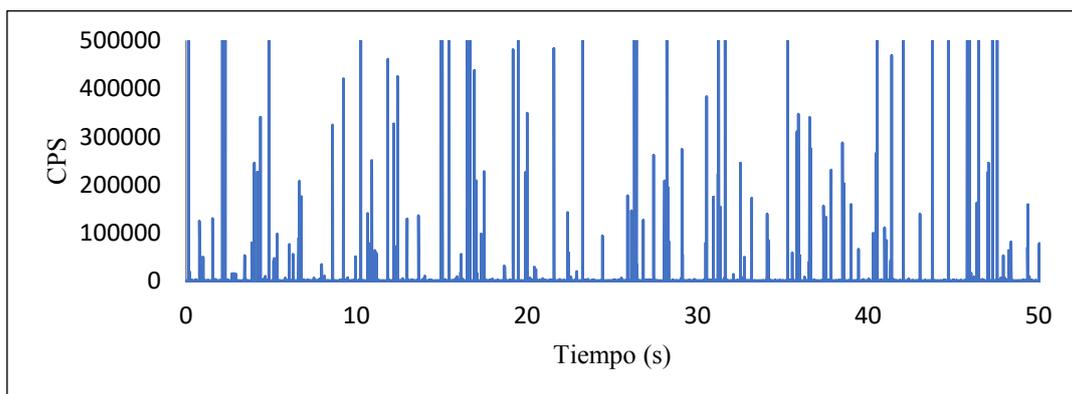


Figura 7: Señales sin tratar de titanio para la muestra de sombra de ojos (dilución 1/10000)

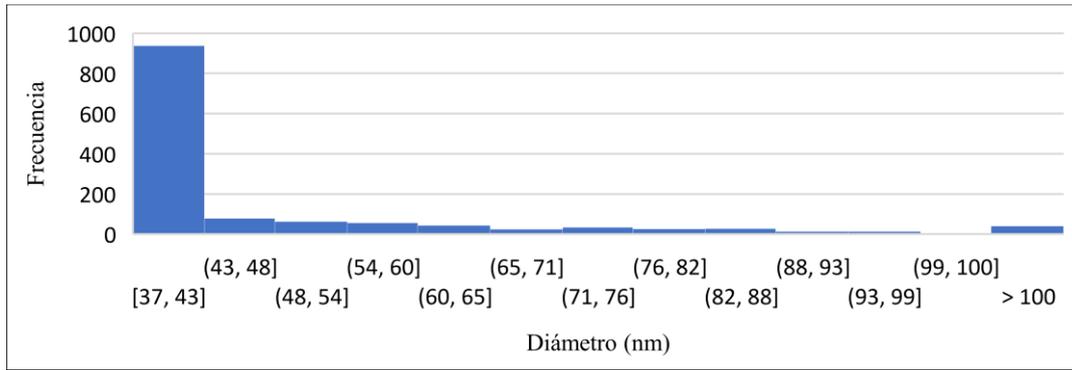


Figura 8: Histograma del diámetro de NPs de titanio en la muestra de sombra de ojos (dilución 1/10000)

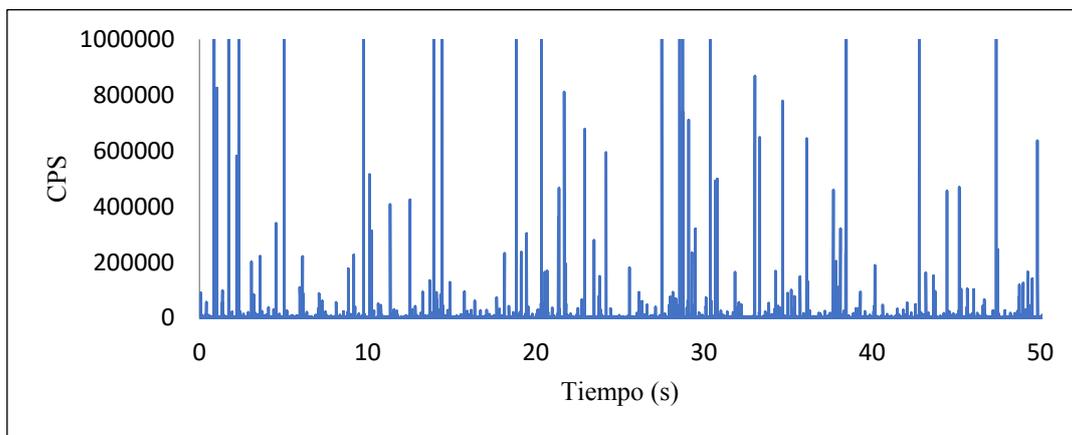


Figura 9: Señales sin tratar de titanio para la muestra de spray (dilución 1/1000)

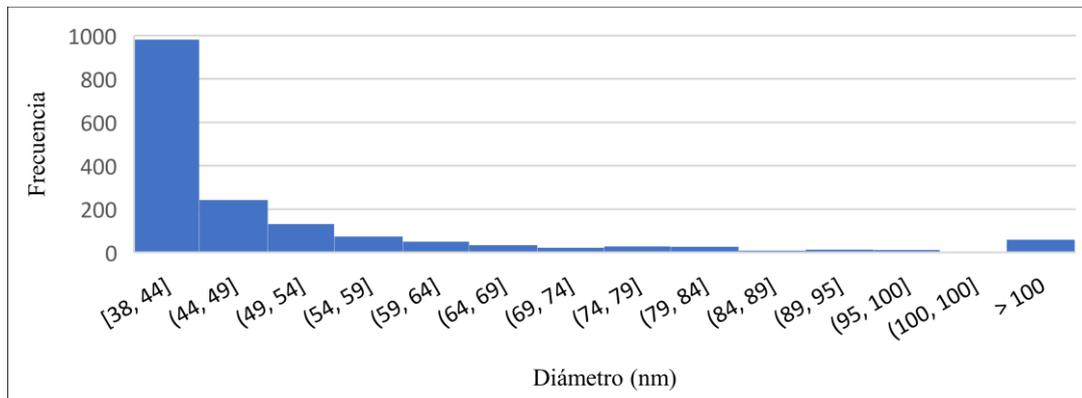


Figura 10: Histograma del diámetro de NPs de titanio en la muestra de spray (dilución 1/1000)

Para el caso de la sombra de ojos la media de los diámetros de las NPs es de  $47 \text{ nm} \pm 17.61 \text{ nm}$ . En la muestra del spray los diámetros de las NPs de titanio tienen una media de  $49 \text{ nm} \pm 17.48 \text{ nm}$ .

Según el tamaño obtenido y relacionándolo con la bibliografía encontrada las NPs podrían encontrarse en forma de agregados, a pesar de los pasos de sonicación aplicados durante la

extracción. En el artículo [19] se menciona que los agregados es la forma física más común en la que podemos encontrar estas partículas.

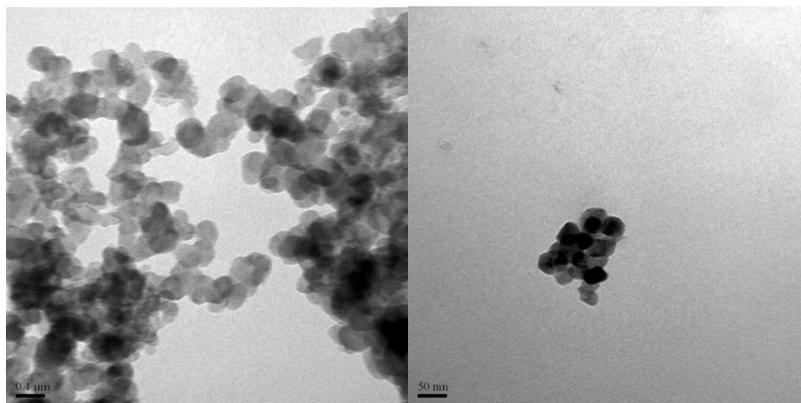
### 3.3. Microscopio electrónico de transmisión (TEM)

En la *Figura 11* a la izquierda con un escala de 1  $\mu\text{m}$ , se observa que el tamaño de las nanopartículas aisladas está en torno a 50 nm, las cuales podrían corresponder según los resultados obtenidos para el titanio en SP-ICP-MS y en la misma figura a la derecha con una escala de 50 nm, las NPs aisladas observadas tienen un diámetro aproximadamente de 25 nm las cuales según tamaño determinado por SP-ICP-MS, podrían corresponderse con NPs de aluminio. A pesar de la coincidencia de tamaños, que podrían permitir asignarlas a cada uno de los elementos, se puede observar que ambas tienen una tendencia a agregarse, siendo poco frecuente encontrar nanopartículas aisladas.

Lo mismo ocurre en la *Figura 12* que corresponde a la muestra de sombra de ojos, a la izquierda con una escala de 50 nm, se observan NPs aisladas de un diámetro aproximadamente de 20 nm que según el tamaño corresponderían con NPs de aluminio. A la derecha con una escala de 50 nm en la parte superior, se observan NPs de mayor diámetro y en la parte inferior unas de menor diámetro que según el tamaño podrían ser de titanio y aluminio respectivamente.

Además, se observa que la mayoría se encuentran formando agregados, la cual es la forma física más común en la que los podemos encontrar [19].

No se puede asegurar que estas nanopartículas sean efectivamente de titanio y aluminio, para ello, se tendría que realizar más pruebas como TEM de alta resolución, que además de dar información sobre el tamaño de las mismas, también se puede proporcionar información sobre su composición mediante la dispersión de rayos X.



*Figura 11: A la izquierda nanopartículas en la muestra de spray con 100000X aumentos con una escala de 1  $\mu\text{m}$ ; a la derecha nanopartículas en la muestra de spray con 200000X aumentos con una escala de 50 nm*

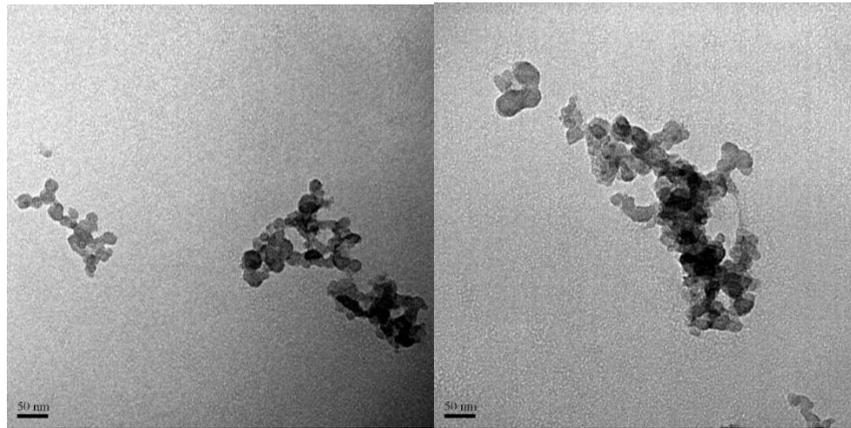


Figura 12: A la izquierda nanopartículas en la muestra de sombra de ojos con 2000000X aumentos con una escala de 50 nm; a la derecha nanopartículas en la muestra de sombra de ojos con 200000X aumentos con una escala de 50 nm

#### 4. CONCLUSIONES

Como conclusión de este trabajo se confirma la presencia de algunos metales en muestras cosméticas como el Al, Ti, Zn o Au a nivel de trazas que pudieron ser detectados con la técnica ICP-MS después de la dispersión ácida de la misma. Es de destacar que solo parte de la muestra pudo ser puesta en disolución sin el empleo de HF que es un ácido altamente corrosivo. Se pudo observar que parte de estos metales se encuentran en forma de nanopartículas como se pudo ver mediante SP-ICP-MS. No se puede asegurar que estas nanopartículas detectadas por TEM correspondan exactamente a las de los metales propiamente estudiados. Para ello, se tendría que hacer otro tipo de pruebas como el TEM de alta resolución para conocer la composición de las mismas.

Es importante que este tema se siga estudiando y controlando de una manera cuidadosa, los productos que salen al mercado. Por ejemplo, en la etiqueta de la muestra de spray se indica que contiene dióxido de titanio, pero no que estén en forma de nanopartículas y, al ser un producto tanto como para cuerpo como para cabello, estas podrían llegar a los pulmones. Aunque como se menciona anteriormente, al no superar la concentración considerada peligrosa no supondría un riesgo para la salud de las personas.

#### 5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ministerio de Sanidad y Consumo, «Real Decreto 1599/1997, de 17 de octubre, sobre productos cosméticos», vol. 261, pp. 31486-31513, 1997. <https://www.boe.es/eli/es/rd/1997/10/17/1599> (accedido 12 de junio de 2023).
- [2] I. de la Calle, M. Menta, M. Klein, y F. Séby, «Screening of TiO<sub>2</sub> and Au nanoparticles in cosmetics and determination of elemental impurities by multiple techniques (DLS, SP-ICP-

- MS, ICP-MS and ICP-OES», *Talanta*, vol. 171, pp. 291-306, ago. 2017, doi: 10.1016/j.talanta.2017.05.002 (accedido 12 de junio de 2023).
- [3] S. Borowska y M. M. Brzóška, «Metals in cosmetics: implications for human health», *J. Appl. Toxicol. JAT*, vol. 35, n.º 6, pp. 551-572, jun. 2015, doi: 10.1002/jat.3129 (accedido 12 de junio de 2023).
- [4] Lesielle, «ÓXIDO DE CROMO VERDE». <https://www.lesielle.com/es/ci-77288-que-es-en-cosmetica-inci-434> (accedido 22 de junio de 2023).
- [5] Parlamento Europeo y Consejo, «Reglamento (CE) n.º 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de noviembre de 2009, sobre los productos cosméticos (versión refundida) (Texto pertinente a efectos del EEE)», vol. 342, 2009. <http://data.europa.eu/eli/reg/2009/1223/oj/spa> (accedido 29 de junio de 2023).
- [6] CEIBA, «Óxidos de hierro en cosmética», *Ceiba Essentials*, 25 de enero de 2022. <https://beceiba.com.mx/blogs/express-your-green-side/oxidos-de-hierro-en-cosmetica> (accedido 22 de junio de 2023).
- [7] Comisión Europea, «Directiva 95/45/CE de la Comisión, de 26 de julio de 1995, por la que se establecen criterios específicos de pureza en relación con los colorantes utilizados en los productos alimenticios», vol. 226, 1995. <http://data.europa.eu/eli/dir/1995/45/oj/spa> (accedido 29 de junio de 2023).
- [8] Industria Cosmética, «El cobre, el activo cosmético que quiere competir con el retinol». <https://www.industriacosmetica.net/noticias/el-cobre-el-activo-cosmetico-que-quiere-competir-con-el-retinol-ZkVda> (accedido 22 de junio de 2023).
- [9] P. Ruiz Aparicio, «Contenido de metales pesados en champús: Revisión», 2020 (accedido 22 de junio de 2023).
- [10] A. Míguez Burgos, «Recuerdo anatómico de la piel. Estructura y funciones», 2012. <https://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/4425/1/Recuerdo-anatomico-de-la-piel.-Estructura-y-funciones> (accedido 12 de junio de 2023).
- [11] W. Gallegos, M. Vega, y P. Noriega, «Espectroscopía de absorción atómica con llama y su aplicación para la determinación de plomo y control de productos cosméticos.», *LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida*, vol. 15, n.º 1, pp. 18-25, 2012. (accedido 12 de junio de 2023).
- [12] G. L. Guerra Rodríguez, «Determinación de la concentración de plomo por el método espectrofotometría de absorción atómica en cosméticos para el área de los ojos (sombas), que se comercializan en el Distrito Metropolitano de Quito», 2020 (accedido 12 de junio de 2023).
- [13] CSIC, «Espectroscopía de Emisión Atómica ICP-OES». 2019 (accedido 12 de junio de 2023).
- [14] W. Najahi-Missaoui, R. D. Arnold, y B. S. Cummings, «Safe Nanoparticles: Are We There Yet?», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, n.º 1, Art. n.º 1, ene. 2021, doi: 10.3390/ijms22010385 (accedido 12 de junio de 2023).

- [15]C. Contado, «Nanomaterials in consumer products: a challenging analytical problem», vol. 3, 2015, doi: <https://doi.org/10.3389/fchem.2015.00048> (accedido 12 de junio de 2023).
- [16]N. Joudeh y D. Linke, «Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists», *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 20, n.º 262, 2022. <https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-022-01477-8> (accedido 3 de julio de 2023).
- [17]H. A. López Muñoz, «Síntesis y aplicación de un nanocompósito de quitosano-glicidil metacrilato-colágeno tipo I y nanopartículas de oro sobre la cicatrización de heridas cutáneas», doctoralThesis, Tesis (D.C.)-Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. Programa Multidisciplinario de Nanociencias y Nanotecnología, 2022. <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/4230> (accedido 12 de junio de 2023).
- [18]A. Baraya Martínez y C. A. Mejía Pavoni, «Estudio del comportamiento de un dentífrico que contiene óxido de aluminio hidratado (alúmina) como sustancia abrasiva sobre el esmalte dental», *Rev. Estomatol.*, vol. 1, n.º 1, Art. n.º 1, 1991, doi: 10.25100/re.v1i1.5360 (accedido 12 de junio de 2023).
- [19]I. Torellas Hidalgo, «Vista de La exposición al aluminio y su relación con el ambiente y la salud». <https://revistas.udistrital.edu.co/index.php/tecges/article/view/5646/7164> (accedido 12 de junio de 2023).
- [20]S. L. Schneider y H. W. Lim, «A review of inorganic UV filters zinc oxide and titanium dioxide», *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, vol. 35, n.º 6, pp. 442-446, nov. 2019, doi: 10.1111/phpp.12439 (accedido 12 de junio de 2023).
- [21]C. Contado y A. Pagnoni, «TiO<sub>2</sub> in Commercial Sunscreen Lotion: Flow Field-Flow Fractionation and ICP-AES Together for Size Analysis», *Anal. Chem.*, vol. 80, n.º 19, pp. 7594-7608, oct. 2008, doi: 10.1021/ac8012626 (accedido 12 de junio de 2023).
- [22]C. Botta *et al.*, «TiO<sub>2</sub>-based nanoparticles released in water from commercialized sunscreens in a life-cycle perspective: Structures and quantities», *Environ. Pollut.*, vol. 159, n.º 6, pp. 1543-1550, jun. 2011, doi: 10.1016/j.envpol.2011.03.003 (accedido 12 de junio de 2023).
- [23]B. Fadeel y A. E. Garcia-Bennett, «Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications - ScienceDirect». <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X09003469?via%3Dihub> (accedido 22 de junio de 2023).
- [24]Universidad de Burgos, «Espectrometría de Masas de Plasma (ICP-MS)». <https://www.ubu.es/parque-cientifico-tecnologico/servicios-cientifico-tecnicos/espectrometria/espectrometria-de-masas-de-plasma-icp-ms> (accedido 22 de junio de 2023).

- [25]R. Thomas, «A Beginner's Guide to ICP-MS. Part I», *SPECTROSCOPY*, vol. 16, n.º 4, pp. 38-42 (accedido 22 de junio de 2023).
- [26]Milestone S.r.l., «ETHOS 1 - Advanced Microwave Digestion Labstation ( Milestone S.r.l. ) | EVISA's Instruments Database». <https://speciation.net/Database/Instruments/Milestone-Srl/ETHOS-1--Advanced-Microwave-Digestion-Labstation-;i2574> (accedido 25 de abril de 2023).
- [27]D. M. Mitrano, A. Barber, A. Bednar, P. Westerhoff, C. P. Higgins, y J. F. Ranville, «Silver nanoparticle characterization using single particle ICP-MS (SP-ICP-MS) and asymmetrical flow field flow fractionation ICP-MS (AF4-ICP-MS)», *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 27, n.º 7, pp. 1131-1142, jul. 2012, doi: 10.1039/C2JA30021D (accedido 22 de junio de 2023).
- [28]P. García Cancela, N. González Quiñónez, M. Corte-Rodríguez, J. Bettmer, A. Manteca, y M. Montes-Bayón, «Evaluation of copper uptake in individual spores of *Streptomyces coelicolor* and endogenic nanoparticles formation to modulate the secondary metabolism», *Oxf. Acad.*, vol. 14, n.º 3, 2022. <https://academic.oup.com/metallomics/article/14/3/mfac015/6541869> (accedido 29 de junio de 2023).
- [29]B. Gomez-Gomez, M. Corte-Rodríguez, M. T. Perez-Corona, J. Bettmer, M. Montes-Bayón, y 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*, vol. 1128, pp. 116-128, sep. 2020, doi: 10.1016/j.aca.2020.06.058 (accedido 22 de junio de 2023).
- [30]Universidad Autónoma de Madrid, «Unidad de Microscopía. Laboratorio de Microscopía Electrónica de Transmisión». <https://www.uam.es/uam/sidi/unidades-de-analisis/unidad-microscopia/microscopia-electronica-transmision> (accedido 14 de junio de 2023).
- [31]INCI Beauty, «SYNTHETIC FLUORPHLOGOPITE (Mica de synthèse)». <https://incibeauty.com/ingredients/16210-synthetic-fluorphlogopite> (accedido 12 de junio de 2023).
- [32]Lumitos, «Mica». <https://www.quimica.es/enciclopedia/Mica.html> (accedido 12 de junio de 2023).
- [33]EducaMadrid, «Titanio». <http://herramientas.educa.madrid.org/tabla/7isotopos/ti7.html> (accedido 12 de junio de 2023).
- [34]GreenFacts, «Protectores solares con dióxido de titanio en forma de nanopartículas. ¿Un riesgo para la salud?», 2014. <https://copublications.greenfacts.org/es/titanio-nanoparticulas/index.htm> (accedido 12 de junio de 2023).
- [35]Comisión Europea, «Reglamento (UE) 2021/850 de la Comisión de 26 de mayo de 2021 por el que se modifica y corrige el anexo II y se modifican los anexos III, IV y VI del Reglamento

- (CE) nº 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre los productos cosméticos.»  
<https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2021-80676> (accedido 22 de junio de 2023).
- [36]EducaMadrid, «Zinc». <http://herramientas.educa.madrid.org/tabla/7isotopos/zn7.html>  
(accedido 12 de junio de 2023).
- [37]Healthline, «Camellia sinensis Leaf Extract: Benefits, Uses, and Side Effects».  
<https://www.healthline.com/nutrition/camellia-sinensis-leaf-extract#skin-health> (accedido 12 de junio de 2023).
- [38]Freshly Cosmetics, «Té Verde». <https://www.freshlycosmetics.com/es/glosario-de-ingredientes/camellia-sinensis-leaf-extract> (accedido 12 de junio de 2023).
- [39]E. Abdo, S. El-Sohaimy, O. Shaltout, A. Abdalla, y A. Zeitoun, «Nutritional Evaluation of Beetroots (*Beta vulgaris* L.) and Its Potential Application in a Functional Beverage», *Plants*, vol. 9, n.º 12, p. 1752, dic. 2020, doi: 10.3390/plants9121752 (accedido 22 de junio de 2023).
- [40]INCI Decoder, «Beta Vulgaris Root Extract». <https://incidecoder.com/ingredients/beta-vulgaris-root-extract> (accedido 12 de junio de 2023).
- [41]deQuímica, «Oro (Au)». <https://dequimica.com/teoria/oro> (accedido 12 de junio de 2023).
- [42]INSST, «ICSC 0351 - ÓXIDO DE ALUMINIO», 2018.  
[http://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p\\_card\\_id=0351&p\\_version=2&p\\_lang=es](http://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_card_id=0351&p_version=2&p_lang=es)  
(accedido 12 de junio de 2023).
- [43]D. Marzón Solórzano, «Determinación de tamaños de nanopartículas metálicas mediante técnicas espectroscópicas y polarimétricas». Grupo de óptica. Departamento de Física Aplicada, 2012 (accedido 22 de junio de 2023).
- [44]INSST, «ICSC 0338 - DIÓXIDO DE TITANIO», 2018.  
[http://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p\\_card\\_id=0338&p\\_version=2&p\\_lang=es](http://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_card_id=0338&p_version=2&p_lang=es)  
(accedido 12 de junio de 2023).