



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Sensores y biosensores para evaluar la presencia de disruptores endócrinos

Giovanni Galietta Positano

Tesis de Doctorado

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Doctor en Química

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química Universidad de la
República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Diciembre 2023

Sensores y biosensores para evaluar la presencia de disruptores endócrinos

Tribunal:

Dra. Alicia Mollo (Presidenta)

Dra. Erlen Cruz

Dra. Ana María Castro Luna

Directores:

Dr. Eduardo Méndez, Director

Dr. Luis Alberto Panizzolo, Director

Aún restan espacios llenar,
aún restan golpes dar para partir la roca,
pero siento que golpes más, golpes menos, no se resistirá,
no será sin duda el último golpe el que la parta,
fueron muchos desvelos,
muchas frustraciones,
muchas ilusiones,
sin duda,
fueron cientos, miles, millones de golpes.

Así es el hilo conductor, tomado de la filosofía de un entrenador de básquet, Gregg Popovich, que a su vez lo tomó de otro, un periodista danés, Jacob Riis, que escribió: “Cuando nada parece ayudar, miro a un picapedrero golpeando una roca. Hasta 100 veces, sin que aparezca una sola grieta. Sin embargo, al golpe 101 la rompe en dos. Sé que no fue ese último golpe el que la partió, sino todos los anteriores”. Lejos, muy lejos estoy, de ese personaje de nuestra historia como el coach Pop. Pido perdón si ofendo al decir que tomé parte de su filosofía, lejos, muy lejos de eso, sólo quise expresar lo que he sentido, desde que todo comenzó al transitar este camino u otros que antes comencé a transitar y que me perdí en ellos.

A todos los que me ayudaron a dar los golpes,
a todos,
a los que ya no están físicamente,
pero siguen estando,
a los que aún están y tienen que seguir soportando
mis malhumores,
a todos,
les dedico este humilde trabajo.

Agradecimientos.

Como dijo Lao Tsé, “El agradecimiento es la memoria del corazón”, por lo tanto, pasando por el corazón de este largo camino, daré las gracias intentando recordar a todas aquellas personas que de forma muy diversa hicieron posible que esta tesis transcurriera y llegara a esta instancia.

En primer lugar, agradecer a mis dos directores:

Al Dr. Eduardo Méndez, sin él, esta tesis no hubiera tenido ni inicio ni final, un ser especial, sabio y humilde que me impulsó y levantó cada vez que fue necesario.

Al Dr. Luis Alberto Panizzolo, gracias por escucharme allá por el 2015 y darme para adelante para comenzar este camino, gracias por todo tu apoyo silencioso y constante.

Esta tesis tampoco hubiera tenido un final sin dos grandes personas: el Lic. Andrés Ansin, quién fue clave en todas las medidas llevadas adelante sobre plomo, gracias de corazón; y al Dr. Santiago Botasini, importante desde un inicio por sus aportes justos y necesarios en múltiples discusiones de resultados, además de sus aportes invaluable en los cursos que lo tuve como docente.

Agradecer a la Dra. Alicia Mollo, Dra. Ana María Castro Luna y a la Dra. Erlen Cruz, por participar tan amablemente del tribunal de esta tesis, gracias por su tiempo y dedicación.

A las instituciones: Pedeciba-Química, que financió mi pasantía en Panamá, así como la compra de reactivos, a la ANII y CSIC por la financiación de proyectos que hicieron posible la concreción de esta tesis.

A la MSc. Brenda Checa Orrego que me abrió las puertas tan gentilmente de sus laboratorios de Análisis de Residuos de Plaguicidas de la Dirección Nacional de Sanidad Vegetal del Ministerio de Desarrollo Agropecuario (MIDA) de Panamá para

poder llevar a cabo mi pasantía. Al Licenciado en Química Samuel Hernández, por su infinita paciencia y disponibilidad, además de transmitirme todo su conocimiento en la temática tanto de los inmunosensores desarrollados, así como en todo lo referente al LC-MS/MS durante mi pasantía en Panamá.

A mis amigos de la vida y de todas las épocas, gracias por estar siempre, acompañarme y hacerme más sencillo el camino, gracias Rosi, Adrián, Horacio, Fidel, Paolo, Juan, Leo, Sergio, el club de Omar (mi amado club del Tobi) y a las Lulis de "Cultura" (Fernanda... "la jefa", Laurita, Sole y Rocío) ... gracias totales.

A mis compañeros de Facultad de Agronomía que me han apoyado en momentos complejos, en especial a la Dra. Fernanda Zaccari y la Dra. María Cristina Cabrera, gracias. Al MSc. Pablo Cracco, a la Dra. Ana Cecilia Silveira y mis compañeros de la Unidad de Tecnología de Alimentos (Dra. Stella Reginensi, Ing. Agr. Silvia Gaimari, MSc. Jimena Viejo, Dra. Marcela González, Dr. Gustavo González Neves, Dr. Diego Piccardo, Dr. Guzmán Favre y MSc. Jorge Olivera), gracias, se hace más sencillo caminar en compañía. Al Dr. Federico Harte, por todo su apoyo en estos años, gracias.

A mis compañeros del Laboratorio Castellano, en especial a Miguel, gracias, tal vez no terminó como queríamos el camino, pero fue enriquecedor recorrerlo.

A Lucía Muga Mederos, por dejarme usar una de las maravillas que dibuja, son sus manos las que garabatean y pintan, pero estoy convencido que no son ellas, sólo son un instrumento para ejecutar lo que recibe de su corazón.

A todos los que han estado en el camino y que siempre me dejaron algo positivo para aprender.

Por último, agradecer a los que siempre están, mi familia:

A todos los que ya partieron, por todo lo que nos dejaron, su humildad y tezón para aventurarse desde tan lejos por una esperanza, somos mucho de lo que somos gracias a ellos.

A Ne, mi hermana, un ser muy especial, gracias por ser mi gran sostén.

A Chiari y Fran, mis hijos, simplemente gracias, si estoy terminando este trabajo siendo tan viejo, fue gracias a ustedes, fueron mi fuerza para poder culminarlo.

A Ger, otro hijo que me ha dado la vida...clarooooooooo, gracias.

A mis queridos primos Anto, Susana y Gustavo y a los más pequeños Vito, Nati y Massi, gracias por estar siempre compartiendo la vida.

A Pily, Fran y Emi, gracias también por estar siempre...y por dejarme ganar de vez en cuando los domingos de sobremesa lúdica, jajaja. Emi, mil gracias por tu infinita paciencia para ayudarme a hacer que esta tesis saliera compaginada de la mejor forma posible.

Por último, a mi amada María, tú sonrisa alivia cada día largo y complejo, llegar y saber que me recibirás con esa sonrisa, hace que el corazón descanse.

Sensores y biosensores para evaluar la presencia de disruptores endócrinos

Giovanni Galietta Positano, Magíster.

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

Diciembre 2023

Directores: Dr. Eduardo Méndez (Laboratorio de Biomateriales, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias) y Dr. Luis Panizzolo (Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Química)

Director Académico: Dr. Luis Panizzolo

Resumen

La disposición de sustancias nocivas al medio ambiente es un hecho cotidiano, pero, ¿cómo impactan estas sustancias en la salud de los seres vivos? Es difícil contestar esta pregunta, ya que es complejo conocer la real dimensión del riesgo que ellas generan al integrarse a diferentes ecosistemas. Dentro de estos compuestos encontramos aquellos que afectan al sistema endócrino, conocidos como “disruptores endócrinos”. Poder detectarlos y evaluar su concentración es un primer acercamiento al estudio del impacto del problema. Para ello es conveniente disponer de técnicas analíticas sensibles, sencillas, rápidas y de aplicación *in situ*, que permitan tener un mayor alcance y estudio de la situación en zonas de riesgo.

El objetivo de esta Tesis fue el estudio y puesta a punto de diferentes técnicas analíticas para determinar *in situ* la presencia de dos disruptores endócrinos emergentes: el plomo y las nanopartículas de plata. Mediante análisis electroquímicos, espectroscopía UV-visible, dispersión de luz dinámica, laser, microscopía electrónica de transmisión y análisis de color, se estudiaron nanopartículas de plata (AgNPs) presentes en soluciones coloidales comerciales; mientras que se analizaron pinturas en paredes de hogares de familia y de edificios públicos buscando plomo, mediante un análisis colorimétrico *in situ* y posterior confirmación por análisis electroquímico y espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

En el caso del plomo, se implementó una técnica electroquímica que puede ser fácilmente descentralizada, que permite la cuantificación de este elemento en pinturas. Esta técnica complementó un análisis colorimétrico que se implementó para su uso *in situ* como técnica de barrido previo. El uso de esta última técnica permitió proponer un protocolo general para la inspección de hogares en búsqueda de plomo que, en un ensayo exploratorio en dos barrios de Montevideo, resultó en un abatimiento muy importante de los costos.

El estudio de las nanopartículas de plata en muestras comerciales mostró la necesidad de contar con una batería de técnicas para poder concluir acerca de la presencia y la concentración de las mismas. Se desarrolló una metodología electroquímica que permite discriminar iones plata de nanopartículas de plata, y se propone un protocolo analítico mayoritariamente descentralizable para la detección y cuantificación *in situ* de nanopartículas de plata.

Las metodologías propuestas son una alternativa para el análisis de forma descentralizada, sencilla, económica y confiable, de dos disruptores endócrinos emergentes.

Sensors and biosensors to evaluate the presence of endocrine disruptors

Giovanni Galietta Positano, MSc.

Postgraduation in Chemistry Program, Faculty of Chemistry

University of the Republic

December 2023

Directors:

Dr. Eduardo Méndez (Biomaterials Laboratory, Institute of Biological Chemistry, Faculty of Sciences, University of the Republic)

Dr. Luis Panizzolo (Department of Food Science and Technology, Faculty of Chemistry University of the Republic)

Academic director: Dr. Luis Panizzolo

Abstract

The disposal of harmful substances into the environment is a common occurrence, but how do these substances impact the health of living organisms? Answering this question is challenging, as it's complex to understand the true extent of the risks they pose when they integrate into different ecosystems. Among these compounds, there are those that affect the endocrine system, known as "endocrine disruptors." Detecting them and evaluating their concentration is an initial step in studying the problem's impact. For this purpose, it's important to have sensitive, simple, rapid, and on-site analytical techniques that allow for a broader assessment and study of

the situation in at-risk areas. The objective of this thesis was to study and develop various analytical techniques to determine the presence of two emerging endocrine disruptors in situ: lead and silver nanoparticles.

Through electrochemical analysis, UV-visible spectroscopy, dynamic light scattering, laser, transmission electron microscopy, and color analysis, silver nanoparticles (AgNPs) present in commercial colloidal solutions were examined. Meanwhile, paints on the walls of family homes and public buildings were analyzed to detect lead, using in situ colorimetric analysis with subsequent confirmation through electrochemical analysis and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR).

For lead, an easily decentralizable electrochemical technique was implemented, enabling the quantification of this element in paints. This technique complemented a colorimetric analysis used for on-site screening. The use of the latter technique allowed for the proposal of a general protocol for home inspections searching for lead, which, in an exploratory trial in two neighborhoods in Montevideo, resulted in a significant reduction in costs.

The study of silver nanoparticles in commercial samples revealed the need for a battery of techniques to draw conclusions about their presence and concentration. An electrochemical methodology was developed to discriminate silver ions from silver nanoparticles, and a primarily decentralizable analytical protocol is proposed for on-site detection and quantification of silver nanoparticles.

The proposed methodologies provide an alternative for the decentralized, simple, cost-effective, and reliable analysis of two emerging endocrine disruptors.

Contenido

Agradecimientos.....	IV
Resumen.....	VII
Abstract.....	X
Lista de Tablas.....	XVIII
Lista de Figuras.....	XX
Lista de Abreviaciones.....	XXV
Capítulo 1. La descentralización analítica aplicada a la detección y cuantificación de disruptores endócrinos.....	1
Introducción General.....	2
1.1. Disruptores endócrinos.....	3
1.1.1. Los Disruptores Endócrinos en el Medio Ambiente.....	6
1.1.2. Disruptores endócrinos emergentes.....	8
1.1.3. Mecanismo de acción de los Disruptores Endócrinos.....	9
1.1.4. Disruptores endócrinos estudiados en esta Tesis.....	11
1.2. Descentralización analítica.....	13
1.2.1. Planteamiento del problema.....	13
1.2.2. La descentralización analítica como respuesta.....	13
1.3. Bibliografía del capítulo.....	16
Objetivos de la Tesis.....	20
Capítulo 2. Metodología general.....	21
2.1. Introducción.....	22
2.2. Metodologías para los estudios ópticos.....	23

2.2.1. Espectroscopía electrónica (UV/VIS).....	23
Bases físicas de la absorción en nanopartículas metálicas	24
Modelos y cálculos para plasmones superficiales	28
2.2.2. Dispersión dinámica de luz (DLS).....	37
2.2.3. Medidas de color	39
Color espectral.	44
2.2.4. Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM).....	45
2.3. Metodologías para los estudios electroquímicos	47
2.3.1. Voltamperometría cíclica (CV)	47
2.4. Equipamiento y materiales para análisis descentralizado	49
2.4.1. Espectrofotómetros y dispositivos ópticos.....	50
Espectrofotómetros miniaturizados.....	50
Punteros láser.....	53
Teléfonos celulares.....	55
2.4.2. Potenciostatos	56
2.4.3. Electrodo serigrafiados (SPE)	60
El problema del electrodo de referencia serigrafiado.	62
El problema del electrodo auxiliar (CE) serigrafiado.	63
Características electroquímicas de los electrodos de trabajo.	64
2.5. Validación de las metodologías descentralizables	64
2.5.1. El problema del “cero”	65
2.5.2. Linealizaciones y adiciones estándar	67
2.5.3. Métodos estadísticos.....	69

Test de Dixon para la detección de valores atípicos (outliers).....	69
Test de Mandel (Prueba F).....	70
Criterio de información Akaike (AIC).....	71
Criterio de información bayesiano (BIC).....	71
2.5.4. Materiales de referencia y materiales certificados	72
2.6. Bibliografía del Capítulo	74
Capítulo 3 - Análisis de plomo en pinturas.....	80
3.1. Introducción y antecedentes.....	81
3.2. Materiales y métodos.....	85
3.2.1. Soluciones y Reactivos	86
3.2.2. Soluciones estándar de Pb y material de referencia certificado	86
3.2.3. Detección de Plomo con el <i>Dust Wipe Method</i> (DWM)	87
3.2.4. Preparación de las muestras.....	90
3.2.5. Determinación de Plomo mediante SWASV.....	90
3.2.6. Análisis por FTIR de virutas de pintura	93
3.3. Resultados y Discusión.....	93
3.3.1. Electroanálisis sobre electrodos de película de Bi.....	94
3.3.2. Calibración analítica	95
3.3.3. Evaluación del efecto matriz	98
3.3.4. Análisis de recuperación.....	101
3.3.5. Análisis del blanco analítico.....	103
3.3.6. Análisis en Muestras Reales	103
Diseño de un protocolo descentralizado	104

Aplicación en campo.....	104
Actividades adicionales.....	106
3.3.7. Análisis detallado de casos.....	106
Caso I.....	107
Caso II.....	110
Caso III.....	113
3.4. Conclusiones.....	114
3.5. Bibliografía del Capítulo.....	116
Capítulo 4. Análisis de nanopartículas de plata.....	120
4.1. Introducción.....	121
4.2. Materiales y métodos.....	125
4.2.1. Material Certificado.....	125
4.2.2. Selección de muestras.....	126
4.2.3. Métodos analíticos.....	128
Espectroscopía UV-visible (UV/VIS).....	128
Efecto Tyndall.....	128
Dispersión dinámica de luz (DLS).....	128
Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	129
Análisis electroquímico.....	129
Análisis de color.....	129
4.3. Resultados y discusión.....	130
4.3.1. Material de referencia certificado (no trazable).....	130
4.3.2. Relación entre las propiedades mensurables.....	131

Propiedades ópticas y características físicas.....	132
Propiedades electroquímicas.....	133
Modelos de oxidación.....	137
4.3.3. Expresión de la concentración en soluciones coloidales de AgNPs	142
4.3.4. Aditividad de las propiedades mensurables en AgNPs-citrato.....	145
Absorbancia como propiedad aditiva.....	146
Carga e intensidad de pico de oxidación como propiedades aditivas.....	152
Saturación de color y color espectral como propiedades aditivas.....	156
4.3.5. Incidencia del agente de recubrimiento.....	158
Estudios ópticos.....	159
Estudios electroquímicos.....	161
4.3.6. Análisis de muestras reales	162
Efecto Tyndall.....	162
Microscopía TEM.....	163
Estabilidad coloidal.....	167
Espectroscopía UV/VIS.....	169
Estudios electroquímicos.....	172
¿Es posible discriminar AgNPs de iones Ag ⁺ voltamperométricamente?.....	173
Medidas de color.....	176
4.4. Resumen de resultados.....	178
4.5. Protocolo propuesto.....	181
4.6. Conclusiones	184
4.7. Bibliografía del Capítulo	185

Capítulo 5. Consideraciones Finales y Perspectivas.....	189
Capítulo 6. Anexos	191
6.1. Anexo I. Publicaciones en revistas internacionales referadas y trabajos presentados en congresos y simposios.	191
Publicaciones.	191
Trabajos presentados en congresos, simposios y jornadas.	191
6.2. Anexo II. Comparación de potenciales de electrodos de referencia	193
6.3. Anexo III. Fotos monitoreo de plomo <i>in situ</i> , en barrios de Montevideo.....	194
Tipo de Vivienda Monitoreada	194
Valija con materiales para trabajo de campo	194
Forma de monitoreo <i>in situ</i>	195
Inspección con XRF.....	196
6.4. Anexo IV. Propiedades ópticas de los estándares	197
6.5. Anexo V. Propiedades electroquímicas de los estándares	198

Lista de Tablas

Tabla 1.1. Sustancias químicas consideradas disruptores endócrinos

Tabla 2.1. Denominación común de los colores puros (colores evocados), y sus longitudes de onda

Tabla 2.2. Principales características de potenciostatos miniaturizados comerciales.

Tabla 3.1. Protocolo para la determinación del contenido de Pb en los chips de pinturas.

Tabla 3.2. Ajustes lineal y cuadrático de los valores experimentales obtenidos en ausencia del efecto matriz.

Tabla 3.3. Prueba de ANOVA en ausencia del efecto matriz.

Tabla 3.4. Comparación de los modelos lineal y cuadrático utilizando los criterios Akaike, Bayesiano y prueba de Mandel en ausencia del efecto matriz.

Tabla 3.5. Parámetros obtenidos del ajuste lineal y cuadrático evaluando el efecto matriz.

Tabla 3.6. Prueba de ANOVA para evaluar el efecto matriz.

Tabla 3.7. Comparación de los modelos lineal y cuadrático utilizando los criterios Akaike, Bayesiano y prueba de Mandel evaluando el efecto matriz.

Tabla 3.8. Análisis de recuperación media ($n = 3$) de una pintura con plomo CRM

Tabla 3.9. Solubilidad de algunos compuestos de plomo

Tabla 3.10. Resumen de las muestras analizadas con la metodología propuesta.

Tabla 3.11. Bandas de absorción en el FTIR de la pintura del Caso I

Tabla 3.12. Bandas de absorción en el FTIR de la pintura del Caso II

Tabla 3.13. Bandas de absorción en el FTIR de la pintura del Caso III

Tabla 4.1. Información provista por el proveedor de las muestras comerciales analizadas.

Tabla 4.2. Características de los estándares de AgNPs-citrato de nanoComposix® para soluciones de concentración nominal 0.020 mg/mL.

Tabla 4.3. Localización de las bandas λ_{LSPR} obtenidas experimentalmente para las AgNPs-citrato de nanoComposix® y las reportadas en la bibliografía.

Tabla 4.4. Potencial de oxidación para los estándares de AgNPs-citrato de nanoComposix®.

Tabla 4.5. Concentraciones reales en mg/mL y mol/L para las diluciones de las soluciones de AgNPs de nanoComposix®: base [Ag].

Tabla 4.6. Concentraciones reales en mol/L y partículas/mL para las diluciones de las soluciones de AgNPs de nanoComposix®: base AgNPs.

Tabla 4.7. Propiedad "Absorbancia" como propiedad aditiva

Tabla 4.8. Definiciones para las extinciones de acuerdo con la Ley de Beer-Lambert

Tabla 4.9. Propiedades de la recta de calibración de la Figura 4.8.

Tabla 4.10. Coeficientes de extinción molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) experimentales obtenidos con las soluciones de AgNPs-citrato de nanoComposix®, y su comparación con otras estimaciones.

Tabla 4.11. Propiedades electroquímicas mensurables para los estándares de AgNPs-citrato de nanoComposix®.

Tabla 4.12. % Saturación de color y longitud de onda espectral para las diluciones seriadas de AgNPs-citrato.

Tabla 4.13. Características de los estándares de AgNPs de tamaño nominal 30 nm recubiertas con diferentes ligandos, de la firma nanoComposix®.

Tabla 4.14. Resultados analíticos para AgNPs con diferentes ligandos, empleando ecuaciones generalizadas obtenidas para AgNP-citrato.

Tabla 4.15. Características de las AgNPs de las muestras comerciales analizadas.

Tabla 4.16. Valores representativos de los espectros de la Figura 4.21 y estimación de la concentración de las muestras comerciales.

Tabla 4.17. Valores representativos de los voltamperogramas cíclicos de la Figura 4.23 y estimación de la concentración de las muestras comerciales.

Tabla 4.18. % Saturación de color y longitud de onda espectral para las soluciones comerciales analizadas.

Tabla 4.19. Valores analíticos obtenidos para las diferentes muestras comerciales, expresados como mg/L (ppm), y el porcentaje de recuperación obtenido a partir del valor indicado por el fabricante.

Lista de Figuras

Figura 1.1. Mecanismos propuestos para las diferentes vías de señalización hormonal. Adaptado de Heldring et al., 2007 y Warner et al., 2020.

Figura 1.2. Esquema comparativo de las etapas de muestreo y análisis para el análisis centralizado y descentralizado. Tomado de: Ansin et al., 2022.

Figura 2.1. Coloides de oro producidos por Michael Faraday en la década de 1850. Observar la dispersión de la luz láser producida por las NPs. Foto: Paul Wilkinson (Museo de Faraday, The Royal Institution, Londres, Inglaterra)

Figura 2.2. Representación esquemática de la interacción de la luz con una NP metálica. El campo eléctrico de la luz induce el movimiento de los electrones de conducción que se acumulan en la superficie del NP creando un dipolo eléctrico. Esta acumulación de carga crea un campo eléctrico opuesto al de la luz. Adaptado de Garcia, 2011.

Figura 2.3. Oscilación de los plasmones superficiales localizados (LSP) de una nanoesfera metálica

Figura 2.4. Resonancia del Plasmón. Oscilaciones de la nube electrónica del metal: A) Oscilación dipolar, B) Oscilación cuadrupolar. Tomado de Botasini, 2016.

Figura 2.5. Espectro de absorción para AgNPs de diferentes tamaños calculado según la teoría de Mie. Imagen tomada de Garcia, 2011.

Figura 2.6. (a) Ilustración de la acumulación de carga para los plasmones superficiales longitudinales y transversales. (b) Espectros de absorción calculados para nanovarillas de Au con diferentes relaciones de aspecto indicadas en la figura. (c) Posición e intensidad de la LRSP longitudinal en función de la relación de aspecto de la nanovarilla. Imagen adaptada de Garcia, 2011.

Figura 2.7. Espectros UV/VIS de nanoestructuras de plata y contribuciones calculadas para la extinción (negro), absorción (rojo) y dispersión (azul). Figura adaptada de Lu et al., 2009; Wiley et al., 2006.

Figura 2.8. Espectros de absorción UV/VIS de AuNPs de 10 nm, en un medio dieléctrico con diferentes funciones dieléctricas calculadas de acuerdo a la teoría de Mie. Figura adaptada de Garcia, 2011.

Figura 2.9. Espectros de absorción UV/VIS para AuNPs con interacciones dipolares. El parámetro K representa la intensidad del campo eléctrico creado en una posición de la NP por el resto de las NPs. Adaptado de Garcia, 2011 y Garcia et al., 1999.

Figura 2.10. Esquema de funcionamiento de un DLS. A) La luz dispersada con fluctuaciones aleatorias es captada por el fotodetector ubicado a 90° respecto a la luz incidente del láser. B) Correlación entre el tamaño de las partículas y la velocidad de cambio de las fluctuaciones de intensidad. Tomado de Botasini, 2016.

Figura 2.11. (a) Diagrama de cromaticidad, indicando las longitudes de onda de pureza espectral. (b) Modificaciones del diagrama CIE al emplear valores en el eje de relevancia fisiológica. (c) Cálculos que se pueden realizar por medidas dentro del diagrama.

Figura 2.12. Diagrama 2D CIELAB

Figura 2.13. Voltamperograma típico en un sistema reversible. E_{pc} y E_{pa} : potenciales catódico y anódico para la intensidad de corriente máxima catódica (I_{pc}) y anódica (I_{pa}).

Figura 2.14. Espectrómetros miniaturizados comerciales. Imágenes tomadas y adaptadas de: Ocean Insight, Spectral Evolution, Vernier Science Education y Hamamatsu Photonics.

Figura 2.15. Esquema simplificado de un potenciostato Adaptado de Colomer & Miribel, 2009.

Figura 2.16. Miniaturización en el desarrollo de potenciostatos para uso descentralizado

Figura 2.17. Estructura de un sistema electroódico serigrafiado (SPE) en comparación a una celda electroquímica convencional.

Figura 2.18. Diseños de electrodos serigrafiados de la firma DropSens® (Gentileza: grupo de BioNanoAnálisis, Universidad de Oviedo, España y DropSens, Llaneras, España)

Figura 2.19. Método de adición estándar. A) Regresión directa, B) Regresión inversa. Figura adaptada de Meija et al., 2014.

Figura 3.1. Países con leyes establecidas para plomo en pinturas al 31 de diciembre de 2022. Fuente de datos: <https://saicmknowledge.org/content/lead-paint-law-map> (acceso 15 mayo 2023).

Figura 3.2. Porcentaje de países con los diferentes límites establecidos en el mundo para plomo en pinturas al 31 de diciembre de 2021. Tomado de UNEP, 2021.

Figura 3.3. Toallas húmedas utilizadas en el trabajo, usadas originalmente para higiene personal (izquierda) o higiene de bebés (derecha).

Figura 3.4. Cantidad de Pb en cada spot (en μg): A = 1, B = 2, C = 5, D = 7, E = 10, F = 20, G = 40, H = 60, I = 80 & J = 100.

Figura 3.5. Registro normalizado de SWASV para la solución buffer acetato (0.1 M, pH 4.6) en ausencia (línea punteada) y presencia de 30 $\mu\text{g/L}$ de Pb(II).

Figura 3.6. Gráficos lineales y cuadráticos de la calibración analítica en ausencia (líneas continuas) y presencia (líneas punteadas) de Material de Referencia Certificado (CRM).

Figura 3.7. Resumen de los resultados obtenidos en las inspecciones realizadas *in situ* empleando el DWM y las metodologías electroquímicas. Adaptado de Ansin et al., 2022.

Figura 3.8. Análisis electroquímico y FTIR de la pintura del Caso I

Figura 3.9. Análisis electroquímico y FTIR de la pintura del Caso II

Figura 3.10. FTIR de la pintura del Caso III

Figura 4.1. Las AgNPs pueden estabilizarse electrostáticamente o covalentemente. En el caso de la estabilización electrostática, el aumento de la fuerza iónica del medio conduce a su agregación, mientras que, para la estabilización covalente, puede ocurrir una reacción de cambio de ligando, o pueden formarse núcleos superficiales de AgCl por la presencia de iones cloruro en el medio, conduciendo a la agregación. Adaptado de Botasini et al., 2013.

Figura 4.2. Estructuras químicas de las moléculas empleadas como agentes de recubrimiento de las AgNPs de nanoComposix®.

Figura 4.3. Espectro EPS obtenido en la cámara del microscopio SEM para el electrodo de referencia de plata y el electrodo de trabajo correspondiente a los electrodos C110 de la firma DropSens®. Los electrodos fueron previamente sumergidos en la solución de electrolito soporte (NaNO_3 0.1 M) empleado en los experimentos.

Figura 4.4. Voltamperometría cíclica de AgNPs-citrato depositadas sobre un electrodo serigrafiado de C grafito (C110) de la firma DropSens®. (A) Ciclos de oxidación para potenciales. (B) Ciclos de reducción y oxidación para barridos comenzando en sentido negativo de potencial. Electrolito soporte: NaNO_3 0.1 M, velocidad de barrido: 50 mV/s.

Figura 4.5. (A) Variación del potencial de pico de oxidación de las AgNPs ($E_{p,AgNP}$) con el tamaño de las nanopartículas, para diferentes concentraciones nominales expresadas como [Ag] en mg/mL. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes. (B) Variación del potencial de pico de oxidación de las AgNPs ($E_{p,AgNP}$) con el logaritmo natural de la concentración de las nanopartículas expresadas como [Ag] en mg/mL, para los diferentes tamaños analizados.

Figura 4.6. Verificación del modelo propuesto por Braininia (Brainina, Galperin, Kiryuhina, et al., 2012) y del grupo de Compton (Ward Jones et al., 2008) para el límite reversible de la oxidación de las AgNPs. La banda corresponde al intervalo de confianza para el 95 %.

Figura 4.7. Aditividad de la propiedad “Absorbancia” en función de la forma de expresión de la concentración de los estándares de AgNPs-citrato de nanoComposix®. Los tamaños de AgNPs indicados corresponden a los valores nominales.

Figura 4.8. Curva de calibración para la propiedad aditiva “Absorbancia” en función de la [Ag]. El área en rojo corresponde a la banda de confianza del ajuste lineal (95 %).

Figura 4.9. Esquema del procedimiento para las medidas electroquímicas de los sistemas coloidales de AgNPs

Figura 4.10. Voltamperometría cíclica (A) primer barrido positivo, (B) segundo barrido positivo, para las AgNPs depositadas por el método drop cast sobre electrodos serigrafiados de Carbono. Los barridos negativos (no mostrados) se llevaron a cabo hasta un potencial de 0 V_{QRE} .

Figura 4.11. Curvas de calibración para la propiedad aditiva “Intensidad de corriente” y “Carga de oxidación” en función de la [Ag]. El área en rojo corresponde a la banda de confianza del ajuste lineal (95 %).

Figura 4.12. Curva de calibración para la propiedad aditiva “% Saturación de color” en función de la [Ag], incluyendo todos los tamaños analizados. El área en rojo corresponde a la banda de confianza del ajuste lineal (95 %). Los puntos en rojo corresponden a las AgNPs de tamaño nominal 5 nm, que se apartan apreciablemente del comportamiento general mostrado por las AgNPs de otros tamaños.

Figura 4.13. Espectros UV/VIS para las dispersiones de AgNPs de tamaño nominal 30 nm, con diferentes agentes de recubrimiento.

Figura 4.14. Barridos anódicos correspondientes a AgNPs con diferentes ligandos depositadas sobre el electrodo de trabajo de carbono grafito. Electrolito soporte: 0.1 M NaNO₃. Se indican como referencia el comportamiento del sistema en ausencia de AgNPs, y sólo en presencia de una solución de Ag⁺.

Figura 4.15. Dispersión de luz observada a 90 ° durante la irradiación de las muestras comerciales M1, M2, M3 y AGUA ultrapura, con un haz de láser de diodo de 35 mW (660 nm). Imagen obtenida de la vista superior de la cubeta de muestra en el porta muestras del equipo DLS.

Figura 4.16. Micrografías TEM para las muestras comerciales M1 y M2.

Figura 4.17. Micrografías TEM para la muestra M3

Figura 4.18. Distribución de tamaños TEM para las muestras comerciales M1 y M2.

Figura 4.19. Distribución de tamaños obtenida por DLS para las muestras comerciales

Figura 4.20. Curvas de estabilidad coloidal frente al aumento de la fuerza iónica para la muestra M2.

Figura 4.21. Espectros UV/VIS para las muestras comerciales. Los registros correspondientes al estándar de AgNP-citrato de 30 nm y de la muestra M2 fueron escalados a una absorbancia máxima ca. 1.

Figura 4.22. Espectro UV/VIS completo para la muestra M3 (trazo verde) y derivada segunda del espectro (trazo rojo).

Figura 4.23. Voltamperometrías cíclicas de las AgNPs depositadas sobre electrodos serigrafados de carbono grafito (C110, DropSens®), comenzando en 0 V_{ORE} en la dirección positiva.

Figura 4.24. Ciclos voltamperométricos para las muestras M1 (paneles izquierdos) y M2 (paneles derechos). En los paneles superiores el ciclo inicial es en el sentido negativo de potenciales, en los paneles inferiores en el sentido positivo de potenciales. Trazos negros: primer ciclo, trazos rojos: segundo ciclo. Velocidad de barrido: 0.050 V/s.

Figura 4.25. Resumen gráfico de los resultados analíticos para cada muestra comercial. En línea punteada se marca el valor indicado por el fabricante (salvo para M3).

Figura 4.26. Protocolo propuesto para el análisis de muestras comerciales que indican tener AgNPs.

Figura 4.27. Protocolo propuesto para el análisis de la muestra comercial M1 que indica tener AgNPs.

Figura 4.28. Protocolo propuesto para el análisis de la muestra comercial M2 que indica tener AgNPs.

Figura 4.29. Protocolo propuesto para el análisis de la muestra comercial M3 que indica tener AgNPs.

Lista de Abreviaciones

AFE- 4-alkilfenol etoxilados

Ag₂S-Sulfuro de plata

AgCl- Cloruro de plata

AgNPs- Nanopartículas de plata

AIC- Prueba del criterio de información de Akaike

ANOVA- Análisis de varianza

AuNPs- Nanopartículas de oro

Bi(NO₃)₃·5H₂O- Nitrato de bismuto (III) pentahidrato

BIC- Criterio de información bayesiano

BPA- Bisfenol A

CaMg(CO₃)₂- Dolomita (mineral compuesto de carbonato de calcio y magnesio)

CaSO₄·2H₂O- Sulfato de calcio dihidrato (piedra de yeso o yeso natural o aljez)

CE- Electrodo auxiliar o contraelectrodo

CIE- Comisión Internationale de l'Éclairage

COPs- Compuestos orgánicos persistentes

CRM- Material de Referencia Certificado

CV- Voltamperometría cíclica

DDA- Aproximación de dipolo discreto

DDE- Dicloro-difenil-dicloroetileno

DDT- Dicloro-difenil-tricloroetano

DE- Disruptores Endócrinos

DES- Dietilestilbestrol

DLS- Dispersión dinámica de luz

DWM- Método de la toalla o del "trapo húmedo" (Dust Wipe Method)

EM- Efecto matriz

EPA- Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos

FTIR- Espectroscopía infrarroja por transformada de fourier

GC- Cromatografía gaseosa

H₂C₂O₄- Ácido oxálico

H₂O₂- Agua oxigenada

HCl- Ácido clorhídrico

HNO₃- Ácido nítrico

ICP- Plasma acoplado inductivamente

IR- Espectroscopía infrarroja

KBr- Bromuro de potasio

LC- Cromatografía líquida

LCD- Pantallas de cristal líquido

LED- Diodos emisores de luz

LOD- Límite de detección

LOQ- Límite de cuantificación

LRSP- Resonancia plasmón superficial localizado

LSP- Plasmón superficial localizado

MilliQ®- Agua ultrapura

MSP- Ministerio de Salud Pública

NaOH- Hidróxido de sodio

NIR- Espectroscopía del infrarrojo cercano

NIST- Instituto Nacional de Estándares y Tecnología

NMR- Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

NPD- Nanotechnology Products Database

NPs- Nanopartículas

ONU- Naciones Unidas

PbCrO₄- Cromato de plomo (II)

2PbCO₃.Pb(OH)₂- Mezcla de hidróxido de plomo (II) y carbonato de plomo(II),

PBDEs- Éteres de polibromodifenilos

PCBs- Bifenilos policlorados
PCDD- Dibenzo-p-dioxinas policloradas
PCDF- Dibenzofuranos policlorados
PFOA -Ácido Perfluorooctanoico
PVC- Cloruro de polivinilo
PVP- Polivinilpirrolidona
QRE- Electrodo de cuasi-referencia
RAE- Real Academia Española
RE- Electrodo de referencia
ROS- Especies reactivas de oxígeno
SPE- Electrodo serigrafados
SWASV- Método voltamperométrico de redisolución anódica con onda cuadrada (square-wave analytical stripping voltammetry)
TEM- Microscopía de Transmisión Electrónica
UV/VIS- Espectroscopía ultravioleta/visible
WE- Electrodo de trabajo
XRF-Fluorescencia de rayos X

**Capítulo 1. La descentralización analítica
aplicada a la detección y cuantificación de
disruptores endócrinos**

Introducción General

Según la Real Academia Española (RAE), el vocablo *disrupción* alude a la rotura o interrupción brusca (RAE, 2022). En los diferentes ecosistemas muchos procesos biológicos pueden sufrir una interrupción, algunas de ellas ocurren de forma natural, pero en otras ocasiones son desencadenados por la presencia no querida de sustancias químicas y en la gran mayoría de los casos es gracias al manejo indebido de los desechos por los humanos, pudiendo provenir de lugares y situaciones muy variadas, como industrias químicas, farmacéuticas, hasta simples aseos personales o desechos diarios de alimentación (Peivasteh-roudsari et al., 2023; Stiefel & Stintzing, 2023). Sustancias químicas desechadas en el ambiente que se propagan por diferentes vías llegando a cuerpos de aguas y a organismos vivos a miles de kilómetros de donde fueron eliminados (Luo et al., 2023; Thacharodi et al., 2023a). La exposición también se da por su presencia a través de diferentes objetos en el hogar, como por ejemplo plásticos con Bisfenol A (BPA) o ftalatos, o juguetes y paredes en cuya pintura hay metales pesados como el plomo. El problema principal no es su presencia, sino sus efectos sobre los seres vivos, o sea su acción disruptiva a ciertas concentraciones de exposición y en qué etapa de la vida se encuentren. Hay órganos más vulnerables a ser afectados, así como ciertos períodos de la vida más susceptibles a la presencia en nuestro cuerpo de contaminantes, como por ejemplo el embarazo, el desarrollo fetal, la primera infancia, ventanas de la vida que determinan el futuro. Por tal motivo el Ministerio de Salud Pública (MSP) del Uruguay, en ordenanza N.º 158 del 21 de marzo de 2012, resuelve la prohibición del uso de BPA como monómero de partida o plastificante en la elaboración de biberones para lactantes (Ministerio de Salud Pública, 2012). Lo mismo ocurre con el decreto 69/011 que busca minimizar el contenido de plomo en las pinturas,

estableciendo que solo puedan tener un máximo de 600 ppm de plomo en las mismas (Centro de Información Oficial, 2011).

Según la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA), cerca de 87 000 sustancias químicas están registradas a través de la Ley de Control de Sustancias Tóxicas, de las cuales 42 242 están activas (EPA, 2023) y gran parte de las mismas son consideradas disruptores endócrinos, o sea sustancias químicas naturales o sintéticas que pueden interferir con el sistema endócrino (Gingrich et al., 2020).

1.1. Disruptores endócrinos

El sistema endócrino juega un papel clave en el control homeostático del cuerpo, manteniendo las funciones normales y de desarrollo del organismo frente a un entorno en constante cambio. Trabajando en tándem con el sistema nervioso – principalmente responsable de respuestas rápidas e inmediatas – las aproximadamente 30 glándulas diferentes que comprenden el sistema endocrino tienden a actuar de una manera más lenta y sostenida para regular procesos tan diversos entre otros como el ciclo reproductivo femenino, el crecimiento óseo, la proliferación celular y el comportamiento psicosocial. Las glándulas endocrinas múltiples trabajan de forma coordinada entre sí, secretando diferentes hormonas directamente a la circulación sanguínea. Estas hormonas controlan y regulan estrechamente los procesos fisiológicos críticos.

Es necesario tener un sistema endócrino funcional para asegurar la correcta coordinación de las hormonas, que actúan como mensajeros químicos en la comunicación entre órganos y tejidos en la regulación de las actividades fisiológicas y conductuales. Las glándulas endocrinas tienen la función de secretar las hormonas, las cuales son transportadas a las células diana, alcanzando un alto grado

de especificidad por la unión a receptores celulares. Un funcionamiento normal depende de acciones coordinadas de una red de hormonas, las cuales actúan sincrónicamente en los momentos adecuados a las concentraciones necesarias (Darbre, 2019).

Entonces, ¿qué son los Disruptores Endócrinos (DE)? Se trata de sustancias químicas exógenas, sintéticas o naturales, que interfieren con el sistema hormonal, causando efectos adversos en la salud de un organismo intacto y/o a su progenie, ya sea aumentando o bloqueando la producción de hormonas o inhibiendo sus efectos (World Health Organisation/ European Centre for Environment and Health, 1996). Algunos de los DE se encuentran en la naturaleza, como fitoestrógenos (derivados de plantas), o micoestrógenos (derivados de hongos); pero la gran mayoría de los DE son liberados en los ecosistemas naturales de forma masiva por las actividades antropogénicas, sin prever la dimensión el daño que conllevan para el bienestar del medio ambiente y de la salud humana. El concepto de DE ha revolucionado la toxicología, ya que una exposición crónica a concentraciones insignificantes de una sustancia dada (que puede ser lipofílica y que se acumula en los tejidos grasos) puede ser perjudicial, durante determinados períodos de la vida; en particular, durante las ventanas de susceptibilidad de alto riesgo, como el desarrollo fetal o la primera infancia (Bali et al., 2023; Buck Louis et al., 2018; Rouiller-Fabre et al., 2014; Sood et al., 2017). Es enorme la variedad de compuestos químicos que se ha comprobado que tienen actividad como disruptores endócrinos (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Sustancias químicas consideradas disruptores endócrinos

Compuestos	Uso principal	Medio de Exposición	Observaciones
Aldrin, Clordano, DDT (y metabolitos), Dieldrin, Endrin, Heptacloro, Hexachlorobenzene, Mirex, Toxafeno.	Plaguicidas	Productos animales (leche, carne, grasa, miel)	Prohibidos desde 2001 por el Convenio de Estocolmo
Atrazina, Glifosato	Herbicidas	Usos domésticos en jardines. Agricultura.	En 2015 la OMS considera probable cancerígeno para los seres humanos
Bifenilos policlorados (PCBs)	Industria Eléctrica, Aditivos pinturas, Plásticos	Grasa animal	Prohibidos desde 2001 por el Convenio de Estocolmo
Dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDD), Dibenzofuranos policlorados (PCDF)	Producto de Incineración involuntaria de productos clorados	Inhalación, grasa animal	Prohibidos desde 2001 por el Convenio de Estocolmo
Endosulfán	Insecticida	Productos animales, frutas y hortalizas	Prohibido en Uruguay desde 2011. Usado aún en ciertos países. COPs del Convenio de Estocolmo.
Éteres de polibromodifenilos (PBDEs)	Retardante de llama	Ambientes domésticos	Forma parte de la lista COPs del Convenio de Estocolmo
Ácido Perfluorooctanoico (PFOA) y sus sales	Utensilios de cocina antiadherentes.	Ambientes domésticos	Forma parte de la lista COPs del Convenio de Estocolmo
Bisfenol A (BPA)	Plásticos, Resinas epoxi	Recipientes de comida, envases de bebidas	
Plomo (Pb)	Baterías, Pinturas	Ambientes domésticos	
Parabenos, Triclosan	Conservantes	Productos de cuidado personal, alimentos	
Ftalatos	Plásticos	Productos varios de uso doméstico	
Nanomateriales (NPs)	Productos limpieza, Ropa, Cosméticos, Pinturas, Productos farmacéuticos	Ambientes domésticos. Inhalación, contacto, ingestión.	Emergente
4-Alquilfenol etoxilado	Detergente	Ambientes domésticos	Emergente
Organometales	Molusquicidas y pinturas antiincrustantes	Consumo de pescados y moluscos contaminados	Emergente

1.1.1. Los Disruptores Endócrinos en el Medio Ambiente

La capacidad que tienen ciertas sustancias de interferir en el sistema hormonal se conoce desde 1930, con el desarrollo del dietilestilbestrol (DES), fármaco desarrollado con el fin de evitar los abortos espontáneos. A pesar de eso, no fue hasta 1991, durante la Conferencia de Wingspread (EE.UU), donde expertos endocrinólogos comenzaron a acuñar el término “Disruptor Endócrino” (Matthiessen, 2003). En 1962, la bióloga estadounidense Rachel Carson, publica su libro *Silent Spring* (Primavera silenciosa) (Carson, 1962), en el que destaca cómo la presencia de compuestos orgánicos persistentes (COPs) en el ambiente interfieren en la reproducción de diferentes especies, destacando la desaparición de muchas aves a causa del DDT, entre otros. Sin duda este libro marcó un hito en la historia en la defensa del medio ambiente, sirviendo como base para la revisión del uso de ciertos plaguicidas, en particular de los organoclorados, usados durante varias décadas del siglo XX en la agricultura. Sumado a esto, algunos científicos comienzan a observar anomalías en diferentes especies en la vida silvestre, por ejemplo, una disminución de la población de caimanes en ciertas regiones de la Florida (EE.UU), principalmente en zonas con una alta actividad agrícola y de uso constante de pesticidas organoclorados. Evidenciaron alteraciones en las concentraciones de hormonas sexuales y en la anatomía del aparato reproductor, presentando en muchos casos micropenes (Matthiessen, 2003). También se observó una disminución en la población de panteras de Florida (subespecie de *Puma concolor cougar*), en la misma zona de la Florida, que se atribuyó a la desmasculinización de muchas panteras macho como resultado de la exposición prenatal o perinatal a disruptores endocrinos (Skakkebaek et al., 2001). La mayor parte de estas anomalías están asociadas con la presencia de dioxinas, bifenilos policlorados (PCBs), DDT y sus

metabolitos, entre ellos el DDE, un potente antagonista androgénico (Kang et al., 2004). Estos compuestos, dada su alta persistencia en el ambiente, se van bioacumulando y biomagnificando, razón por la que se los ha encontrado en ciertos hábitats del planeta donde jamás ha existido actividad humana relacionada concretamente con plaguicidas, como la Antártida, y en especies como ballenas y osos polares (Esteban et al., 2016; González-Alonso et al., 2017). Dadas estas características perjudiciales para el medio ambiente, son las primeras sustancias químicas en ser prohibidas en el Convenio de Estocolmo (Stockholm Convention, 2001). Las consecuencias de la presencia de DE en el medio ambiente también se traslada a los seres humanos, con una serie de asociaciones entre dichas sustancias químicas y el riesgo de múltiples enfermedades crónicas, como la obesidad, diabetes tipo II, y el desarrollo de tumores y enfermedades cardiovasculares (Gupta et al., 2020; Macedo et al., 2023; Sargis & Simmons, 2019), así como en la fertilidad femenina (Panagopoulos et al., 2023). Durante las últimas décadas del siglo XX se comenzaron a observar tendencias adversas en la salud reproductiva masculina (Thacharodi et al., 2023 b), incluyendo desórdenes como una mayor incidencia de tumores testiculares, una disminución en la calidad del semen, alta frecuencia de testículos no descendidos e hipospadias¹, que se ha verificado en una creciente demanda en reproducción asistida (Skakkebak et al., 2001). También se comienza a observar cómo la presencia de xenobióticos en conjunción con ciertas enfermedades crónicas agrava los procesos, consecuencia de las interacciones que se dan, por

¹ Hipospadias: es un defecto de nacimiento en los varones en el cual la abertura de la uretra no está en la punta del pene. En los niños con hipospadias, la formación anormal de la uretra sucede entre las semanas 8 y 14 del embarazo. La abertura anormal puede estar situada en cualquier parte, desde el área que está justo debajo de la punta del pene hasta el escroto. Existen distintos grados de gravedad del hipospadias. Tomado de: Centers for Disease Control and Prevention (CDC) <https://www.cdc.gov/>

ejemplo, en la calidad del semen de los hombres obesos en presencia de BPA (Hu et al., 2017).

1.1.2. Disruptores endócrinos emergentes

Los DE y sus efectos son dinámicos, porque el desarrollo de nuevos compuestos químicos no se detiene y la evaluación de su riesgo para todo el medio ambiente puede llevar años de estudios. Es el caso de los nanomateriales, que han tenido un auge importante a partir de su incorporación a productos comerciales en las últimas décadas. Estudios *in vitro* han demostrado que los nanomateriales tienen la capacidad para producir especies reactivas de oxígeno (ROS), liberar iones tóxicos, interrumpir la actividad de transporte de electrones/iones de la membrana celular, además de causar daño oxidativo y peroxidación lipídica, mientras que resultados de estudios *in vivo* han demostrado que estos materiales pueden inducir efectos adversos en los sistemas respiratorio, cardiovascular y nervioso (Iavicoli et al., 2013). Los 4-alkilfenol etoxilados (AFE), son el principal grupo de surfactantes no iónicos, dentro de los más importantes encontramos los octilfenoletoxilados y los nonilfenoletoxilados. Su estructura anfifílica (parte polar hidrofílica y no polar hidrofóbica), es la razón de su capacidad de concentrarse en diferentes superficies y formar micelas en las soluciones. Por estas características son altamente usados en procesos de desinfección a nivel industrial y doméstico. Pero no solo son usados como desinfectantes, sino también como agentes dispersantes en la producción de papel, agentes emulsionantes en pinturas de látex y agentes coadyuvantes en diferentes formulaciones de pesticidas. Dado que son usados principalmente en solución acuosa, dichos efluentes se vierten directamente en la red cloacal y/o son enviados a plantas de tratamiento de aguas, donde mediante biodegradación se metabolizan entre otros en 4-alkilfenoles, compuestos altamente persistentes,

bioacumulables y tóxicos, que forman parte de la lista de compuestos orgánicos persistentes del Convenio de Estocolmo (Acir & Guenther, 2018). Otros disruptores endócrinos emergentes son los organometales, principalmente los compuestos orgánicos de estaño, ampliamente utilizados en la producción de PVC, así como plaguicidas y agentes anti-incrustantes en pinturas de barcos, para evitar que moluscos se adhieran a las superficies de los mismos (Škerlová et al., 2021). Persisten principalmente en los sedimentos del lecho marino y fluvial. Los compuestos organoestánicos, presentan efectos tóxicos en los organismos acuáticos y se bioacumulan, de manera que sus efectos tóxicos se propagan a través de la cadena alimentaria, llegando a la dieta de los seres humanos por el consumo de productos marinos.

1.1.3. Mecanismo de acción de los Disruptores Endócrinos

Los mecanismos de interferencia incluyen alterar la síntesis de hormonas, el transporte de hormonas, el metabolismo hormonal y/o interferir en las acciones en el sitio objetivo bloqueando o compitiendo por la unión a los receptores celulares o modificando los niveles del receptor de la célula objetivo. Las alteraciones pueden incluir aumento de actividad, disminución de actividad o estimulación de actividad en momentos inapropiados. Los mecanismos de acción son muy variables, dependiendo del tipo de DE, hormona y/o glándula involucrada. Un DE puede imitar a una hormona natural como los estrógenos o los andrógenos, pero también a las hormonas tiroideas.

Los DE pueden unirse a un receptor dentro de una célula y bloquear la unión de la hormona endógena. Los productos químicos que bloquean o antagonizan las hormonas son antiestrógenos y antiandrógenos. Al interferir con el sistema endocrino del cuerpo, produce efectos adversos de desarrollo, reproductivos,

neuroológicos e inmunológicos tanto en humanos como en todos los organismos de los ecosistemas (Monneret, 2017). El conocimiento de la complejidad de las señales hormonales, servirá para entender los mecanismos de acción de los DE. Existen diferentes vías de señalización, entre ellas la vía canónica (Ramos Solano et al., 2015). La vía canónica de la señalización hormonal implica la unión de una hormona a sus receptores nucleares correspondientes. La unión del ligando induce cambios estructurales en el receptor que conducen a la dimerización y la exposición de los sitios de unión del cofactor y del ADN (Heldring et al., 2007; Warner et al, 2020). Existen varias vías distintivas de señalización hormonal por donde regular los procesos biológicos. En la Figura 1.1, se observan las diferentes vías. Por un lado, la unión directa a los elementos de respuesta en el genoma (Figura 1.1A), o a través de complejos factores de transcripción (Figura 1.1B). Las hormonas pueden enviar señales a través de vías no genómicas (Figura 1.1C) por interacción con receptores nucleares o citoplasmáticos, para inicializar una cascada de señales mediante mensajeros secundarios, que llevan a una respuesta fisiológica sin alterar la expresión de genes. Por último, la presencia de DE pueden impedir la expresión normal de las hormonas dado que los sitios de unión en los receptores están ocupados por dichas sustancias exógenas (Figura 1.1D).

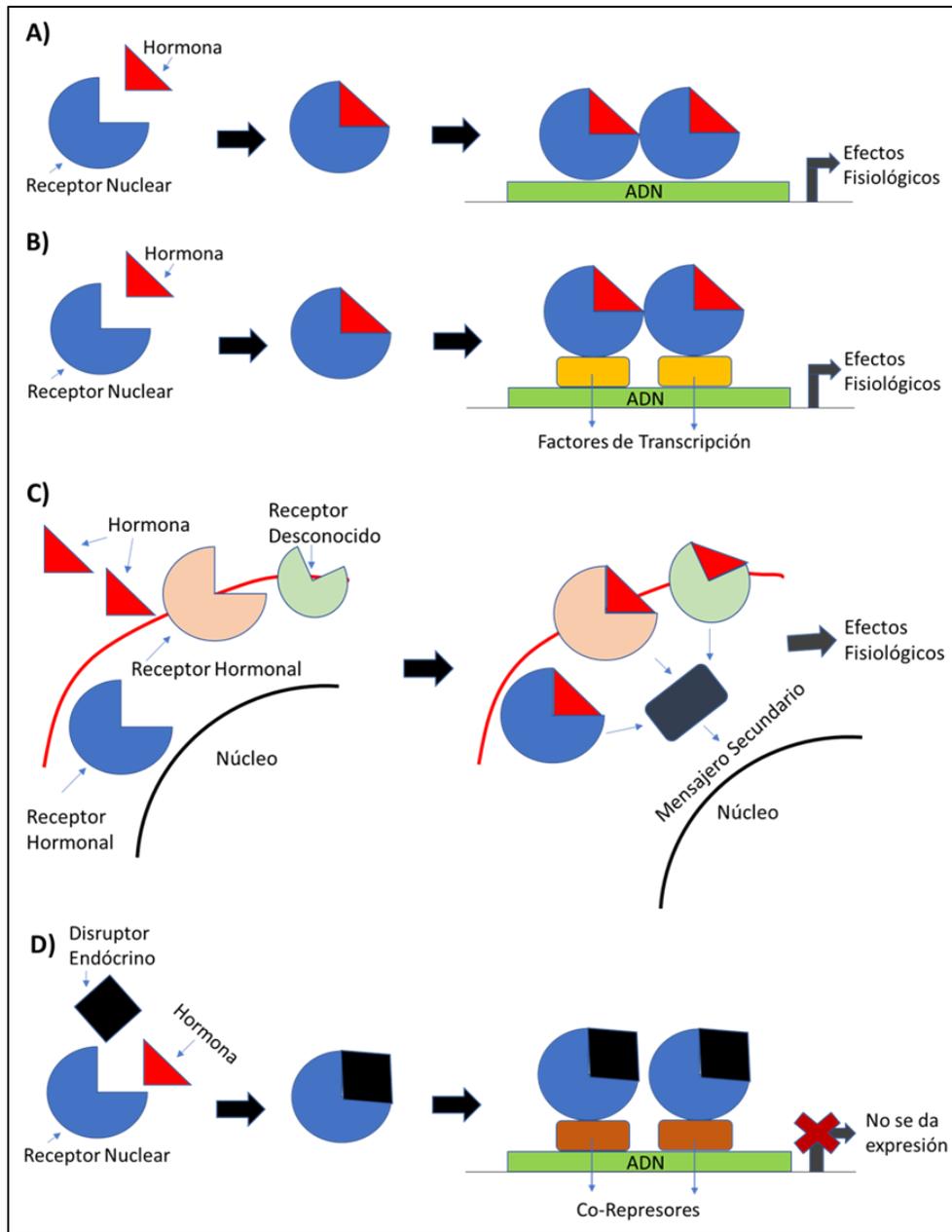


Figura 1.1. Mecanismos propuestos para las diferentes vías de señalización hormonal. (Adaptado de Heldring et al., 2007 y Warner et al., 2020).

1.1.4. Disruptores endócrinos estudiados en esta Tesis

En esta Tesis, se han seleccionado dos DE: plomo y nanopartículas de plata. En el caso del plomo, se trata de un metal (ión) cuya toxicidad ha sido reconocida

largamente, pero su inclusión como DE es reciente (Javorac et al., 2023). Es una sustancia persistente en diferentes partes del sistema corporal, siendo los niños los más vulnerables a su exposición a temprana edad, dado que puede generar daños irreversibles a nivel del neurológico (Zhou, 2017). La detección de forma descentralizada permite anticiparse a ese tipo de exposiciones a corta edad. De forma conjunta la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), vienen trabajando en el programa: Alianza Mundial para Eliminar el Uso del Plomo en la Pintura (en inglés: Lead Paint Alliance) (World Health Organization & United Nations Environment Programme, 2021), cuyo objetivo es prevenir la exposición infantil al plomo, así como minimizar la exposición ocupacional a pinturas con plomo. De forma sostenida el programa busca promover la no fabricación y comercialización de pinturas con plomo, de forma tal de eliminar los riesgos sobre la salud que la presencia de plomo implica.

Las nanopartículas de plata han sido incluidas como DE recientemente (Zhang et al., 2024), y constituyen un desafío analítico singular. Por un lado, no existe una definición globalmente aceptada de un material nanoparticulado, e incluso, pueden encontrarse diferencias entre las definiciones puramente académicas, de las definiciones enmarcadas en los bloques comerciales mundiales. A esto se suma la alta reactividad de las nanopartículas que las lleva a perder su identidad, incluyendo la de nanomaterial. En este punto, la matriz en la cual se encuentran embebidas, o para las que están diseñadas para actuar, juega un papel fundamental, y aún no se sabe a ciencia cierta las consecuencias fisicoquímicas de su exposición a diferentes ambientes.

Los detalles de estos aspectos serán tratados en las secciones introductorias de los capítulos correspondientes (capítulos 3 y 4).

1.2. Descentralización analítica

1.2.1. Planteamiento del problema

Podemos tener diferentes miradas respecto a la contaminación ambiental y los riesgos que conlleva tanto en los ecosistemas, así como en la salud humana. Antes que nada, para poder evaluar y entender si hay un riesgo asociado con la presencia de contaminantes ambientales, debemos detectarlos y saber en qué concentración se encuentran; contar con herramientas apropiadas para detectarlos a niveles traza hasta en ambientes prístinos es imprescindible. Es importante contar con metodologías analíticas que no sólo nos permitan potencialmente detectar el problema, sino llegar en tiempo y forma, para prevenir; detectarlos de forma tardía, puede condicionar el futuro de un ecosistema, así como la de una vida humana. El monitoreo continuo e *in situ* con cierto equipamiento se hace difícil desde varios aspectos: económicos, tiempo, accesibilidad, es cierto que existen equipamientos robustos como equipos de absorción atómica, cromatógrafos, tanto GC como LC, acoplados a detectores de masa, pero... ¿cómo llevar adelante un análisis de contaminantes *in situ* con esos equipos? ¿se podría llegar a realizar un *screening* con sólo ese tipo de equipamientos? ¿cuál sería el costo de los análisis y cuántos se podrían llevar a cabo?

1.2.2. La descentralización analítica como respuesta

Según el último censo de hogares, en Uruguay hay 1 333 256 viviendas (Instituto Nacional de Estadística, 2011). Considerando por ejemplo para un análisis de plomo en cada vivienda, un mínimo de 5 ensayos, teniendo en cuenta las diferentes fuentes

de exposición en el hogar como paredes, puertas, ventanas, hasta juguetes potencialmente contaminados con dicho metal, se requerirían al menos un mínimo de 6 millones de análisis, sin duda un número de análisis utópico, económicamente inviable, además del tiempo que implicaría llevar adelante dicho proyecto y su logística. Disponer de técnicas analíticas sencillas en su aplicación para que cualquier persona pudiera llevarlas a cabo sería una alternativa viable a dicha utopía. Las técnicas colorimétricas cualitativas o semi-cuantitativas vienen dando respuestas desde hace décadas al diagnóstico, mediante el uso de *kits* confiables, ejemplos varios y de muy diversa aplicación, desde *kits* para analizar la potabilidad del agua, el contenido de vitamina de un alimento (Lisi et al., 2020), así como el test de embarazo o el análisis de glucosa en sangre, que comenzó siendo a través de tiras reactivas, luego glucosímetros portátiles; todos ejemplos claros de cómo un análisis químico puede ser confiable, aún llevado a cabo por una persona inexperta y en cualquier lugar físico (Xiang Y, 2011). ¿Es utópico pensar que muchos análisis en un futuro cercano puedan ser llevados a cabo en el hogar? ¿Reemplazarán estas metodologías a los grandes equipamientos y laboratorios? Sin duda para la confirmación de ciertos resultados es importante que este tipo de dispositivos o *tests* estén respaldados por técnicas robustas. Pero hay algo cierto, con el desarrollo de la nanotecnología, con el avance de la miniaturización, a partir de los transistores como componentes de circuitos electrónicos, el tamaño de los equipos ha cambiado, el ejemplo más sencillo para entender son las computadoras y los teléfonos celulares.

La respuesta a estas preguntas puede estar en el uso de metodologías analíticas descentralizadas que usen equipos y técnicas económicas, que puedan ser llevadas a cabo *in situ*, con tratamientos mínimos de las muestras analizadas de forma que permitan hacer estudios de *screening*. Un esquema comparativo de muestras

enviadas a ser analizadas de forma centralizada y no centralizada muestra claramente las ventajas involucradas (Figura 1.2).

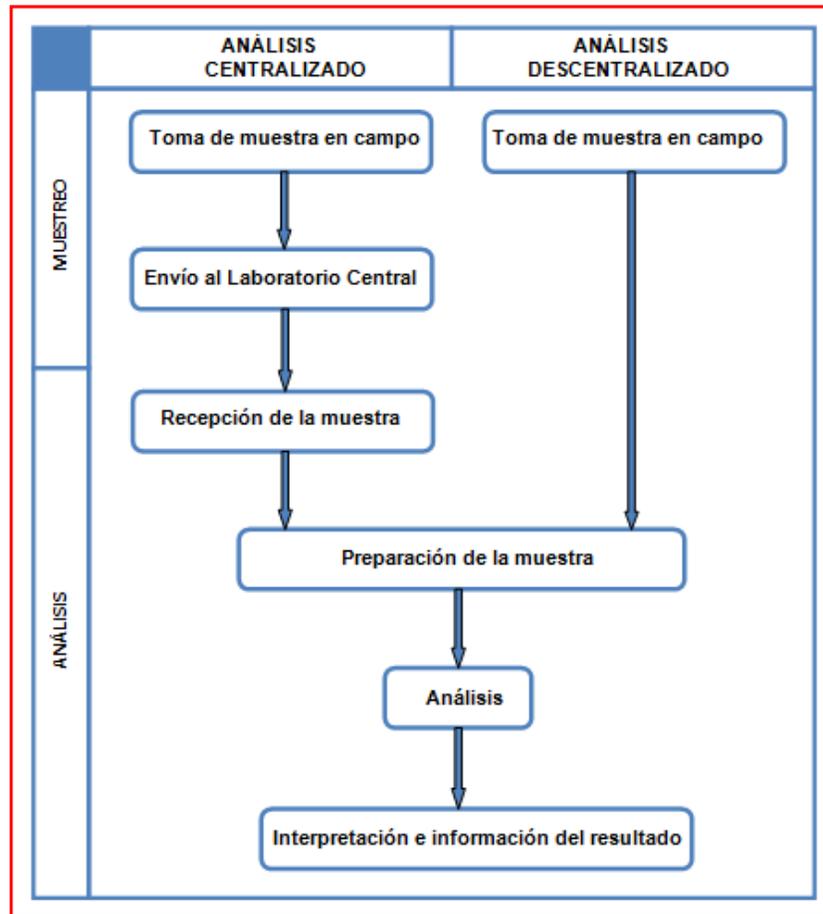


Figura 1.2. Esquema comparativo de las etapas de muestreo y análisis para el análisis centralizado y descentralizado Tomado de: Ansin et al., 2022.

En el análisis descentralizado, las etapas de envío de muestras a un laboratorio centralizado, su recepción y almacenamiento son eliminados, disminuyendo drásticamente los costos asociados.

1.3. Bibliografía del capítulo

- Acir, I. H., & Guenther, K. (2018). Endocrine-disrupting metabolites of alkylphenol ethoxylates – A critical review of analytical methods, environmental occurrences, toxicity, and regulation. *Science of the Total Environment*, 635, 1530–1546. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.079>
- Ansin, A., Botasini, S., & Méndez, E. (2022). CONVIVIR CON EL PLOMO Un aprendizaje necesario (Comisión Sectorial Educación Permanente (ed.); Primera Edición, Unidad de Comunicación de la Universidad de la República. <https://udelar.edu.uy/eduper/wp-content/uploads/sites/29/2022/09/plomoconv.pdf>
- Bali, D., Scaltrito, F., Teresa, M., Giardino, I., Pettoello-mantovani, M. & Pastore, M. (2023). The impact of the endocrine disruptors on child health. *Global Pediatrics*, 5 (May), 100069. <https://doi.org/10.1016/j.gped.2023.100069>
- Buck Louis, G. M., Zhai, S., Smarr, M. M., Grewal, J., Zhang, C., Grantz, K. L., Hinkle, S. N., Sundaram, R., Lee, S., Honda, M., Oh, J. K., & Kannan, K. (2018). Endocrine disruptors and neonatal anthropometry, NICHD Fetal Growth Studies – Singletons. *Environment International*, 119(February), 515–526. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.07.024>
- Carson, R. (1962). Silent Spring. Houghton Mifflin, Boston, USA.
- Centro de Información Oficial. (2011). Reglamentación sobre limitaciones al contenido de plomo en pinturas y barnices, Decreto N° 69/011. *Normativas y Avisos Legales del Uruguay*. <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/69-2011>
- Darbre, P. D. (2019). ScienceDirect The history of endocrine-disrupting chemicals. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, 7, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2019.06.007>
- EPA. (2023). *United States Environmental Protection Agency*. Obtenido de TSCA Chemical Substance Inventory: <https://www.epa.gov/tsc-a-inventory/how-access-tsc-a-inventory>. Actualizado al 21 de agosto del 2023.
- Esteban, S., Moreno-Merino, L., Matellanes, R., Catalá, M., Gorga, M., Petrovic, M., López de Alda, M., Barceló, D., Durán, J. J., López-Martínez, J., Valcárcel, Y., & Valcárcel, Y. (2016). Presence of endocrine disruptors in freshwater in the northern Antarctic Peninsula region. *Environmental Research*, 147, 179–192. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.01.034>
- Gingrich, J., Ticiani, E., & Veiga-Lopez, A. (2020). Placenta Disrupted: Endocrine Disrupting Chemicals and Pregnancy. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 31(7), 508–524.
- González-Alonso, S., Merino, L. M., Esteban, S., López de Alda, M., Barceló, D., Durán, J. J., López-Martínez, J., Aceña, J., Pérez, S., Mastroianni, N., Silva, A., Catalá, M., & Valcárcel, Y. (2017). Occurrence of pharmaceutical, recreational and psychotropic drug residues in surface water on the northern Antarctic Peninsula region. *Environmental Pollution*, 229, 241–254. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.060>

- Gupta, R., Kumar, P., Fahmi, N., Garg, B., & Dutta, S. (2020). Current Research in Green and Sustainable Chemistry Endocrine disruption and obesity: A current review on environmental obesogens. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 3(June), 100009. <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2020.06.002>
- Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Ström, A., Treuter, E., Warner, M., & Gustafsson, J. Å. (2007). Estrogen receptors: How do they signal and what are their targets. *Physiological Reviews*, 87(3), 905–931. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2006>
- Hu, W., Dong, T., Wang, L., Guan, Q., Song, L., Chen, D., Zhou, Z., Chen, M., Xia, Y., & Wang, X. (2017). Obesity aggravates toxic effect of BPA on spermatogenesis. *Environment International*, 105(March), 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.04.014>
- Iavicoli, I., Fontana, L., Leso, V., & Bergamaschi, A. (2013). The effects of nanomaterials as endocrine disruptors. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8), 16732–16801. <https://doi.org/10.3390/ijms140816732>
- Instituto Nacional de Estadística de Uruguay. (2001). Censos 2011. Dirección General de Estadísticas y Censos, Oficina de Planeamiento y Presupuesto de Uruguay. <https://www.ine.gub.uy/censos-2011>
- Javorac, D., Baralic, K., Maric, D., Mandi-Rajcevic, S., Dukic-Cosic, D., Bulat, Z. & Buha Djordjevic, A. (2023). Exploring the endocrine disrupting potential of lead through benchmark modelling – Study in humans. *Environmental Pollution*, 316 (October), 120428. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120428>
- Kang, I. H., Kim, H. S., Shin, J. H., Kim, T. S., Moon, H. J., Kim, I. Y., Choi, K. S., Kil, K. S., Park, Y. I., Dong, M. S., & Han, S. Y. (2004). Comparison of anti-androgenic activity of flutamide, vinclozolin, procymidone, linuron, and p, p'-DDE in rodent 10-day Hershberger assay. *Toxicology*, 199(2–3), 145–159. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.02.019>
- Lisi, F., Peterson, J. R., & Gooding, J. J. (2020). The application of personal glucose meters as universal point-of-care diagnostic tools. *Biosensors and Bioelectronics*, 148 (October 2019), 111835. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111835>
- Luo, R., Zhang, T., Wang, L. & Feng, Y. (2023). Emissions and mitigation potential of endocrine disruptors during outdoor exercise: Fate, transport, and implications for human health. *Environmental Research*, 236 (P2), 116575. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116575>
- Macedo, S., Teixeira, E., Bordeira, T., Boaventura, P., Alves, M., Miranda-Alves, L. & Soares, P. (2023). Endocrine-disrupting chemicals and endocrine neoplasia: A forty-year systematic review. *Environmental Research*, 218, 114869. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114869>
- Matthiessen, P. (2003). Historical perspective on endocrine disruption in wildlife. *Pure and Applied Chemistry*, 75(11–12), 2197–2206. <https://doi.org/10.1351/pac200375112197>

- Ministerio de Salud Pública. (2012). Certificado de Autorización de Importación de Biberones. *Sitio oficial de la República Oriental del Uruguay*.
<http://www.uruguay.gub.uy/guiatramitesestado/Archivos/41253985ORDENANZA%20PARA%20IMPORTACION%20DE%20BIBERONES%20158%20de%2021032012.pdf>
- Monneret, C. (2017). What is an endocrine disruptor? *Comptes Rendus – Biologies*, 340(9–10), 403–405.
<https://doi.org/10.1016/j.crvi.2017.07.004>
- Panagopoulos, P., Mavrogianni, D., Christodoulaki, Ch., Drakaki, E., Chrelias, G., Panagiotopoulos, D., Potiris, A., Drakakis, P. & Stavros, S. (2023). Effects of endocrine disrupting compounds on female fertility. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 88, 102347.
<https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2023.102347>
- Peivasteh-roudsari, L., Barzegar-bafrouei, R., Sharifi, K.A., Azimisalim, S., Karami, M., Abedinzadeh, S., Asadinezhad, S., Tajdar-oranj, B., Mahdavi, V., Alizadeh, A.M., Sadighara, P., Ferrante, M., Oliveri-Conti, G., Aliyeva, A. & Khaneghah, A.M. (2023). Origin, dietary exposure, and toxicity of endocrine-disrupting food chemical contaminants: A comprehensive review. *Heliyon*, 9 (7), e18140. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18140>
- Ramos Solano, M., Monserrat, A. Z., Garcia Castro, B., Jave Suarez, L. F., & Aguilar Lemarroy, A. (2015). Vía de señalización Wnt y cáncer cervicouterino. *Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 53(33), S218-24.
- Real Academia Española. (2022). Disrupción. En Diccionario de la lengua española online (€ 23.6). <https://€.rae.es/disrupci%C3%B3n>. Fecha de consulta: 03/03/2023.
- Rouiller-Fabre, V., Habert, R., & Livera, G. (2014). Effects of endocrine disruptors on the human fetal testis. *Annales d'Endocrinologie*, 75(2), 54–57. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2014.03.010>
- Sargis, R. M., & Simmons, R. A. (2019). Environmental neglect: endocrine disruptors as underappreciated but potentially modifiable diabetes risk factors. 1811–1822.
- Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E., & Main, K. M. (2001). Testicular dysgenesis syndrome: An increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Human Reproduction*, 16(5), 972–978. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.5.972>
- Škerlová, J., Ismail, A., Lindström, H., Sjödin, B., Mannervik, B., & Stenmark, P. (2021). Structural and functional analysis of the inhibition of equine glutathione transferase A3-3 by organotin endocrine disrupting pollutants. *Environmental Pollution*, 268.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115960>
- Sood, S., Shekhar, S., & Santosh, W. (2017). Dimorphic placental stress: A repercussion of interaction between endocrine disrupting chemicals (EDCs) and fetal sex. *Medical Hypotheses*, 99, 73–75. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2017.01.002>

- Stiefel, C. & Stintzing, F. (2023). Endocrine-active and endocrine-disrupting compounds in food – occurrence, formation, and relevance. *NFS Journal*, 31, 57-92. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2023.03.004>
- Stockholm Convention. (2001). Stockholm Convention on 19 persistent organic pollutants (POPs). <http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/The12InitialPOPs/tabid/296/Default.aspx>
- Thacharodi, A., Hassan, S., Hegde, T.A., Thacharodi, D. D., Brindhadevi, K. & Pugazhendhi, A. (2023 a). Water a major source of endocrine-disrupting chemicals: An overview on the occurrence, implications on human health and bioremediation strategies. *Environmental Research*, 231 (P1), 116097. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116097>
- Thacharodi, A., Hassan, S., Acharya, G., Vithlani, A., Hoang Le, Q. & Pugazhendhi, A. (2023 b). Endocrine disrupting chemicals and their effects on the reproductive health in men. *Environmental Research*, 236 (P2), 116825. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116825>
- Warner, G. R., Mourikes, V. E., Neff, A. M., Brehm, E., & Flaws, J. A. (2020). Mechanisms of action of agrochemicals acting as endocrine disrupting chemicals. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 502(October 2019), 110680. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110680>
- World Health Organisation/ European Centre for Environment and Health. (1996). European workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife (2-4 December 1996, Weybridge, UK). *Report of Proceedings, Publication EUR Paris: France, EUR 17549*, 1–127.
- World Health Organization & United Nations Environment Programme. (2021). Global Alliance to eliminate lead paint business plan. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-HEP-ECH-CHE-2021.03>
- Xiang Y, L. Y. (2011). Using personal glucose meters and functional DNA sensors to quantify a variety of analytical targets. *Nat Chem.*, 3(9), 697–703. <https://doi.org/doi:10.1038/nchem.1092>
- Zhang, J., Chen, Z., Shan, D., Wu, Y., Zhao, Y., Li, Ch., Shu, Y., Linghu, X. & Wang, B. (2024). Adverse effects of exposure to fine particles and ultrafine particles in the environment on different organs of organisms. *Journal of Environmental Sciences*, 135 (22), 449-473. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2022.08.013>
- Zhou, L., Xu, J., Zhang, J., Yan, Ch., Lin, Y., Jia, Y. & Hu, W. (2017). Prenatal maternal stress in relation to the effects of prenatal lead exposure on toddler cognitive development. *Neurotoxicology*, 59, 71-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2017.01.008>

Objetivos de la Tesis

El objetivo general de esta Tesis es proponer análisis descentralizados para dos disruptores endócrinos emergentes: plomo y nanopartículas de plata.

Para ello, hemos profundizado en varios temas conexos, que constituyen la base científica que sustentan la propuesta:

- Estudio de las diferentes alternativas analíticas que puedan ser descentralizables.
- Estudio de los factores específicos que afectan la medida descentralizada de cada uno de los disruptores endócrinos estudiados.
- Análisis de las características principales de los métodos analíticos propuestos.

Capítulo 2. Metodología general

Las metodologías empleadas en esta Tesis son diferentes, dependiendo del disruptor endócrino seleccionado. Al mismo tiempo, para cada disruptor se han seleccionado diferentes metodologías que caen dentro del campo de los “análisis descentralizados”. En este Capítulo se hará una breve descripción de las metodologías generales de laboratorio, con detalle en la información que se puede obtener de ellas, y posteriormente se hará una presentación de algunas metodologías que entran en la categoría “descentralizables”. En este último caso, se hará particular hincapié en la descripción de los sistemas de medida empleados y de su portabilidad. Cabe señalar que no en todos los casos se cuenta con material certificado de referencia para hacer la validación de las técnicas empleadas. En el caso de existir, se hace una presentación detallada de los métodos estadísticos empleados; en el caso contrario, se discutirá los problemas asociados a la falta de material de referencia y las aproximaciones que pueden realizarse.

El trabajo experimental fue llevado a cabo en su totalidad en el Laboratorio de Biomateriales del Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias (UdelaR). Las medidas de microscopía fueron realizadas en los Servicios Especializados de la Facultad de Ciencias.

2.1. Introducción

Dado que la Nanotecnología es una ciencia y tecnología completamente nueva, es necesario construir un sistema de estandarización desde cero, es decir, para estandarizar la terminología y la nomenclatura para describir y especificar todas las cosas, luego describir la instrumentación y los métodos de prueba y medición de nanomateriales, incluida la definición de materiales de referencia. Entonces la atención principal se centró en los problemas de modelado de nanomateriales, incluidos los problemas de seguridad de estos materiales y su impacto potencial sobre la salud humana y el medio ambiente en general. Una de las consecuencias principales que tiene la escala nanométrica, es el incremento de la reactividad del material como consecuencia del incremento en su relación superficie-volumen, lo que hace que las propiedades electrónicas, ópticas, químicas y mecánicas sean diferentes, a las de los materiales macroscópicos (Mourdikoudis et al., 2018). Las propiedades de las NPs se ven afectadas por el tamaño, la forma, la distribución de las coberturas orgánicas a nivel de la superficie, la agregación, la carga, así como el área superficial, lo que también repercute en sus potenciales aplicaciones. Contar con métodos de medidas robustos permitiría conocer mejor sus propiedades, así como la incorporación de los mismos para el control de las aplicaciones comerciales, además de dar sustento a las diferentes regulaciones que se puedan establecer a nivel mundial. Toma suma importancia la caracterización no sólo del núcleo metálico de la NPs sino de sus ligandos, porque constituyen la verdadera interface con el medio. El análisis de NPs de forma integrada cómo se hizo en este trabajo, es de gran aporte, dada la necesidad de una caracterización funcional desde diferentes aspectos, principalmente por la ausencia de protocolos y materiales de referencia confiables (Mourdikoudis et al., 2018). Las NPs tienen un gran potencial de

aplicaciones, aunque aún es muy primario el conocimiento en cuanto al impacto ambiental; en este sentido, disponer de metodologías para su mejor caracterización *in situ* también permitiría evaluar posibles riesgos de forma confiable.

Las principales metodologías empleadas en esta Tesis tienen base en medidas ópticas y en medidas electroquímicas. Esta separación es la base de las descripciones que se presentan a continuación.

2.2. Metodologías para los estudios ópticos

Las propiedades ópticas características de los nanomateriales es la base del uso de estas metodologías como aportes fundamentales para la caracterización de los nanomateriales. Por otra parte, las metodologías ópticas se han beneficiado de forma importante de la miniaturización, y en los últimos años, el uso de láseres y detectores ha revolucionado los análisis ópticos descentralizables.

2.2.1. Espectroscopía electrónica (UV/VIS)

La espectroscopía UV/VIS es una de las técnicas básicas para el estudio óptico de los materiales. La capacidad de las moléculas en solución de absorber radiación electromagnética constituye la base de la espectrometría UV/VIS, y la ley de Beer-Lambert (ec. 2.1) relaciona la atenuación debida a la absorción (absorbancia, A) con la concentración:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon b C \quad (\text{ec. 2.1})$$

donde I_0 es la intensidad de la luz incidente, I la intensidad de la luz no absorbida, C la concentración del analito, b el paso óptico (usualmente fijo en 1 cm) y ϵ la absorptividad, cuya unidad podrán tener base molar o base específica, dependiendo de las unidades de concentración (mol/L o g/L).

En el caso de las nanopartículas tenemos dos fenómenos responsables de la disminución de la intensidad de luz incidente: la absorción del material, y la dispersión, por tratarse de una dispersión y no de una solución verdadera. La suma de ambos fenómenos da lugar a una atenuación de la luz incidente, y por ese motivo se prefiere denominar a ϵ como “coeficiente de atenuación” (molar o específico).

Bases físicas de la absorción en nanopartículas metálicas

La absorción principal es debida a los “plasmones superficiales” un fenómeno conocido desde hace mucho tiempo, aunque sin haber tenido una explicación científica². El físico Michael Faraday (Faraday, 1857) describió a las partículas de metal presentes en una fina dispersión de oro coloidal como “muy diminutas en sus dimensiones” (Figura 2.1). Esta observación vendría a servir como base para la nanociencia y la nanotecnología modernas (Edwards & Thomas, 2007).

² En el pueblito de Frattesina (Rovigo, Italia), se encontraron vidrios, cuya composición de los elementos principales y la naturaleza de los elementos de pigmentación señalaban su origen en un taller de vidrio altamente especializado en la zona, durante la Edad del Bronce final (s.XII – s.X). Dentro de los elementos de pigmentación, se encontraron NPs de cobre metálico y cobalto. El control sobre el estado de oxidación del Cu en la capa superficial hizo posible producir superficies rojas sobre vidrios azules (Angelini et al., 2004). Otro ejemplo es la copa de Licurgo, de la época romana (s.IV), cuyo color cambia cuando se la ilumina desde diferentes lados: bajo la luz directa se asemeja al jade con un tono amarillo verdoso opaco, pero cuando la luz atraviesa el cristal (luz transmitida) se torna de un color rubí translúcido. Un análisis espectroscópico realizado en 1959 por el Museo Británico, arrojó que la copa contenía entre otros metales Au y Ag, los que serían responsables del complejo color y los efectos de dispersión del vidrio, el cual había sido tratado térmicamente, y que, a través de agentes reductores adecuados, se habían generado partículas de Au y Ag coloidales dentro del cristal, dando como resultado el efecto dicróico verde-rojo (Freestone et al., 2007).



Figura 2.1. Coloides de oro producidos por Michael Faraday en la década de 1850. Observar la dispersión de la luz láser producida por las NPs. Foto: Paul Wilkinson (Museo de Faraday, The Royal Institution, Londres, Inglaterra)

Una NP metálica se puede describir como una red de núcleos iónicos con electrones de conducción que se mueven casi libremente dentro de la misma (el mar de Fermi) como se ilustra en la Figura 2.2. Al incidir sobre la NP una onda electromagnética como la luz, puede ser la causante de la perturbación del equilibrio, en donde los electrones libres son impulsados a oscilar de forma coherente a una frecuencia resonante gracias al campo eléctrico generado (Figura 2.2). Para la mayoría de los metales, la frecuencia del plasmón se da en la región ultravioleta del espectro electromagnético, mientras que para metales alcalinos y algunos metales de transición como el Cu, Au y Ag se produce en la región del visible. Dado que la penetración de la onda electromagnética es limitada (menor a 50 nm para la Ag y Au), sólo son significativos los plasmones generados por electrones superficiales, por lo tanto, se lo conoce al fenómeno como resonancia del plasmón de superficie (Lu et al., 2009).

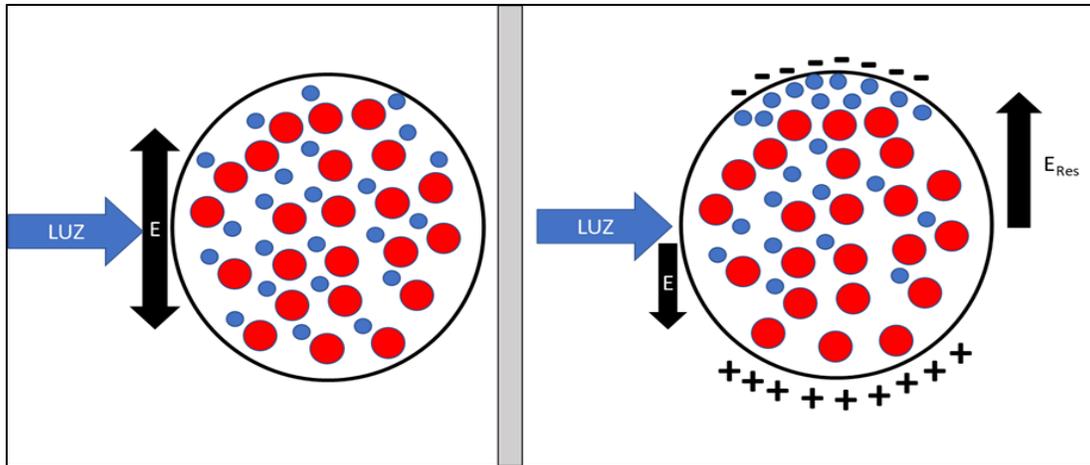


Figura 2.2. Representación esquemática de la interacción de la luz con una NP metálica. El campo eléctrico de la luz induce el movimiento de los electrones de conducción que se acumulan en la superficie del NP creando un dipolo eléctrico. Esta acumulación de carga crea un campo eléctrico opuesto al de la luz. Adaptado de (García, 2011).

Si la oscilación colectiva de electrones libres se limita a un volumen finito, como es el caso de una nanopartícula metálica, el plasmón correspondiente se lo llama “plasmón superficial localizado” (LSP) y al fenómeno “resonancia localizado del plasmón superficial” (LRSP). Se habla de “nanopartículas plasmónicas” a aquellas con un tamaño cercano o inferior a la longitud de onda de la luz incidente que muestran el fenómeno LRSP.

Para un metal “a granel” (*bulk*) de tamaño infinito, la frecuencia de oscilación natural, ω_p se puede describir mediante la ec. 2.2:

$$\omega_p = \sqrt{\frac{Ne^2}{\epsilon_0 m_e}} \quad (\text{ec. 2.2})$$

donde N es la densidad numérica de los electrones de conducción, ϵ_0 es la constante dieléctrica del vacío, e es la carga del electrón, y m_e es la masa efectiva del electrón.

Esta frecuencia de oscilación natural, ω_p se relaciona con su energía E_p , de acuerdo con Botasini, 2016:

$$E_p = H\omega_p \quad (\text{ec. 2.3})$$

donde H es la constante de Planck.

El campo eléctrico puede hacer que los electrones libres se alejen de la partícula del metal en una dirección (paralelo al campo eléctrico generado), creando un dipolo que puede cambiar de dirección con el cambio en el campo eléctrico (Figura 2.3).

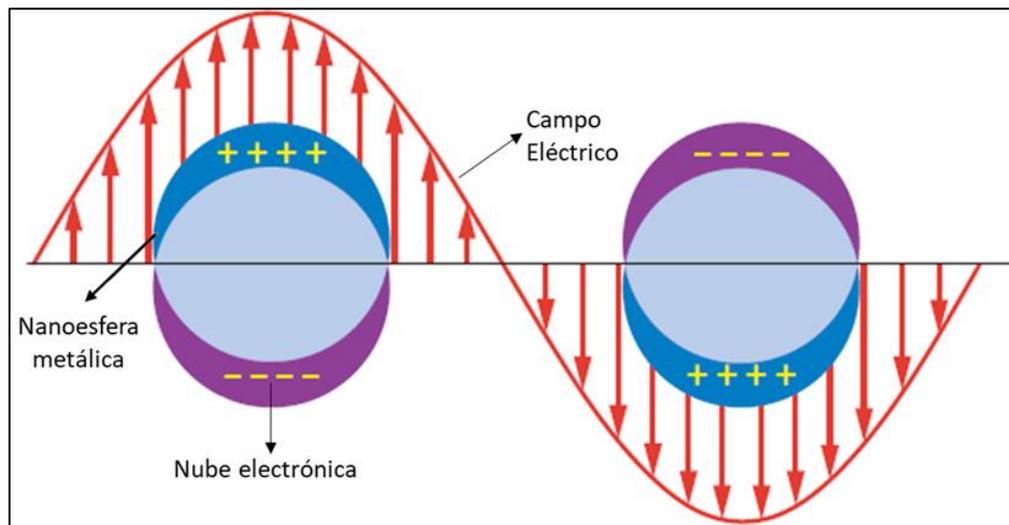


Figura 2.3. Oscilación de los plasmones superficiales localizados (LSP) de una nanoesfera metálica

Para NPs esféricas de Au y Ag, menores a 30 nm, se habla principalmente de la resonancia del plasmón “dipolar” para referirse a la mencionada oscilación colectiva de los electrones (Botasini, 2016). En NPs más grandes, se puede producir una

resonancia del plasmón “cuadripolar”, en donde existen dos polos cargados negativamente y dos polos cargados positivamente (Figura 2.4).

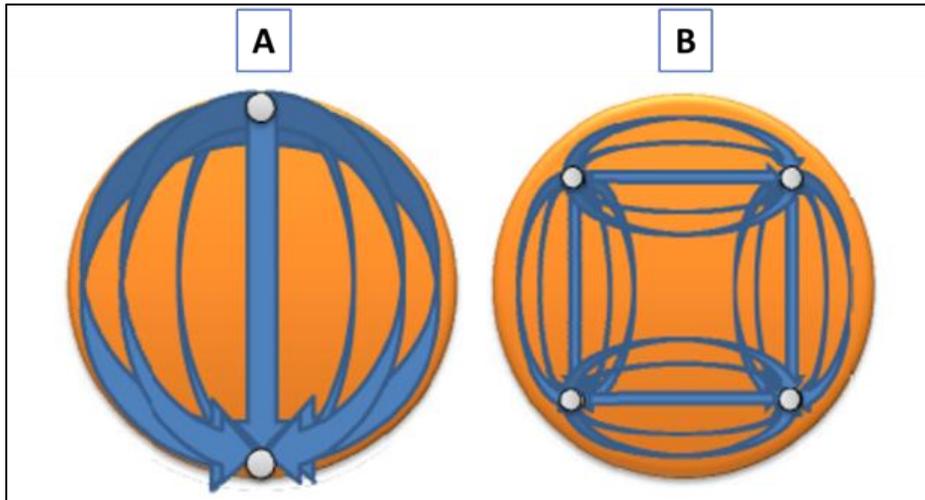


Figura 2.4. Resonancia del Plasmón. Oscilaciones de la nube electrónica del metal: A) Oscilación dipolar, B) Oscilación cuadripolar. Tomado de (Botasini, 2016).

Modelos y cálculos para plasmones superficiales

Un cálculo preciso de la frecuencia de la oscilación del plasmón superficial y la absorción de luz incidente requiere resolver las ecuaciones de electromagnetismo de Maxwell. Gustav Mie (1868-1957) llevó a cabo estos cálculos para la dispersión de la radiación electromagnética por una esfera isotrópica homogénea (Mie, 1908). La teoría de Mie proporciona una solución exacta para las NP esféricas asumiendo que no interactúan entre ellas, es decir, la distancia entre las NP es lo suficientemente grande como para que podamos suponer que el campo eléctrico creado por una NP no afecta al resto de ellas (García, 2011).

La frecuencia e intensidad de la resonancia del plasmón superficial está determinada por diferentes factores:

- **Tamaño.** Se pueden considerar dos situaciones: a) NPs más pequeñas que la longitud de onda de la luz incidente (hasta 50 nm de radio) y b) NPs más grandes que la longitud de onda de la luz incidente (Alharbi et al., 2022). El tamaño de la NP se verá reflejado principalmente en el ancho y la intensidad de la banda de resonancia, mientras que el efecto sobre la longitud de onda de resonancia es bastante reducido (Figura 2.5).

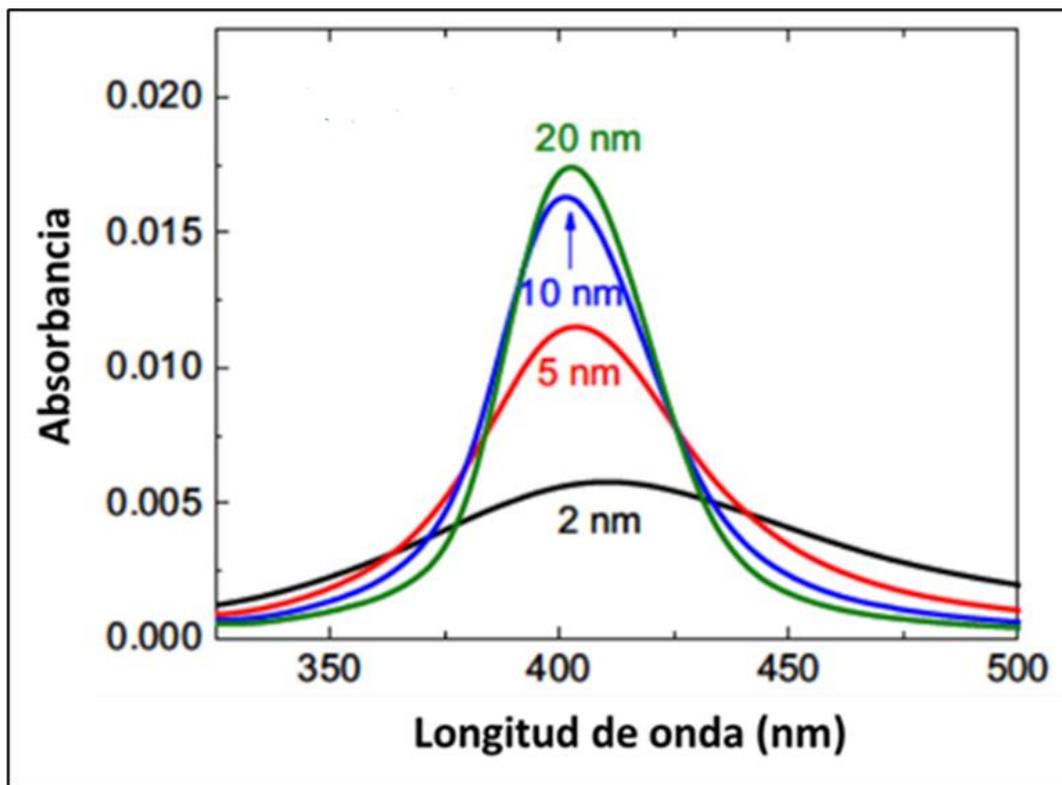


Figura 2.5. Espectro de absorción para AgNPs de diferentes tamaños calculado según la teoría de Mie. Imagen tomada de (García, 2011).

- **Forma.** La fuerza de restauración de los plasmones superficiales está relacionada con la carga acumulada en la superficie de la partícula, y por lo tanto dependerá de la geometría de la nanopartícula. Por ejemplo, para una nanovarilla (*nanorod*), la acumulación de carga en la superficie de la NP será diferente para las

oscilaciones de electrones a lo largo del eje de la varilla (plasmones longitudinales) y a lo largo de una dirección perpendicular (plasmones transversales) (Figura 2.6 a). En particular, la acumulación de carga será máxima para este último y mínima para el desplazamiento de electrones a lo largo del eje de la nanovarilla. La fuerza de restauración es proporcional a esta acumulación de carga y, por lo tanto, para los electrones que oscilan a lo largo del eje de la nanovarilla, deberíamos esperar fuerzas más pequeñas y, en consecuencia, frecuencias de resonancia más pequeñas (es decir, valores de LRSP más grandes). La frecuencia de resonancia de los plasmones transversales cae aproximadamente a la misma posición como para las NPs esféricas mientras que la resonancia de los plasmones longitudinales se desplaza hacia longitudes de onda más grandes cuando aumenta la relación de aspecto de las nanovarillas (Figura 2.6 b). Este comportamiento proporciona un método para sintonizar la LRSP a la longitud de onda deseada mediante el control de la relación de aspecto de la nanovarilla.

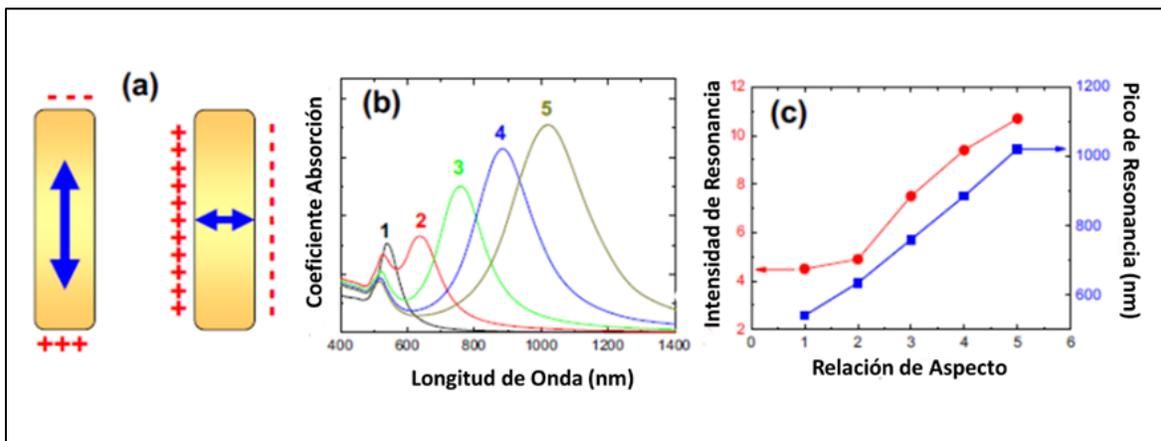


Figura 2.6. (a) Ilustración de la acumulación de carga para los plasmones superficiales longitudinales y transversales. (b) Espectros de absorción calculados para nanovarillas de Au con diferentes relaciones de aspecto indicadas en la figura. (c) Posición e intensidad de la LRSP longitudinal en función de la relación de aspecto de la nanovarilla. Imagen adaptada de (García, 2011).

Cualquier variación en la forma o tamaño de una partícula de metal que pueda alterar la polarización de la superficie provoca un cambio en la resonancia del plasmón. Esta dependencia ofrece la capacidad de adaptar la LSPR de nanopartículas metálicas a través de la síntesis controlada por forma. Para los casos de esferas, la teoría de Mie da una correcta solución (Mie, 1908). Para otras partículas con formas geométricas arbitrarias, se requieren cálculos numéricos con algunas aproximaciones. Entre los enfoques numéricos electromagnéticos disponibles, el método de aproximación de dipolo discreto (DDA) se ha utilizado ampliamente para simular la interacción de la luz con partículas metálicas de forma arbitraria (Yang et al., 1995). La Figura 2.7 compara los espectros LSPR calculados para nanopartículas de Ag de varias formas suspendidas en agua. Los espectros de extinción, absorción y dispersión para la esfera de Ag de 40 nm (Figura 2.7 a), se obtuvieron utilizando la teoría de Mie (Lu et al., 2009), mientras que el método DDA se utilizó para todas las demás formas. Los espectros calculados para la esfera de Ag de 40 nm muestran dos picos de resonancia: un pico de resonancia de dipolo principal a 410 nm y una resonancia de cuadrupolo más débil a 370 nm como un hombro. La resonancia dipolar surge de un lado de la superficie de la esfera que tiene carga positiva, mientras que el lado opuesto tiene carga negativa, lo que le da a la partícula un momento dipolar que invierte el signo a la misma frecuencia que la luz incidente. La resonancia cuadrupolar débil surge de pérdidas de energía que causan la falta de uniformidad de la luz incidente a través de la esfera y la formación de dos dipolos paralelos de signo opuesto.

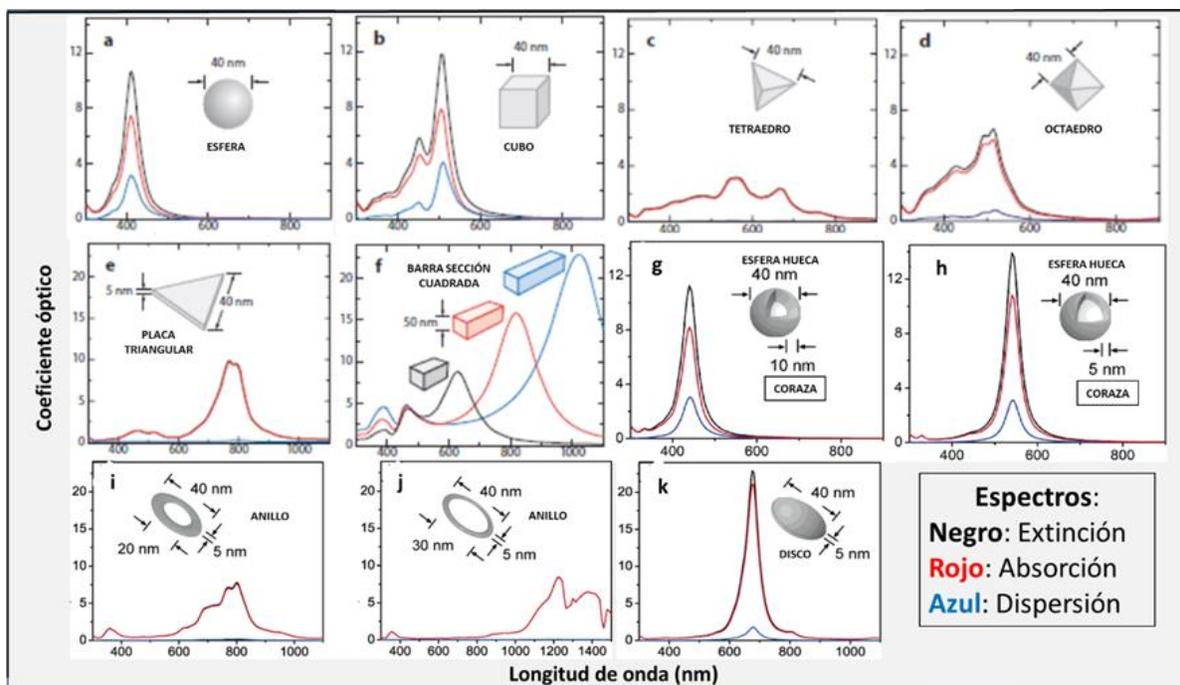


Figura 2.7. Espectros UV/VIS de nanoestructuras de plata y contribuciones calculadas para la extinción (negro), absorción (rojo) y dispersión (azul). Figura adaptada de (Lu et al., 2009; Wiley et al., 2006).

Los espectros de extinción, absorción y dispersión calculados por DDA de un cubo de Ag de 40 nm se muestran en la Figura 2.7 b. A diferencia de la nanoesfera, el nanocubo tiene varias simetrías distintas para la resonancia dipolar, que dan lugar a más picos. La posición del pico más intenso del nanocubo está desplazado hacia el rojo en comparación con la de la esfera. Este cambio es debido a la acumulación de cargas superficiales en las esquinas del nanocubo y se observa, en general, para cualquier nanopartícula con esquinas afiladas. Para estas nanoestructuras, la mayor separación de carga genera una reducción en la fuerza de restauración para la oscilación de electrones, lo que resulta en un cambio en el pico de resonancia a una energía más baja. Siguiendo esta tendencia, tanto un tetraedro como un octaedro deberían mostrar más picos de LSPR desplazados hacia el rojo porque tienen esquinas aún más nítidas que los cubos (Figura 2.7 c y Figura 2.7. d respectivamente).

La Figura 2.7. e muestra los espectros calculados para una placa triangular. Como estructura anisotrópica bidimensional, facilita una mayor separación de carga cuando se polariza a lo largo de uno de sus bordes. Como resultado, los espectros exhiben picos desplazados hacia longitudes de onda más largas. Aunque las esquinas afiladas aumentan la separación de carga y dan como resultado una LSPR desplazada hacia el rojo, la simetría de la partícula determina la intensidad de las resonancias dipolares. Así, una placa triangular truncada en las esquinas o una placa circular muestra picos más intensos que una placa triangular debido a su mayor simetría; sin embargo, sus resonancias primarias están desplazadas hacia el azul en relación con las de una placa triangular con esquinas afiladas. Los espectros de extinción de nanobarras 1D con diferentes relaciones de aspecto, se muestran en la Figura 2.7 f. Al controlar la relación de aspecto de la nanobarra, las posiciones de los picos de resonancia de tales nanopartículas 1D se pueden ajustar desde el visible hasta el infrarrojo cercano; esta propiedad hace que las nanobarras y otras nanopartículas 1D sean potencialmente muy versátiles. Específicamente, para las nanobarras de Ag con relaciones de aspecto de 2, 3 y 4, la polarización longitudinal produce picos de resonancia dipolar a 700, 900 y 1100 nm, respectivamente, con una intensidad de dispersión de luz proporcional a la relación de aspecto (Lu et al., 2009). En las Figura 2.7 i y Figura 2.7 j, se presentan dos estructuras anisótropas 2D, nanoanillos de diferente espesor, se observa cómo los picos de resonancia se desplazan hacia el infrarrojo cuánto más delgado es el espesor del anillo, esto se debe a que estas nanoestructuras 2D permiten una mayor separación de carga si se polarizan a lo largo de su eje largo y, por lo tanto, muestran picos que se desplazan hacia el rojo desde nanoestructuras más isotrópicas (Wiley et al., 2006). Si se comparan las nanoestructuras 2D, tanto la placa triangular (Figura 2.7 e) como el disco circular (Figura 2.7. k), en éste, el pico de resonancia del dipolo está desplazado

hacia el azul en comparación con la placa triangular, debido a que carece de esquinas afiladas, pero el disco absorbe y dispersa más luz debido a que su simetría circular le da un momento dipolar efectivo mayor. Existe una mayor separación de carga si existen esquinas afiladas y hay un desplazamiento del pico de resonancia hacia el rojo, aunque la intensidad del pico del dipolo depende de la simetría de la nanoestructura (Wiley et al., 2006). El pico de resonancia es menos intenso que en el disco, lo que no ocurría en el caso de la esfera sólida y la esfera hueca, en donde en ésta última la mayor separación de carga generaba una mayor intensidad. Entre el disco y el anillo esto no ocurre debido probablemente a un menor momento dipolar más pequeño en los anillos, esto también fue observado para los espectros de nano anillos y discos de oro, en donde se observó que los anillos presentaban un área de sección transversal más pequeña a la luz incidente (Aizpurua et al., 2003).

- **Medio que rodea las NPs.** La excitación de los plasmones superficiales no depende solo de las características de las NPs, sino que también se modifica significativamente por el medio que las rodea. Por un lado, la función dieléctrica del medio circundante determina la longitud de onda de la luz en la vecindad de la NP, alterando así la geometría del campo eléctrico en la superficie de las NP. Pero el efecto más importante está relacionado con la polarización del medio (Garcia, 2011). Durante la excitación de los plasmones superficiales, la acumulación de carga crea un campo eléctrico en la vecindad de los NP (además del de la luz incidente) que induce la polarización del medio dieléctrico, lo que resulta en una acumulación de carga en los bordes del medio (es decir, en la interfaz entre el dieléctrico y las NP metálicas) que compensará parcialmente la acumulación de carga debida al movimiento de los electrones de conducción en las nanopartículas. Esta reducción de carga dependerá de la función dieléctrica del medio (ϵ_m) al ser mayor ϵ_m , mayor

será la carga de polarización y, por lo tanto, mayor será el efecto sobre el plasmón superficial. La reducción de la carga neta en la superficie NP implica una reducción en la fuerza de restauración. Para un oscilador, es bien sabido que la reducción de la fuerza de restauración conduce a una frecuencia de resonancia más pequeña. Por lo tanto, aumentar la constante dieléctrica de los medios circundantes desplazará la banda resonante SP hacia longitudes de onda más grandes (es decir, frecuencias más pequeñas).

La Figura 2.8 muestra los espectros de absorción para AuNPs de 10 nm de diámetro embebidas en medios de diferentes funciones dieléctricas. El medio circundante tiene un efecto limitado sobre el ancho de banda (medido en eV), que está relacionado principalmente con el tamaño de las partículas. La intensidad de resonancia también aumenta con la función dieléctrica del medio. Este es el comportamiento esperado para un oscilador forzado: cuando la frecuencia de resonancia disminuye, la amplitud de resonancia aumenta. Las NPs obtenidas por rutas químicas comúnmente se recubren con moléculas orgánicas para evitar la aglomeración. Estos agentes de recubrimiento tienen un efecto significativo en las características del plasmón superficial ya que representan el primer entorno de la NPs. Además, la fuerza de las interacciones entre las NPs y las moléculas induce un efecto extra. La modificación de la configuración electrónica de NP debido a los enlaces superficiales modifica las condiciones de oscilación de los electrones, dando lugar a variaciones en el espectro de SP que pueden utilizarse para investigar las características de estos enlaces (Garcia, 2011).

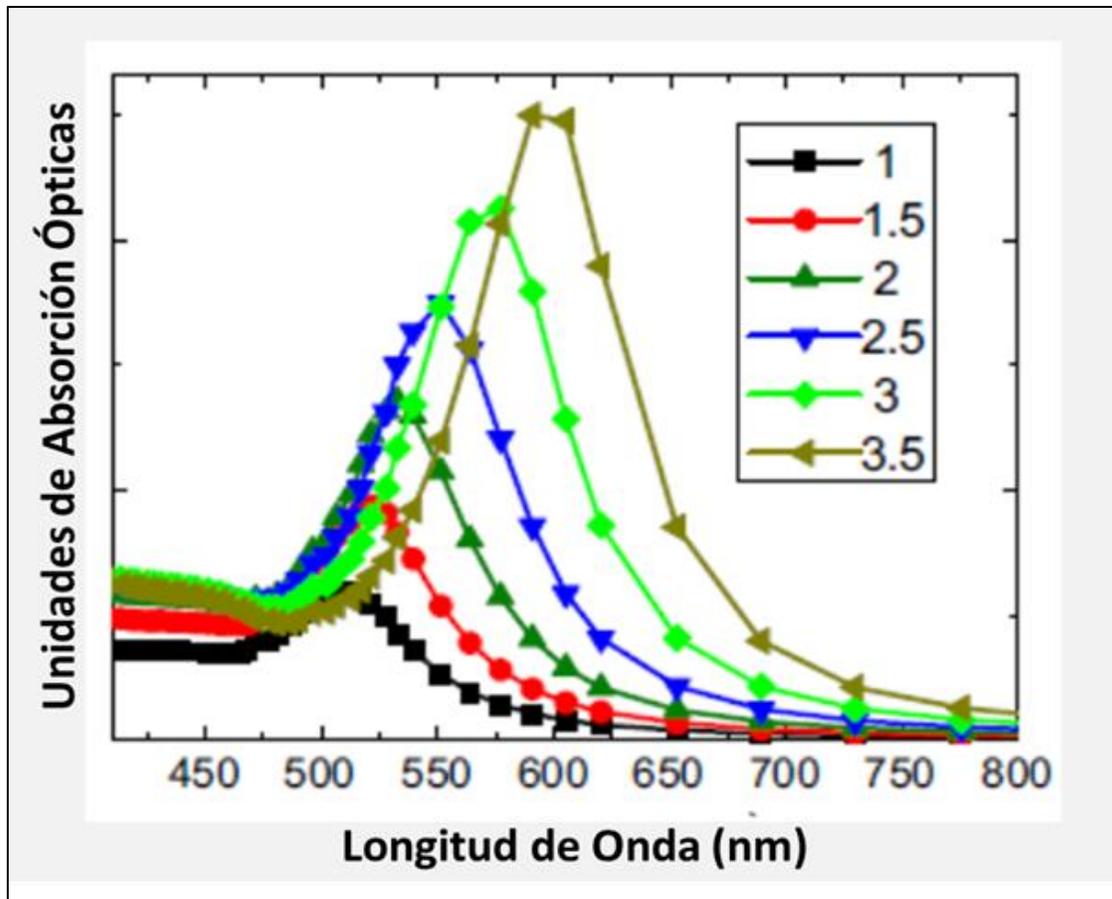


Figura 2.8. Espectros de absorción UV/VIS de AuNPs de 10 nm, en un medio dieléctrico con diferentes funciones dieléctricas calculadas de acuerdo a la teoría de Mie. Figura adaptada de (García, 2011).

- **Interacciones de las NP.** La excitación de los plasmones superficiales induce un campo eléctrico en la vecindad de las NPs, y si éstas están lo suficientemente cerca, el campo neto aplicado será el de la luz incidente más el campo creado por el resto de las NPs. Por lo tanto, las condiciones resonantes se verán modificadas. En general, la interacción de interpartículas desplaza hacia el rojo la banda de resonancia (Figura 2.9).

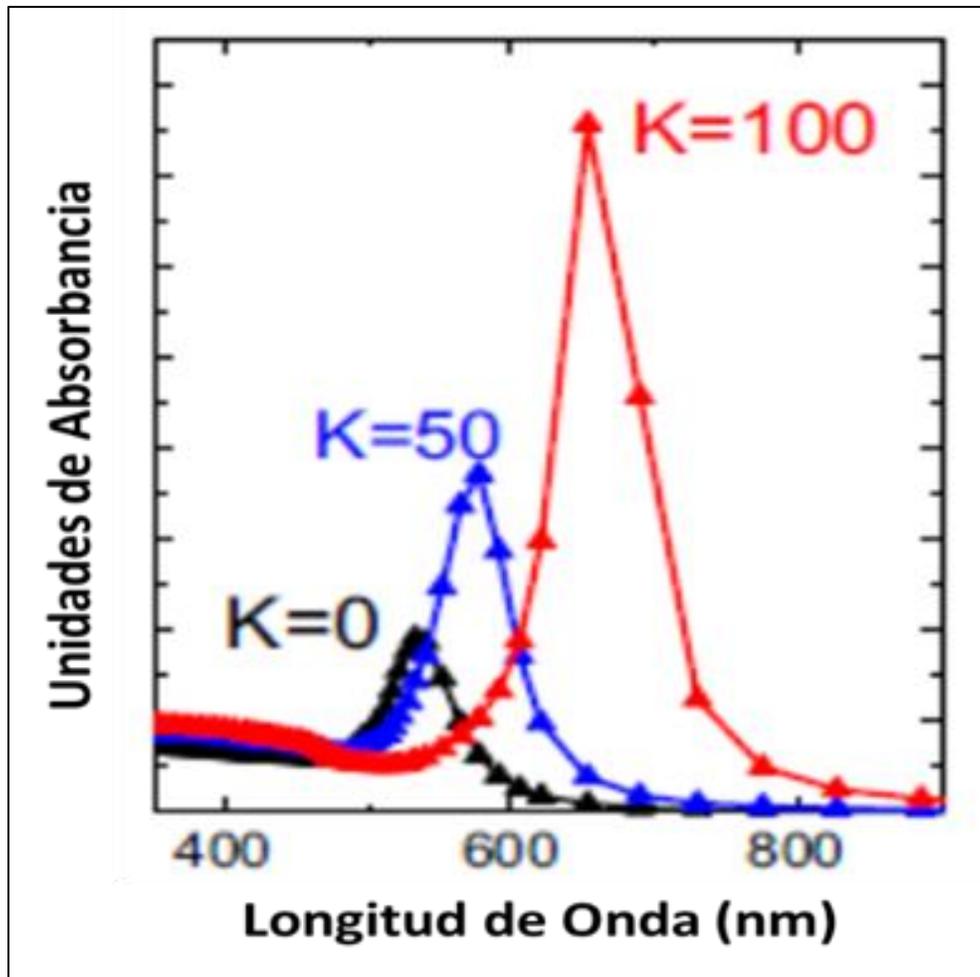


Figura 2.9. Espectros de absorción UV/VIS para AuNPs con interacciones dipolares. El parámetro K representa la intensidad del campo eléctrico creado en una posición de la NP por el resto de las NPs. Adaptado de: Garcia, 2011; Garcia et al., 1999.

2.2.2. Dispersión dinámica de luz (DLS)

La detección de la dispersión de la luz en la materia es una técnica útil con aplicaciones en numerosas disciplinas científicas en las que, dependiendo de la fuente de luz y del detector, pueden estudiarse propiedades específicas de las moléculas. Normalmente se expone a la muestra a un haz monocromático de luz, mientras que un detector registra la luz dispersada en un ángulo determinado (Stetefeld et al., 2016).

La DLS mide la intensidad de la luz dispersada en el tiempo. Para partículas pequeñas, la difusión es más rápida, y la correlación de fotones se pierde rápidamente. Sin embargo, las partículas grandes que difunden más lentamente, la similitud de las intensidades a lo largo del tiempo persiste durante períodos más largos, lo que lleva a que la correlación de fotones tarde más tiempo en decaer (Figura 2.10) (Botasini, 2016).

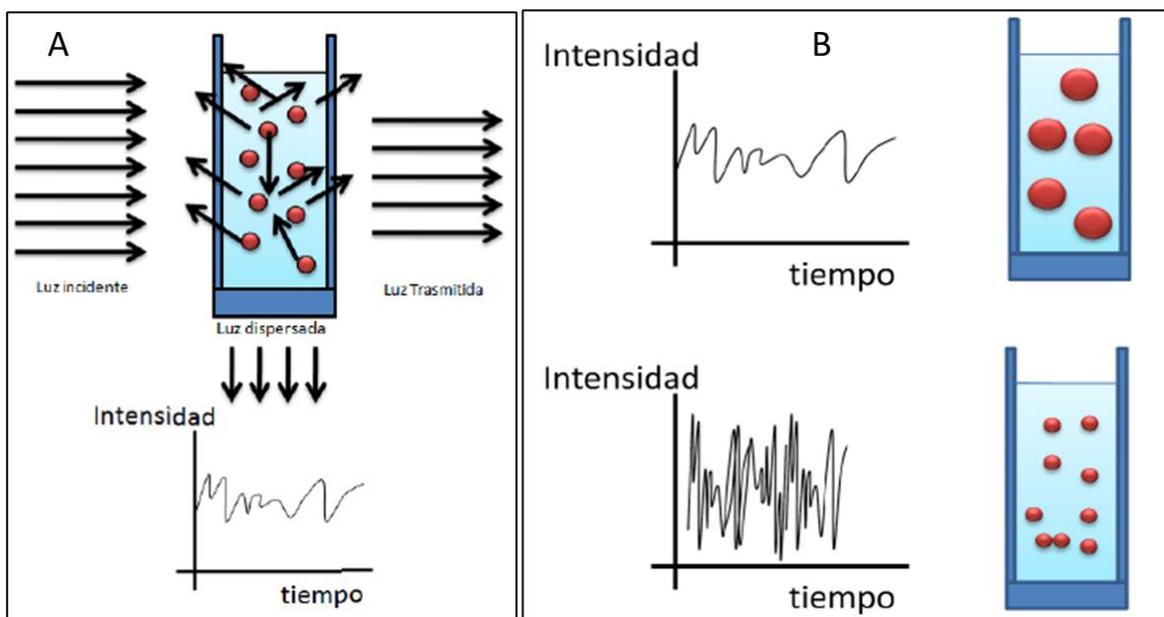


Figura 2.10. Esquema de funcionamiento de un DLS. A) La luz dispersada con fluctuaciones aleatorias es captada por el fotodetector ubicado a 90° respecto a la luz incidente del láser. B) Correlación entre el tamaño de las partículas y la velocidad de cambio de las fluctuaciones de intensidad. Tomado de: Botasini, 2016.

La técnica se basa en extrapolar las medidas de tamaño de las partículas a partir de los coeficientes de difusión que surgen como resultado del movimiento browniano, de acuerdo con la ecuación de Stokes-Einstein (Kumar et al., 2006):

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_h} \quad (\text{ec. 2.4})$$

donde D es el coeficiente de difusión (en cm^2/s), k_B es la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta, η la viscosidad del medio y r_h el radio hidrodinámico.

Cuando en DLS se habla de tamaño de partícula, se entiende al diámetro de la esfera que difunde a la misma velocidad que la partícula medida. En otras palabras, en DLS se asume que todas las partículas son esféricas y que los agregados se comportan como una sola entidad de mayor tamaño. Esto será particularmente importante a la hora de elegir correctamente la técnica a utilizar para el sistema concreto que se quiera analizar, dado que las medidas de tamaño pueden variar sustancialmente dependiendo del método de medida. Como consecuencia del movimiento browniano de las partículas, la intensidad de luz dispersada que llega al detector, no es la misma, debido al cambio constante de posición de las partículas, lo que hace que el patrón de interferencia de la onda luminosa también cambie (Botasini, 2016). Las variaciones son aleatorias, pudiendo aumentar o disminuir, aunque la magnitud del cambio respecto al tiempo, depende del coeficiente de difusión de las partículas, o sea de su tamaño. Por lo tanto, existe una cierta correlación entre la intensidad determinada en un instante dado y la intensidad medida en el instante siguiente. Matemáticamente la función que compara una medida consigo misma a lo largo del tiempo se denomina función de autocorrelación y es el fundamento básico de los equipos de DLS (Botasini, 2016).

2.2.3. Medidas de color

La colorimetría (medida del color) fue de las primeras técnicas analíticas en ser desarrolladas, ya que se asocia a una simple percepción visual. Aquellas sustancias

que frente a un dado analito producen una solución coloreada se denominaron “agentes colorimétricos” y su síntesis constituyó la base de una amplia gama de reacciones analíticas más o menos específicas, favorecidas por una cómoda percepción visual gracias a valores de coeficiente de extinción molar del orden de $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, con límites de detección del orden 10^{-6} M (Feigl & Anger, 1972). Posteriormente, el desarrollo de técnicas con mejor límite de detección, sensibilidad y selectividad fueron el objeto de estudios durante muchas décadas.

Hacia fines del s.XX, la necesidad de realizar múltiples análisis en campo para la detección de focos de contaminación, o para el seguimiento de la población frente a ciertas enfermedades, mostró que el uso de la tecnología desarrollada en los años anteriores resultaba en un costo prohibitivo para los organismos de control. Asimismo, la monitorización continua de pacientes a pie de cama en los hospitales impulsó el desarrollo de sistemas de respuesta rápida que pudieran ser operados fuera de los laboratorios centrales, conocidos como sistemas *point of care* (Chokkareddy et al., 2022; Salimiyan rizi, 2022). Las técnicas colorimétricas desarrolladas un siglo atrás volvían a ser atractivas, pero sus límites de detección no siempre resultaban adecuados para los fines empleados. En este marco, los incipientes estudios en nanociencias aportarían una solución tentadora al problema, ya que al presentar coeficientes de extinción molar del orden de $10^8 - 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, se pueden alcanzar, teóricamente, límites de detección del orden de 10^{-11} M .

Dos publicaciones constituyeron verdaderos hitos en relación al uso del conocimiento derivado de las nanociencias en sus posibilidades de aplicaciones nanotecnológicas en química analítica. El primero de ellos, surgido del grupo de Mirkin (Mirkin et al., 1996), demuestra cómo la agregación de nanopartículas inducida por un analito puede usarse como respuesta analítica. Este artículo abrió

el camino al desarrollo de sensores modificando la naturaleza química de los agentes estabilizantes de las nanopartículas, proveyéndoles de la selectividad necesaria para cumplir su rol de identificación del analito, y aprovechando las propiedades fotónicas como respuesta analítica. De hecho, este artículo se considera como el que dio pie al nacimiento de los nanosensores. El segundo artículo tiene relación con las actividades prácticas de uso de dispositivos descentralizables para el monitoreo de un dado analito (Xiang & Lu, 2011). En este artículo se demuestra cómo un glucosímetro personal podía ser utilizado para detectar una variedad amplia de analitos, abriendo las puertas a un nuevo concepto: el análisis llevado a cabo por el público en general. Este concepto ya se encuentra bien aceptado por la población, no solo en el seguimiento personal de los pacientes diabéticos, sino en los tests de embarazo, en la medida del cloro de las piscinas, abriendo el campo de aplicaciones a los *wearable sensors* (Kristoffersson & Lindén, 2022; Liu et al., 2021; Wang et al., 2023; Yi & Xianyu, 2022).

A medida que nos alejamos de los laboratorios centralizados, las técnicas analíticas necesitan ser más robustas, de fácil operación y, sobre todo, de lectura fácil e inequívoca. Muchos de los nuevos métodos desarrollados dependen de la detección visual, un aspecto íntimamente ligado a la fisiología del operador y, por lo tanto, expuesto a la subjetividad.

Definiciones clásicas y actualizaciones. La definición del color no puede ser separada de la percepción humana del mismo, que depende de cómo nuestro cerebro procesa la información de la longitud de onda de la luz reflejada en nuestros ojos (Meinzer, 2018). Para contar con un sistema que pueda definir cuantitativamente un color, se desarrollaron métodos que mimetizan la fisiología de la visión. La percepción del color tiene lugar en la retina, donde dos tipos de células

fotoreceptoras, denominadas “conos”, responden en forma diferente a diferentes longitudes de onda centradas en los valores correspondientes al azul (426 nm), verde (530 nm) y rojo (555 nm) (Merbs & Nathans, 1992). Estos tres colores se denominan primarios, en el sentido que ninguna mezcla de ellos puede dar lugar al restante color. Nuestra percepción del color resulta, entonces, de la respuesta espectral combinada de estas células en función de sus sensibilidades espectrales relativas. Para tener en cuenta todos estos aspectos, se desarrolló el espacio de color CIE (Comission Internationale de l'Éclairage) en 1931 (Broadbent, 2004), que fuera recientemente actualizado por un sistema de relevancia fisiológica (Stockman, 2019), basado en las sensibilidades espectrales de los conos en la retina (Stockman et al., 1993).

Diagramas CIE y L*a*b*. Los diagramas CIE muestran todas las gamas de colores que puede percibir una persona media, y se conoce como “gama de visión humana”. La curva en forma de pie de caballo representa las referencias espectrales de la luz monocromática, es decir, un matiz puro de una longitud de onda específica (Figura 2.11a). La reciente actualización de este diagrama (Figura 2.11b) teniendo en cuenta los aspectos fisiológicos de la precepción del color, mejora la línea espectral izquierda (bajas longitudes de onda espectrales), y produce una localización diferente de las longitudes de onda espectral.

Este diagrama resulta de gran utilidad cuando se quiere encontrar los colores generados por la mezcla aditiva de colores (Figura 2.11c). La línea que une dos puntos cualesquiera del diagrama representa la variedad de colores que se pueden obtener. Por otra parte, la línea que une un punto cualquiera del diagrama con el punto correspondiente al color blanco (punto N) muestra la intensidad para un cierto matiz, cuyo color espectral será la extrapolación de esa recta hasta la línea del

color espectral. El punto de intersección más cercano al color en cuestión revela la longitud de onda dominante del color como la longitud de onda del color espectral puro en ese punto de intersección. El punto de intersección en el lado opuesto del espacio de color da la longitud de onda complementaria, que cuando se agrega al color en cuestión en la proporción correcta dará el color del iluminante. Otro diagrama útil relacionado con la colorimetría es el diagrama CIELAB, donde se evalúan los parámetros L^* , a^* y b^* , relacionados matemáticamente con los parámetros x e y de los diagramas de cromaticidad (Figura 2.12).

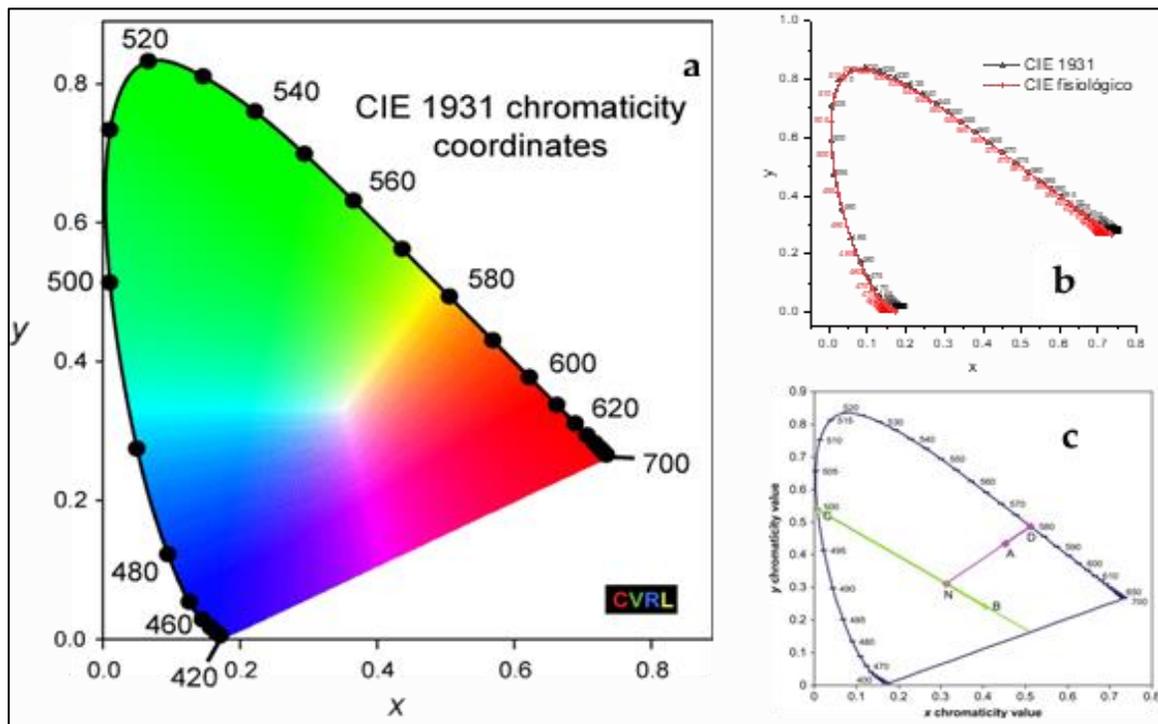


Figura 2.11. (a) Diagrama de cromaticidad, indicando las longitudes de onda de pureza espectral. (b) Modificaciones del diagrama CIE al emplear valores en el eje de relevancia fisiológica. (c) Cálculos que se pueden realizar por medidas dentro del diagrama.

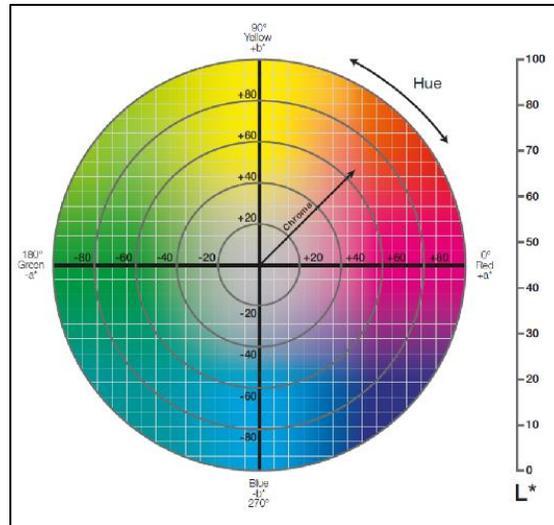


Figura 2.12. Diagrama 2D CIELAB

Este diagrama se divide en cuadrantes y resultan útiles para conocer cómo cambia el color en un determinado proceso. Aquellos procesos que se produzcan cambiando los cuadrantes son los más notorios a la vista, y por lo tanto constituyen sensores ópticos de mejor calidad. En base a ellos es posible establecer los límites para un cambio perceptible en base a los cambios en los parámetros L^* , a^* y b^* .

Color espectral. El "color espectral" es el que corresponde a una longitud de onda pura en el espectro visible, denominada longitud de onda espectral (λ_{esp}). Constituyen la base de todos los colores, ya que los mismo surgen de la mezcla de colores espectrales. Tradicionalmente se separan en rangos de longitudes de onda para las que se define el nombre de un color (Tabla 2.1). La longitud de onda espectral está, entonces, relacionada con el color evocado por un observador estándar, y el color asignado es el color comúnmente percibido.

Tabla 2.1. Denominación común de los colores puros (colores evocados), y sus longitudes de onda

Denominación del color	λ_{esp} (nm)
Violeta	380 – 430
Índigo	430 – 460
Azul	460 – 500
Cian	500 – 520
Verde	520 – 565
Amarillo	565 – 590
Naranja	590 – 625
Rojo	625 – 740

2.2.4. Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)

Cuando queremos llegar a ver en el mundo “nano”, sin duda el concepto de resolución es fundamental, el cual se puede definir como la distancia más pequeña que es posible observar con un instrumento óptico, y depende de varios factores como, la longitud de onda de la fuente de iluminación y los defectos de las lentes (Reyes Gasga, 2020). Actualmente con la corrección de las aberraciones de las lentes, en lo que concierne a la TEM se ha alcanzado la resolución de 0.1 nm, lo que la hace ideal para estudiar el mundo “nano”. Los parámetros relevantes en esta disciplina son la resolución espacial, la resolución analítica y la sensibilidad del método (Calderón, 2020). El TEM, es un instrumento de alta resolución, basado en el uso de un haz de electrones acelerados, en lugar de la luz, como en los microscopios convencionales (Botasini, 2016).

El TEM utiliza un haz de electrones acelerado mediante una diferencia de potencial que varía entre 50 y 200 kV. Cuanto mayor es el voltaje de aceleración mayor es la velocidad de los electrones y en consecuencia menor es la longitud de onda del haz. Aunque el haz de electrones permite aumentar considerablemente el poder de resolución, a diferencia del microscopio óptico, las lentes magnéticas del TEM requieren de ángulos de aperturas pequeños para minimizar las distorsiones causadas por aberraciones de la lente. A pesar de esto, en el balance neto, el poder de resolución del microscopio electrónico es 1000 veces mayor al del microscopio óptico. Los electrones de una fuente entran en la muestra, se dispersan y se enfocan con un lente objetivo. La señal resultante es amplificada proyectándose una imagen de la muestra sobre una pantalla fluorescente. Dichas imágenes se forman porque los distintos átomos de la muestra interactúan y absorben electrones en diferente forma (Botasini, 2016).

Las imágenes TEM permiten entonces valorar el tamaño del núcleo metálico de las NPs, no así su capa exterior orgánica, por lo que la información que provee es complementaria al de tamaño hidrodinámico por DLS. Los protocolos TEM para NPs indican el registro de varias imágenes de distintos campos, con un contenido en cada campo de una cantidad suficiente de NPs como para totalizar un número no menor de 300 – 400. Con base en estas observaciones, se hace un estudio estadístico para obtener una caracterización de la población, y se lleva a cabo un estudio de la distribución de tamaño, usualmente del tipo lognormal:

$$F(d) = y_o + \frac{A}{\sqrt{2\pi\omega d}} \exp \left[-\frac{(\ln(d/d_o))^2}{2\omega^2} \right] \quad (\text{ec. 2.5})$$

donde y_0 es el promedio del tamaño de la muestra, ω es el ancho de medio pico y d_0 es el valor medio de la distribución.

2.3. Metodologías para los estudios electroquímicos

El uso de la electroquímica a lo largo de la historia como una técnica sensible ha tomado un nuevo impulso en las últimas décadas, gracias a numerosas aplicaciones asociadas a ellas (Zumbragel, 2013). El desarrollo de sensores electroquímicos es una de las áreas de investigación de mayor desarrollo en los últimos años. La sustitución de los electrodos clásicos por sistemas electródicos serigrafados, o la inclusión de sistemas microfluídicos, ha revolucionado el electroanálisis, permitiendo la detección sensible de moléculas biológicas o contaminantes ambientales de bajo nivel. Las nuevas técnicas de producción de electrodos, como las técnicas de serigrafía, ha generado una nueva generación de electrodos miniaturizados que conjuntamente con el desarrollo de la electrónica ha permitido generar sistemas que pueden ser utilizados *in situ* para la determinación de diferente tipo de moléculas.

2.3.1. Voltamperometría cíclica (CV)

Se trata de una técnica donde se analiza la variación de la corriente a medida que se modifica el potencial. A medida que se barre el potencial, las reacciones redox que ocurren en el electrodo de trabajo dan como resultado un flujo de corriente. Esta técnica se basa en aplicar un barrido de potencial al electrodo de trabajo tanto en el sentido directo como en el inverso (barrido triangular) a una velocidad de barrido prefijada.

El potencial se mide entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia, mientras que la corriente se mide entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo.

El potenciostato mide esta corriente y la representa en función del potencial aplicado. El gráfico resultante se denomina voltamperograma o voltamperograma cíclico, y cuando las especies que experimentan los cambios electroquímicos se encuentran en solución, el voltamperograma es el que se muestra en la Figura 2.13. La CV aporta información valiosa en cuanto al sistema electroquímico en estudio. En el voltamperograma se observan varios picos, cada uno corresponde a un proceso electroquímico particular, y la altura del pico está relacionada con la concentración del analito. La integración de la curva CV proporciona información directa sobre la cantidad de carga transferida durante la reacción electroquímica. En general, la voltamperometría cíclica es una técnica poderosa que proporciona una gran cantidad de información sobre las propiedades electroquímicas, la cinética, la concentración y las características superficiales de las especies químicas.

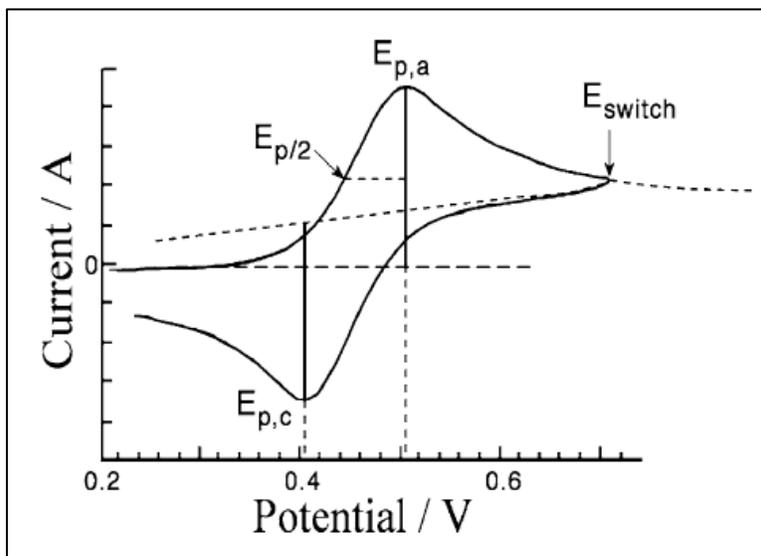


Figura 2.13. Voltamperograma típico en un sistema reversible. E_{pc} y E_{pa} : potenciales catódico y anódico para la intensidad de corriente máxima catódica (I_{pc}) y anódica (I_{pa}).

Cuando la especie que experimenta los cambios electroquímicos está adsorbida sobre el electrodo de trabajo, se puede conocer la cantidad de sustancia involucrada integrando el registro voltamperométrico ($I(E)$) corregido por la velocidad de barrido ($v=dE/dt$):

$$Q = \int_i^f I(t)dt = \int_i^f \frac{I(E)}{v} dE \quad (\text{ec. 2.5})$$

La carga faradaica involucrada se relaciona con la cantidad de sustancia electroactiva por medio de la ley de Faraday:

$$\text{moles} = \frac{\mathcal{F}}{n} \quad (\text{ec. 2.6})$$

donde \mathcal{F} es la constante de Faraday y n el número de electrones intercambiados.

2.4. Equipamiento y materiales para análisis descentralizado

Para llevar adelante análisis rápidos, sencillos, confiables, económicos y que se puedan usar *in-situ*, es importante disponer del instrumental adecuado. En la utilización de sensores o biosensores para la detección de diferentes contaminantes ambientales, es necesario contar con equipos que no sólo sean capaces de detectarlos a niveles traza, sino que sean capaces de ser transportables de forma sencilla. Para ello a continuación se discute una serie de características de los equipos disponibles en plaza para un potencial uso descentralizado.

2.4.1. Espectrofotómetros y dispositivos ópticos

La miniaturización de los sistemas de medida ópticos usuales, como los espectrofotómetros, no es posible debido a que no se puede miniaturizar el complejo sistema de espejos que lo forman. Sin embargo, con la tecnología láser, sumado a la capacidad de programación con Arduino, ha sido posible desarrollar sistemas ópticos de medida que pueden usarse de forma descentralizada. A esto hay que sumarle la capacidad de los teléfonos celulares para la medida de luz, color y saturación de color.

Espectrofotómetros miniaturizados. El desarrollo de sistemas miniaturizados viene dado a causa de diferentes necesidades, como ser: la reducción de los reactivos para llevar a cabo la medición, la no disposición de suficiente cantidad de muestra problema para llevar a cabo mediciones en instrumentos tradicionales, así como la minimización en el uso de solventes tóxicos (Pena-Pereira et al., 2011). Se ha encontrado también que los sistemas miniaturizados hacen que el análisis y la producción sean más eficientes a un bajo costo y al ser portátiles permite el análisis *in situ* (Amouzegar et al., 2022). La miniaturización de los sistemas viene siendo utilizado durante las últimas dos décadas en diferentes áreas dado su potencial en el análisis de alimentos, en el diagnóstico clínico en diferentes áreas de la medicina, en el monitoreo *in situ* de procesos industriales, y en la detección de contaminantes ambientales, entre otras aplicaciones. Históricamente, los primeros sistemas de análisis miniaturizados estuvieron basados en la tecnología del silicio, que al verse afectados por la humedad, utilizaban como capa protectora nitruro de silicio u óxido de tantalio en los microchips electrónicos (Amouzegar et al., 2022) . En el análisis químico, los sistemas de detección es una parte crítica del análisis, por lo tanto, la elección de técnicas sensibles y selectivas debe ser la opción para la

detección de componentes trazas en ciertas circunstancias y con un manejo de volúmenes de muestra muy pequeños. Actualmente se ha avanzado en el campo de la reducción del tamaño en la detección óptica, resultando en fuentes de luz compactas y confiables para trabajar en el rango de longitudes de onda desde el UV al IR del espectro magnético. Los beneficios incluyen bajos niveles de señal de fondo y compatibilidad con la tecnología de microfabricación. Las fuentes de luz, son cruciales en los instrumentos portátiles, actualmente como fuente de banda ancha es usada la iluminación de tungsteno-halógena y fluorescente, mientras que para la banda estrecha se usan como fuentes de iluminación el láser, pantallas de cristal líquido (LCD) y diodos emisores de luz (LED) (Afkhami et al., 2023). Los avances en el desarrollo de instrumentos espectrofotométricos miniaturizados ha permitido superar los principales problemas que estos equipos generalmente tenían: a) baja precisión de las medidas y b) límites de detección deficientes (Amouzegar et al., 2022). Los espectrómetros los podemos dividir en tres grandes grupos: 1) Simple haz de luz, 2) doble haz de luz y 3) dispersivos, siendo éstos los más nuevos en el mercado dentro del segmento portátil miniaturizado. En ellos se usa LED como fuente de luz, en dónde luego de atravesar la muestra, el haz de luz es dispersado en un detector de arreglo de diodos mediante una rejilla. Mediante una interfase, en una computadora, se recopilan los datos, se convierten (desde transmisión a absorbancia) y se visualiza el espectro generado (Afkhami et al., 2023; Amouzegar et al., 2022; Czegan & Hoover, 2012). Los sistemas de detección por absorción son una técnica analítica extremadamente útil debido a sus ventajas inherentes, tales como simplicidad, sensibilidad, flexibilidad, facilidad de operación y bajo costo. Recientemente, los sistemas de absorción se han vuelto mucho más pequeños y actualmente los espectrofotómetros en miniatura están disponibles comercialmente porque se han mejorado sus prestaciones debido a la disponibilidad de

monocromadores de rejilla muy pequeños y gracias a la fibra óptica, que sustituye a los cables eléctricos para transmitir la radiación. En cuanto a los detectores, idealmente son aquellos que convierten una señal luminosa en una señal eléctrica proporcional, respondiendo en un amplio rango de longitudes de onda con una alta sensibilidad y velocidad de respuesta, a su vez tiene un rango de respuesta lineal y baja señal de ruido, así como la necesidad de un volumen pequeño de muestra. Los detectores que cumplen con esos requisitos y son muy usados actualmente en instrumentos miniaturizados son los LED. Dado que la sensibilidad de la detección, según la ley de Beer-Lambert, en los espectrofotómetros, es directamente proporcional a la longitud del camino óptico de la cubeta, se han desarrollado diferentes enfoques como celdas de reflexión múltiple, sistemas de microfluidos, dirección axial, guías de ondas de núcleo líquido, sistemas basados en gotas confinadas y espectroscopia de anillo descendente de cavidad para mejorar la sensibilidad de los sistemas de detección de absorción miniaturizados a través del aumento de la trayectoria óptica. Los espectrofotómetros miniaturizados UV-Vis y UV-Vis-NIR son rentables y requieren un tratamiento rápido y sencillo de la muestra. Consumen poco volumen, reactivos y energía. Por lo tanto, estos instrumentos portátiles son más ecológicos en comparación con sus formas de sobremesa. Los microcontroladores de bajo consumo y bajo costo como Bluetooth, wifi, SPI³, se utilizan como componentes para controlar y procesar las salidas ópticas, permiten la producción de instrumentos más baratos y compactos (Afkhami et al., 2023). Muchos espectrómetros miniaturizados son ofrecidos hoy comercialmente (Figura 2.14), como por ejemplo los espectrómetros de alta

³ El Bus SPI es un estándar de comunicaciones, usado principalmente para la transferencia de información entre circuitos integrados en equipos electrónicos

resolución UV-visible-NIR de Ocean Optics (Ocean Insight, 2023; Spectral Evolution, 2023), así como espectrofotómetros muy económicos para educación como el Go Direct® SpectroVis® Plus Spectrophotometer de Vernier Science Education (Vernier® Science Education, 2023) o los miniespectrómetros de Hamamatsu Photonics (Hamamatsu Photonics, 2023).

Punteros láser. Los punteros láser son dispositivos manuales operados con una batería como fuente de poder, que incorporan un diodo láser que emite en un haz de luz en el rango visible, con una alta coherencia y una baja potencia. El muy bajo ancho del haz de luz hace que sea útil para medir partículas dispersas en aire o en soluciones coloidales, y por ese motivo pueden usarse para la detección de nanopartículas.



Figura 2.14. Espectrómetros miniaturizados comerciales. Imágenes tomadas y adaptadas de: Ocean Insight, Spectral Evolution, Vernier Science Education y Hamamatsu Photonics.

La potencial de los láseres manuales se encuentra usualmente en el rango de los miliWatts (mW), y se clasifican según el rango: clase II (< 1 mW), clase IIIa (entre 1 y 5 mW), clase IIIb (entre 5 y 500 mW) y clase IV (> 500 mW). La longitud de onda de la emisión da lugar a láseres de diferentes colores: rojo (638 nm, 650 nm, 670 nm), naranja (593 nm), amarillo (589 nm, 593 nm), verde (532 nm, 515-520 nm), azul (450 nm, 473 nm, 488 nm) y violeta (405 nm).

Entre las aplicaciones en Química, se ha reportado su uso en la detección de puntos finales de titulaciones (Dahm et al., 2004; Ogren et al., 2001), análisis refractométrico (Finageiv Neder et al., 2001) y otras áreas de la química analítica (Kuo et al., 2011; Xiao, et al., 2019). En particular, para el área de interés de esta Tesis, destacamos su

empleo en la detección de nanopartículas por efecto Tyndall. Por ejemplo, la discriminación y cuantificación de AgNPs en su estado aislado y agregado ((Yuan et al., 2022), o en la detección general de nanosistemas (Di Domisio, et al. 2021).

Teléfonos celulares. Partiendo de la base del uso básico de los teléfonos celulares como un medio de comunicación, el desarrollo tecnológico constante de los mismos, tanto a nivel de su hardware, software y el aumento en la capacidad de almacenamiento, ha permitido a la ciencia usarlos como dispositivos en diferentes áreas, tanto para investigación y desarrollo, como para el monitoreo *in situ* de moléculas en diferentes ambientes, permitiendo de esta forma ayudar a la descentralización en el análisis. La detección colorimétrica de diferente tipo de sustancias a través de técnicas de imagen se ha potenciado gracias a la tecnología de las cámaras fotográficas de los teléfonos inteligentes (Fay & Wu, 2024). Dentro de estos desarrollos encontramos diferente tipo de sensores colorimétricos para monitorear la presencia de compuestos químicos en ambientes acuáticos que permiten evaluar el potencial riesgo de eutrofización de los mismos, por ejemplo el desarrollo de un sensor para la monitorización de fósforo (Ansin, 2021); así como también la monitorización de forma conjunta de fosfato, silicato y nitrito (Manbohi & Hamid, 2022). Los teléfonos celulares permiten desarrollar plataformas de test rápido, *in situ* y de bajo costo en el control eficaz de la aparición de enfermedades, así como ver su progresión y transmisión, permitiendo tener un autocontrol en el hogar por los propios involucrados (Balbach et al., 2021; Pawar et al., 2023). La utilización de máquinas para reemplazar el ojo humano para el análisis visual, se conoce como método de visión artificial, el cual basado en las imágenes obtenidas en los teléfonos inteligentes puede ser utilizado en escenas de crímenes para hacer análisis preliminar de la evidencia (Hu et al., 2023). En los últimos años el uso de los

celulares, a través de la colorimetría digital de imagen, también se han aventurado en el análisis de diferentes componentes en alimentos, sin diferir estadísticamente de los métodos de referencia, generando una nueva generación de metodologías rápidas y económicas (Braga Resende et al., 2023; Fan et al., 2021; Guan et al., 2023).

2.4.2. Potenciostatos

Los potenciostatos⁴ funcionan manteniendo el potencial del electrodo de trabajo a un nivel constante con respecto al potencial del electrodo de referencia mediante el ajuste de la corriente en un electrodo auxiliar, detectando cambios en la resistencia y de acuerdo a esas variaciones aplica intensidades de corriente de forma tal de mantener constante la diferencia de potencial de acuerdo a la Ley de Ohm.

Los potenciostatos actuales más comunes constan de tres electrodos (Figura 2.15). El *electrodo de trabajo* (WE) es donde tiene lugar la reacción en estudio; las variaciones que se den en el mismo provocarán un cambio en la corriente (I). El *electrodo de referencia* (RE) tiene un valor constante y permite medir el voltaje (V) aplicado al WE. Finalmente, el electrodo auxiliar o *contraelectrodo* (CE) permite la circulación de la corriente por el sistema, cerrando así el circuito. El cambio producido en esta corriente I será un indicativo de la interacción electroquímica generada, ya sea debida a fenómenos capacitivos como faradaicos.

⁴ En 1942 Hickling describió un circuito eléctrico mediante el cual, durante la exploración de un proceso electrolítico, el potencial del electrodo de trabajo podría ser fijado en un valor arbitrario, respecto a un electrodo de referencia apropiado e independiente de los cambios en las soluciones electrolito en estudio y del electrodo auxiliar o contraelectrodo. A ese dispositivo le llamó "potenciostato" (Hickling, 1942), aunque aparentemente el acuñamiento del nombre fue debido a Milan Prazack (Gabe, 1972).

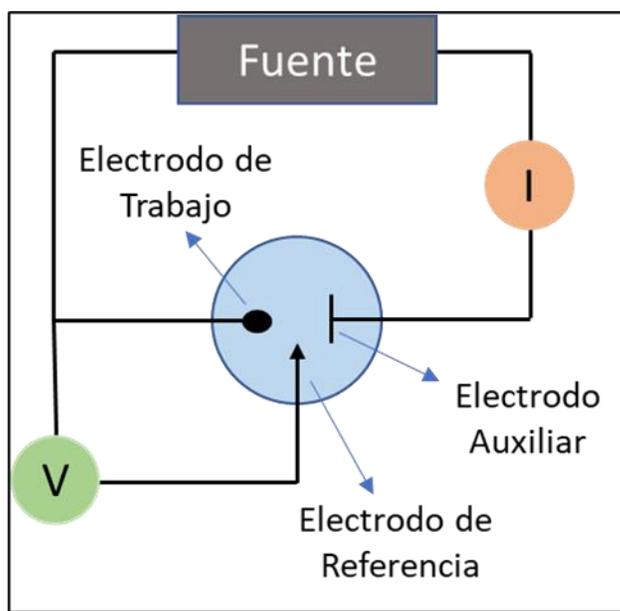


Figura 2.15. Esquema simplificado de un potenciostato (Adaptado de Colomer & Miribel, 2009).

El potenciostato debe i) medir la diferencia de potencial entre WE y RE sin que se polarice el RE, ii) comparar la diferencia de potencial a un voltaje dado y hacer que pase una corriente a través del CE hacia WE a fin de contrarrestar la diferencia entre el voltaje preestablecido y el potencial existente en WE. El potenciostato mide ese flujo de corriente que se da entre el electrodo de trabajo y el auxiliar, por lo tanto, la variable independiente que se controla el potenciostato es el potencial y la variable dependiente es la corriente, generándose un perfil I vs. V (voltamperograma). Los potenciostatos que se comercializan actualmente, pensados para su uso descentralizado, caben en la palma de una mano (Figura 2.16).



Figura 2.16. Miniaturización en el desarrollo de potenciostatos para uso descentralizado

Entre las características que generalmente se consideran importantes en los potenciostatos se encuentran los rangos de corriente y el potencial que puede medir y aplicar con alta precisión, el tiempo de respuesta y la impedancia de salida. Según los procesos se requerirán corrientes o potenciales extremos, por lo que es deseable que los potenciostatos puedan operar en estos rangos. Hoy en día este tipo de requerimientos son cumplidos con los equipos que se encuentran en plaza. Otra característica son los electrodos, según su tamaño, afectará la cantidad de corriente que los atraviesa. También para el uso de microelectrodos la velocidad de medición es muy importante, se buscan altas velocidades. Para el trabajo *in situ*, otro aspecto importante es su tamaño y peso para poder ser transportados de forma sencilla. En la Tabla 2.2, se resumen las características de algunos de los potenciostatos que se pueden adquirir actualmente. Algunos de ellos son ideales para ensayos descentralizados en donde implique un trabajo *in situ*, ya que por su dimensión y peso pueden ser trasladados sin inconvenientes, y pueden ser operados a través de una laptop. Algunos modelos nos permiten trabajar con varios electrodos serigrafados al mismo tiempo, lo que nos permitiría monitorear más de un analito a la vez y/o hacer ensayos de repetitividad a la vez.

Tabla 2.2. Principales características de potenciostatos miniaturizados comerciales.

Marca	Metrohm-DropSens		PalmSens		CH Instruments		Gamry	
Modelo	<i>Stat 400</i>	<i>Stat 8000</i>	<i>PS4.F#.05</i>	<i>EmStat4S LR</i>	<i>1000 C</i>	<i>1200 C</i>	<i>Reference620</i>	<i>Reference3000</i>
Nº Canales	2	8	1 o 2	1	8	1 o 2	2 a 6	Hasta 24
Peso (Kg)	0.48	1.60	0.50	0.13	6.35	0.32 ²	3.00	7.00
Dimensiones ¹	13.2x10x3.6	22.2x20.5x7.7	15.7x9.7x3.5	7.2x5.5x2.6	36.2x23.5x12	17.8x11.4x2.5	9x27x19	20x30x23
Rango Potencial	± 4 V	± 4 V	± 5 V	± 3 V	± 10 V	± 5 V	± 12 V	± 32 V
Corriente Máxima	± 40 mA	± 80 mA	± 30 mA	± 30 mA	± 10 mA (cada canal)	± 50 mA	± 600 mA	±3 A @ 15V o ±1.5 A @ 32V
Rango de Corriente	1 nA – 10 mA (8 rangos)	1 nA – 100 mA (9 rangos)	100 pA-10 mA (9 rangos)	1 nA-10 mA (8 rangos)	1nA-1 mA (7 rangos)	1 nA – 10 mA (8 rangos)	60 pA – 600mA (11 rangos)	300 pA – 3 A (11 rangos)
Mín. Resolución Voltaje							1 µV	1 µV
Mín. Resolución Corriente	1pA	1 pA			0.3 pA	< 1 pA	20 aA	100 aA
Potencial Step	0.10-500 mV	0.10-500 mV	0.076-250 mV	0.100-250 mV			12.5 µV (mín)	12.5 µV (mín)
Velocidad de barrido ³			0.02 mV/s a 5 V/s	0.02 mV/s a 5 V/s	0.001 mV/s a 25 V/s (barrido en los 8 canales a la vez)	0.001 mV/s a 5000 V/s (barrido secuencial)		

¹Largo (cm) x Ancho (cm) x Altura (cm). ² Valor estimado. ³ Para: voltamperometría de barrido lineal (CV). Datos tomados de: Metrohm-DropSens (<http://www.dropsens.com>), PalmSens-Electrochemical Interfaces (<http://www.palmsens.com>), CH Instruments, Inc. (<http://www.chinstruments.com>) y Gamry Instruments (<https://www.gamry.com/>)

2.4.3. Electroodos serigrafiados (SPE)⁵

A finales del s.XX la serigrafía se comienza a usar de forma masiva en la elaboración de tiras comerciales para generar una plataforma para el autocontrol de la glucosa en sangre (Regal et al., 1989; Kyvik et al., 1990; Yoo & Lee, 2010). A partir del sensor de glucosa, la aplicabilidad de los electroodos serigrafiados se ha expandido a diferentes áreas del diagnóstico tanto de la medicina como del medio ambiental. Los electroodos serigrafiados (*screen-printed electrodes*, SPE), están diseñados para ser descartados y listos para ser usados, por lo que no existe necesidad de pretratamiento ni mantenimiento de los mismos, como lo son los tradicionales electroodos electroquímicos y su necesidad de ser pulidos previos a su uso. Esto sin lugar a dudas genera un ahorro de tiempo de trabajo. Las empresas que producen este tipo de electroodos, aseguran que su tecnología de producción genera poca diferencia entre lotes, menores al 5 % (Zensor R & D, 2023). Los SPEs se presentan como una plataforma única que contiene los tres electroodos que forma el sistema electroanalítico (Figura 2.17): de trabajo (WE), de referencia (RE) y auxiliar o contraelectrodo (CE).

Las principales ventajas que encontramos al usar los SPEs son: uso de micro volúmenes de muestra, un diseño muy flexible (Figura 2.18), su pequeño tamaño permite hacerlos operativos *in situ* en diferentes lugares de forma muy práctica, pudiendo ser usados para monitoreo de forma continua. La superficie de los SPE permite ser modificado, de forma

⁵ El término “serigrafía” surge de la combinación de la palabra del latín *sericum* (seda) y del griego antiguo *graphé* (escribir); la serigrafía es un método de impresión, que se vincula a uno de los métodos de estampado más antiguo: el estarcido⁵, el cual nos conduce a las primeras manifestaciones de arte registrado por parte de los humanos en la prehistoria, como lo es arte rupestre encontrado en diversas cuevas o lo que los nativos de las islas Fiji hacían hacia el año 3000 A.C., quienes hacían agujeros a las hojas de plátano para poder realizar estampados sobre las superficies.

tal de mejorar la selectividad del sensor a una molécula química específica. Los electrodos pueden ser serigrafiados con diferentes nanomateriales: nanotubos de carbono, nanopartículas de oro, plata o platino, o deposición de óxidos de níquel nanoestructurados, entre otros materiales (Metrohm-Dropsens, 2022).

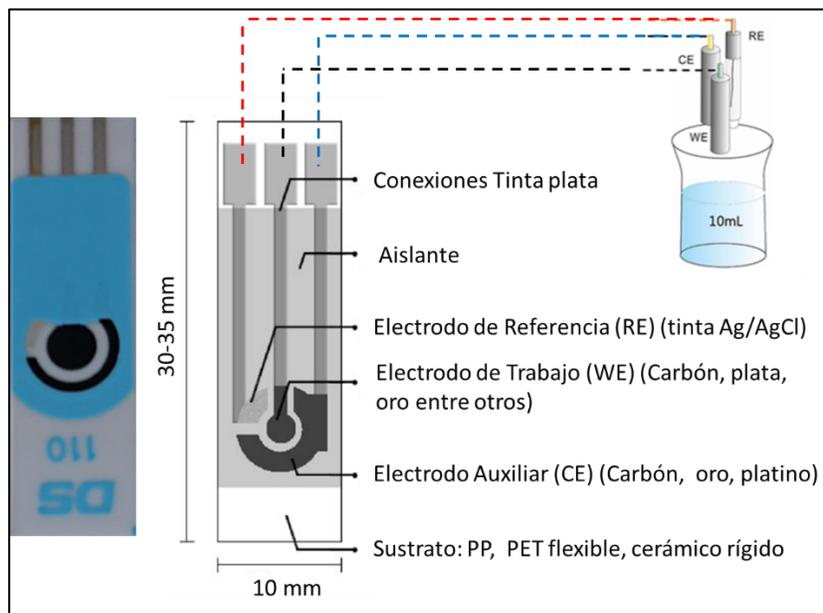


Figura 2.17. Estructura de un sistema electroquímico serigrafiado (SPE) en comparación a una celda electroquímica convencional.

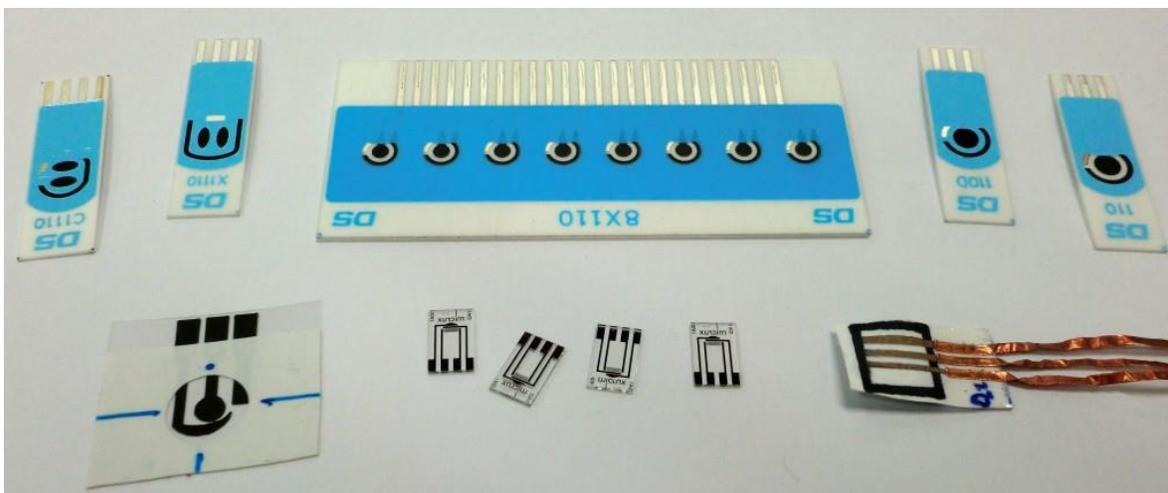


Figura 2.18. Diseños de electrodos serigrafiados de la firma DropSens® (Gentileza: grupo de BioNanoAnálisis, Universidad de Oviedo, España y DropSens, Llaneras, España).

La gran variedad de diseños de SPEs, permite de forma simultánea monitorear en un mismo electrodo más de una molécula a la vez, usando si el mismo electrodo de referencia, o teniendo diseños como las tarjetas de múltiples electrodos o placas de 96 celdas (figura 2.18), permitiría en una misma medición analizar un analito de interés y hacer la curva de calibración al mismo tiempo, del mismo, lo que repercute en la reducción en los tiempos de análisis, así como en los desarrollos de nuevas metodologías y su puesta a punto (Álvarez Pérez, 2021). Como ventaja adicional, los análisis con SPEs pueden acoplarse a medidas espectroscópicas como IR, UV, Raman, NMR, y NIR.

El problema del electrodo de referencia serigrafiado. Un pseudo(*cuasi*)-electrodo de referencia es una denominación usada para aquel electrodo de referencia que, si bien no mantienen un potencial constante, éste varía de manera predecible con las condiciones de trabajo. Una vez establecidas las condiciones, se pueden usar con el fin de actuar como RE. La mayoría de los electrodos funcionan en un rango limitado de condiciones, como pH o

temperatura, fuera de este rango, el comportamiento de los electrodos se vuelve impredecible. La ventaja de un electrodo de pseudo-referencia es que la variación resultante se incluye en el sistema, lo que permite a los investigadores estudiar sistemas con precisión en una amplia gama de condiciones.

Entre los electrodos de pseudo-referencia más empleados (Bard et al., 2012), están los de Ag/Ag⁺, muy empleados en medios no acuosos. En el caso que este electrodo se use en medio acuoso, hay que tener cuidado con la presencia de iones ubicuos, como el Cl⁻, ya que su presencia modifica el potencial de referencia por la formación de AgCl:



Para evitar esta situación, recientemente la empresa DropSens® introdujo los electrodos serigrafiados con una capa de Ag/AgCl como electrodo de pseudo-referencia.⁶ En el Anexo II se muestran las escalas de potencial para diferentes electrodos de referencia.

El problema del electrodo auxiliar (CE) serigrafiado. Generalmente el área de trabajo del CE en los SPE es relativamente menor al área de trabajo del WE, lo que implicaría una velocidad de reacción más lenta en dicho electrodo. Si para producir una densidad de

⁶ Para el caso del sistema estudiado en esta Tesis, los electrodos serigrafiados de Ag/AgCl no serían útiles, como se discutirá en profundidad en el Capítulo 4.

corriente dada se necesita un potencial muy elevado, dicho potencial podría afectar la composición de la solución, dado que la corriente que fluye por WE y CE es la misma, por lo que para un área menor, la densidad de corriente es mayor, por lo que el sobrepotencial necesario para la corriente establecida puede ser elevado (Álvarez Pérez, 2021). También la cercanía de los electrodos podría generar inconvenientes en caso de que se produzcan reacciones tales en el CE que afecten las que se deben dar en el WE.

Características electroquímicas de los electrodos de trabajo. Los electrodos serigrafiados de trabajo usualmente consisten en una pasta que contiene el material electroactivo. Esta pasta incorpora sustancias orgánicas que sirven para promover la adhesión a la base plástica del electrodo. La principal consecuencia de esto es que no toda la superficie expuesta del electrodo consiste en el material electroactivo, sino que una parte se encuentra parcialmente bloqueada por un material inerte. Por lo tanto, en términos de densidad electrónica y de velocidad de transferencia de carga, los SPEs de carbono muestran un desempeño menor comparado con un electrodo de carbono vítreo (Grimaldi et al., 2014).

2.5. Validación de las metodologías descentralizables

Establecer la descentralización como un concepto que aporte un mejor y más rápido monitoreo de contaminantes ambientales, implica que las metodologías utilizadas sean confiables y para eso su validación es muy importante.

2.5.1. El problema del “cero”

Para conocer si una determinada propiedad es aditiva (aspecto fundamental para usarla con fines de cuantificación), es previsible que, ante la ausencia de analito, la propiedad tenga un valor nulo. Por lo tanto, en los ajustes de los modelos matemáticos a las curvas de calibración, se espera una ordenada en el origen nula, aunque esta suposición... ¿es correcta y tiene sentido hacerla? Existen autores que justifican dicha intersección, sosteniendo que una distinta a cero es incongruente (Caley & Schluter, 1998; Vellend et al., 2017). Antes de usar la regresión a través del origen, se debe estar absolutamente seguro de que un valor de 0 para la variable predictora implica un valor de 0 para la variable de respuesta. En muchos escenarios, es casi imposible saber esto con certeza. Sólo saber que la verdadera regresión tiene que pasar por el origen no es razón suficiente para forzar que la regresión estimada lo haga (Williamson & Silverstein, 2021). Forzar la intersección a través del origen es una forma de disimular una especificación incorrecta de una regresión (Fox, 2017). Saber que la verdadera relación entre los predictores y el valor esperado de la variable dependiente tiene que pasar por el origen sería una buena razón para forzar la relación estimada por el origen si supiera con certeza cuál era la verdadera relación. Es decir, no solo sabemos qué función $y = f(x)$ pasa por el origen, sino que también se conoce la función de $f(x)$ y simplemente se tendría que estimar los valores reales de los parámetros. Por supuesto, rara vez sabemos eso en ciencia, más bien, la forma funcional de nuestras regresiones normalmente se elige por conveniencia, o porque se ajusta razonablemente bien a los datos observados, etc. En cuyo caso, no debe forzar su intercepción a través del origen. Forzar su intersección a través del origen en tales casos es una forma de disimular una especificación incorrecta de la regresión. Por ejemplo, si la regresión lineal

proporciona un ajuste de aspecto razonable en el rango de valores de x que se observó, pero con una intersección estimada sin sentido, esa es la forma en que la regresión lineal nos está indicando que la forma real de $f(x)$ puede no ser lineal cerca del origen, fuera del rango de valores de x que se observó. Forzarlo a través del origen trata el síntoma (la intersección estimada sin sentido) pero no la enfermedad (especificación incorrecta) (Fox, 2017).

Ahora, podría no importar la forma de $f(x)$ fuera del rango de valores de x que se observaron, o cerca del origen. Solo se está forzando la regresión a través del origen para mejorar la precisión de las estimaciones de los parámetros de $f(x)$ en el rango de valores de x que se observó o que nos interesan. Si $f(x)$ está mal especificado, no necesariamente se mejorarán las estimaciones de los parámetros forzando $f(x)$ mal especificado a través del origen. Un $f(x)$ mal especificado forzado a través de un punto a través del cual se sabe que pasa el verdadero $f(x)$ no necesariamente pasará más cerca del verdadero $f(x)$ en cualquier rango particular de valores x que un $f(x)$ mal especificado que no pasará. Forzado a través del origen. Especialmente si el rango de valores x que nos interesan incluye valores alejados del origen. De hecho, en la medida en que existe la posibilidad de que se haya especificado mal $f(x)$, probablemente sea mejor que no se fuerce a través del origen. En la mayoría de los casos, la flexibilidad adicional que se obtiene al estimar la intersección debería mejorar la capacidad del $f(x)$ elegido para imitar el $f(x)$ real desconocido en el rango de valores de x que interesan. Por el contrario, se puede forzar $f(x)$ a través del origen porque preocupa la estimación sin sentido del origen que se obtiene de otra manera. A lo cual, si todo lo que realmente importa es estimar la forma de $f(x)$ en algún rango de valores de x lejos del origen, ¿por qué también nos importa si extrapolar nuestro ajuste al origen

nos da una estimación sin sentido del origen? Que se sepa que se ha estimado mal el intercepto no significa que también se haya estimado mal $f(x)$ sobre el rango de valores de x que nos interesan, a menos que se esté seguro de que $f(x)$ está correctamente especificado.

2.5.2. Linealizaciones y adiciones estándar

Hay que tener en cuenta que, en química analítica, las respuestas instrumentales pueden verse afectadas por la matriz de la muestra. Se pueden observar comportamientos que conducen a resultados sesgados cuando la señal analítica producida a partir de la muestra, se compara con la curva de calibración preparada a partir de soluciones estándar sin matriz. Para evitar el efecto matriz, se emplea el método de adiciones estándar para elaborar las curvas de calibración (Miller & Miller, 2002). El efecto matriz es un error sistemático proporcional, dependiente de la concentración del analito en la muestra. En términos generales, se adicionan cantidades conocidas del analito a la muestra, y se extrapola el comportamiento obtenido. El mismo procedimiento puede llevarse a cabo sobre materiales de referencia certificados. En el método de adiciones estándar se busca encontrar en donde la respuesta es cero (ec. 2.7), por lo que para una regresión lineal común (ec. 2.8), el cálculo de x_0 corresponde a la ecuación 2.9.

$$x_0 = -x_{y=0} \quad (\text{ec. 2.7})$$

$$y = a_0 + a_1x \quad (\text{ec. 2.8})$$

$$x_0 = -a_0/a_1 \quad (\text{ec. 2.9})$$

A pesar de encontrar una solución para resolver el problema, el enfoque clásico de las adiciones estándar presenta un inconveniente asociado a la incertidumbre del resultado

analítico. Por ejemplo, en una regresión lineal clásica (ec. 2.8), se debe realizar una propagación de incertidumbres, combinando a las que corresponden a la intersección a_0 y a la pendiente a_1 . La intersección y la pendiente son estimaciones correlacionadas, por lo que debe ser involucrada la covarianza para dichas estimaciones (ec. 2.10 y ec. 2.11), lo que hace el cálculo más complejo.

$$\frac{u^2(x_0)}{x_0^2} = \frac{u^2(a_0)}{a_0^2} + \frac{u^2(a_1)}{a_1^2} - 2 \frac{cov(a_0, a_1)}{a_0 a_1} \quad (\text{ec. 2.10})$$

siendo:
$$cov(a_0, a_1) = -\bar{x} \cdot u^2(a_1) \quad (\text{ec. 2.11})$$

Por tal motivo para la simplificación del análisis, algunos autores proponen el intercambio de coordenadas x - y en la regresión lineal convencional (Meija et al., 2014) (Figura 2.19), por lo que la regresión quedaría como se expresa en la ec. 2.12.

$$x = b_0 + b_1 y \quad (\text{ec. 2.12})$$

La ventaja de este intercambio de coordenadas, donde se tiene ahora a b_0 y b_1 como variables se evidencia al hacer el cálculo de $x_{0,inv} = -x_{y=0}$; siendo $x_{0,inv}$ igual al intercepto (negativo) de la regresión inversa, lo que significa decir que $x_{0,inv} = -b_0$ (Figura 2.19b). Por lo tanto, la incertidumbre de x_0 es la incertidumbre de b_0 . Esto implica una sencillez en los cálculos, al no tener que tener la necesidad de evaluar la covarianza entre los parámetros de la regresión. Este intercambio de coordenadas facilita el cálculo a cualquier tipo de modelo matemático (Meija et al., 2014).

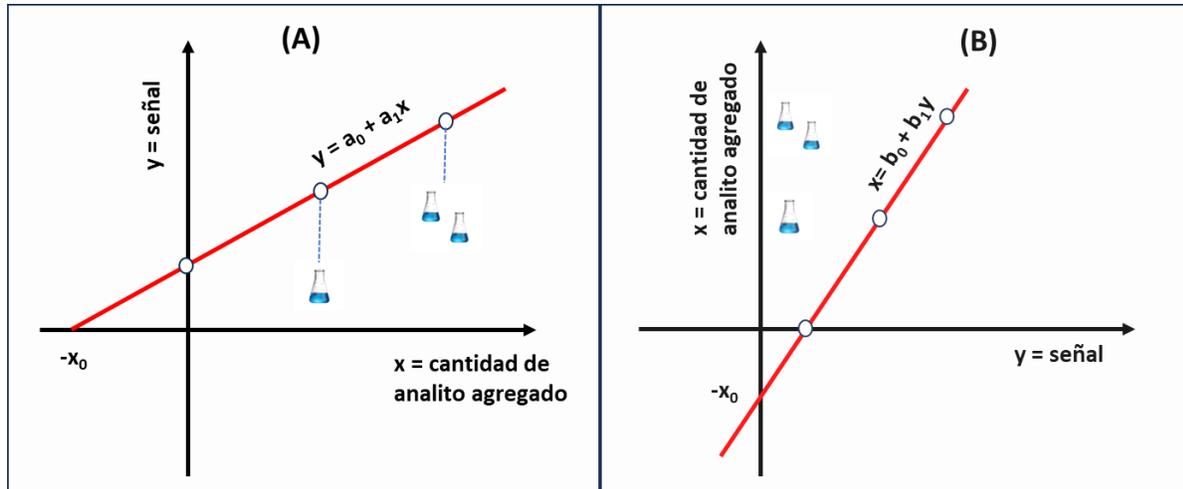


Figura 2.19. Método de adición estándar. A) Regresión directa, B) Regresión inversa. Figura adaptada de Meija et al., 2014.

2.5.3. Métodos estadísticos

Los ajustes de los modelos empleados en las curvas de calibración, así como la comparación entre modelos (por ejemplo, lineal y cuadrático) puede analizarse mediante diversos ensayos estadísticos. A saber: a) Test de Dixon, b) Test de Mandel (Prueba F), c) Prueba del criterio de información de Akaike (AIC) y d) Criterio de información bayesiano (BIC).

Test de Dixon para la detección de valores atípicos (outliers). El test de Dixon (conocido también como test Q) permite determinar si algún valor en un conjunto de valores distribuidos normalmente que representan una idéntica medición, debe ser considerado como un valor atípico (Dean & Dixon, 1951). Para ello, se considera el cociente

$$Q = \frac{|x_i - x_j|}{w} \quad (\text{ec. 2.13})$$

donde x_i y x_j representan el valor sospechoso y su valor más próximo, respectivamente, y w la diferencia entre los valores máximo y mínimo. Si el valor de Q calculado es mayor que el valor tabulado (en función del nivel de confianza y del número de observaciones), se rechaza el valor sospechoso.

Test de Mandel (Prueba F). Se basa en la comparación de las varianzas entre el modelo lineal y un modelo alternativo. La prueba F asume que ambos modelos están anidados⁷ y se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$F = \frac{\frac{RSS_1 - RSS_2}{df_1 - df_2}}{\frac{RSS_2}{df_2}} \quad (\text{ec. 2.14})$$

donde RSS es la suma de cuadrados residual y df son los grados de libertad.

Tomando en cuenta el valor de F calculado con el correspondiente valor de F crítico tomado de tablas, se concluye que el modelo alternativo es adecuado si $F_{\text{Lineal}} > F_{\text{Lineal}} \text{ crítico}$, y $F_{\text{alternativo}} < F_{\text{alternativo}} \text{ crítico}$, y se adopta el modelo lineal cuando se cumple que $F_{\text{Lineal}} < F_{\text{Lineal}} \text{ crítico}$, y $F_{\text{alternativo}} > F_{\text{alternativo}} \text{ crítico}$, entonces el modelo lineal es el adecuado. Siempre comparados a un mismo nivel de significación $(\alpha; n-k-1)$, donde n es el número de determinaciones, k los grados de libertad.

⁷ **Anidado** significa aquí que todos los términos de un modelo más pequeño ocurren en un modelo más grande, siendo condición necesaria para usar la mayoría de las pruebas de comparación de modelos. Tomado de Joris Meys (<https://stats.stackexchange.com/users/1124/joris-meys>), What is the difference between a "nested" and a "non-nested" model?, (Consultado: 24/07/21)

Criterio de información Akaike (AIC). Este criterio fue propuesto por Akaike (Akaike, 1974), y no requiere que los dos modelos estén anidados. Por lo tanto, se pueden comparar dos modelos cualesquiera utilizando este método. El valor AIC es calculado de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$AIC = \begin{cases} N \ln\left(\frac{RSS}{N}\right) + 2K & \text{para } \frac{N}{K} \geq 40 \\ N \ln\left(\frac{RSS}{N}\right) + 2K + \frac{2K(K+1)}{N-K-1} & \text{para } \frac{N}{K} < 40 \end{cases} \quad (\text{ec. 2.15})$$

donde RSS son la suma de cuadrados residual, N es el número de observaciones y K los grados de libertad.

Para el mejor ajuste de modelos, se sugiere aquel que tiene un AIC menor para el conjunto de datos obtenidos. También otro parámetro usado para el ajuste fue el Peso de Akaike, el cual se calcula de la siguiente forma:

$$\text{Peso de Akaike} = \frac{e^{-0.5\Delta AIC}}{1 + e^{-0.5\Delta AIC}} \quad (\text{ec. 2.16})$$

donde ΔAIC es la diferencia entre dos valores AIC. El peso de Akaike indica la probabilidad de un modelo mejor. El AIC se basa en la teoría de la información, el modelo candidato minimiza la pérdida de información.

Criterio de información bayesiano (BIC). Esta prueba también es usada para la selección de modelos entre un conjunto finito de datos. Se deriva del criterio de Schwarz (Schwarz, 1978), es un método centrado en la suma de los cuadrados de los residuos para encontrar el número de períodos rezagados p que minimizan este modelo (Rodó, 2020). Está

estrechamente relacionado al AIC y está basado en la función de probabilidad. Cuando en el ajuste de modelos se puede aumentar la probabilidad mediante la adición de parámetros, pero pudiendo resultar en un sobreajuste, tanto BIC como AIC resuelven este inconveniente, introduciendo un término de penalización para el número de parámetros (Rozet et al., 2013). El término de penalización para el BIC es similar a la ecuación del AIC, pero utiliza un multiplicador de $\ln(N)$ para k en lugar de una constante 2 incorporando el tamaño de la muestra N . Eso puede resolver el llamado problema de sobreajuste en el ajuste de datos. BIC se calcula por la siguiente ecuación:

$$BIC = N \ln\left(\frac{RSS}{N}\right) + K \ln(N) \quad (\text{ec. 2.17})$$

Según el criterio BIC, entre 2 modelos estimados, el que tenga menor BIC es el modelo preferido, dado que implica un menor número de variables explicativas, mejor ajuste o ambos. Al igual que para el AIC, los modelos comparados no tienen que estar anidados a diferencia de lo que ocurre en la Prueba F .

2.5.4. Materiales de referencia y materiales certificados

La validación de los métodos analíticos requiere del uso de materiales de referencia y materiales de referencia certificados. Los materiales de referencia se encuentran entre los materiales fundamentales para evaluar la eficiencia global de los resultados analíticos, la validación de métodos, la verificación del uso correcto de un método, la estimación de la incertidumbre de una medición, la calibración, y todos los procesos asociados al aseguramiento de la calidad. La validación de un método requiere de un material de

referencia certificado, mientras que, para fines de control, basta con un material de referencia.

La selección del material de referencia certificado debe tomar en cuenta la forma química del analito de interés, el nivel de concentración, la coincidencia de las matrices y las posibles interferencias (King, 2002). Los materiales de referencia pueden contener al analito en una solución controlada, con una concentración exactamente conocida. En otros casos, el analito de interés se encuentra embebido en una matriz, y se desarrollan materiales de referencia certificados que permiten estudiar la técnica analítica en presencia de los elementos de la matriz, que podrán o no interferir. En el caso del plomo, como el interés era el análisis de pinturas, se emplearon materiales de referencia que consistían en pintura con un contenido certificado de plomo. Adicionalmente, la matriz *per se* constituye un blanco que debe ser analizado, por lo que se recurre a materiales de referencia consistente en pinturas con ausencia certificada de plomo.

En el caso de los nanomateriales, el problema de los materiales de referencia no está aún resuelto. La variedad de factores que afectan las propiedades fisicoquímicas (y por ende las propiedades que puedan resultar aditivas para ser empleadas en determinaciones químicas) es tan grande, y difícil de controlar, que es virtualmente imposible contar con un material de referencia que pueda usarse con el fin de control de una técnica analítica (Stone et al., 2010). El área de la “nanometrología” es de desarrollo reciente (Leach, 2014) y las soluciones aún están lejos de poder implementarse (Lazos-Martínez & González-Rojano, 2013). Como alternativa, se cuentan con materiales certificados por medio de diferentes técnicas, que son aportados por diferentes firmas comerciales (Linsinger et al., 2011).

2.6. Bibliografía del Capítulo

- Acir, I. H., & Guenther, K. (2018). Endocrine-disrupting metabolites of alkylphenol ethoxylates – A critical review of analytical methods, environmental occurrences, toxicity, and regulation. *Science of the Total Environment*, 635, 1530–1546. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.079>
- Afkhami, A., Madrakian, T., & Ahmadi, M. (2023). Miniaturized spectrometric instruments. In *Analytical Nanochemistry* (First edit, pp. 187–209). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91741-4.00007-5>
- Aizpurua, J., Hanarp, P., Sutherland, D. S., Kall, M., Bryant, G. W., & Garcia, F. J. (2003). Optical Properties of Gold Nanorings. *Physical Review Letters*, 90(5), 057401/1-057401/4. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.90.057401>
- Akaike, H. (1974). A New Look at the Statistical Model Identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19(6), 716–723. <https://doi.org/10.1109/TAC.1974.1100705>
- Alharbi, N. S., Alsubhi, N. S., & Felimban, A. I. (2022). Green synthesis of silver nanoparticles using medicinal plants : Characterization and application. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 15(3), 109–124. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2022.06.012>
- Álvarez Pérez, E. (2021). *Preparación y caracterización de electrodos de papel para aplicaciones en biosensores*. Universidad de Oviedo.
- Amouzegar, Z., Rezvani Jalal, N., Kamalabadi, M., Abassi Tarighat, M., Afkhami, A., Madrakian, T., Thomas, S., Nguyen, T., & Ahmadi, M. (2022). Spectrometric miniaturized instruments. In S. Thomas, M. Ahmadi, T. A. Nguyen, A. Afkhami, & T. Madrakian (Eds.), *Micro- and Nanotechnology Enabled Applications for Portable Miniaturized Analytical Systems* (pp. 17–40). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2020-0-00293-8>
- Angelini, I., Artioli, G., Bellintani, P., Diella, V., Gemmi, M., Polla, A., & Rossi, A. (2004). Chemical analyses of Bronze Age glasses from Frattesina di Rovigo, Northern Italy. *Journal of Archaeological Science*, 31(8), 1175–1184. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2004.02.015>
- Ansin, A. (2021). *Implementación de una técnica colorimétrica para la detección de fósforo en aguas empleando un teléfono celular*. Facultad de Ciencias, Universidad de la República.
- Ansin, A., Botasini, S., & Méndez, E. (2022). *CONVIVIR CON EL PLOMO Un aprendizaje necesario* (C. S. E. Permanente (ed.); Primera Ed). (Unidad de Comunicación de la Universidad de la República. <https://udelar.edu.uy/eduper/wp-content/uploads/sites/29/2022/09/plomoconv.pdf>
- Balbach, S., Jiang, N., Moreddu, R., Dong, X., Kurz, W., Wang, C., Dong, J., Yin, Y., Butt, H., Brischwein, M., Hayden, O., Jakobi, M., Tasoglu, S., Koch, A. W., & Yetisen, A. K. (2021). Smartphone-based colorimetric detection system for portable health tracking. *Analytical Methods*, 13, 4361–4369.

<https://doi.org/10.1039/d1ay01209f>

Bard, A. J., Inzelt, G., & Scholz, F. (2012). *Electrochemical Dictionary* (A. J. Bard, G. Inzelt, & F. Scholz (eds.); 2nd Edition). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-29551-5>

Botasini, S. (2016). *Estudio de estabilidad de la nanopartículas y desarrollo de un sensor colorimétrico*. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.

Braga Resende, L., Magalhaes, E., & Nunes, C. (2023). Optimization and validation of a smartphone-based method for the determination of total sterols in selected vegetable oils by digital image colorimetry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 117(July 2022). <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.105111>

Calderón, H. A. (2020). Transmission electron microscopy to look at atoms : principles and development. *Mundo Nano*, 13(25), 133–156. <https://doi.org/doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2020.25.69649>

Caley, M. J., & Schluter, D. (1998). The relationship between local and regional diversity: Reply. *Ecology*, 79(5), 1827–1829. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(1998\)079\[1827:TRBLAR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(1998)079[1827:TRBLAR]2.0.CO;2)

Czegan, D. A. C., & Hoover, D. K. (2012). UV – Visible Spectrometers: Versatile Instruments across the Chemistry Curriculum. *Journal of Chemical Education*, 89(3), 304–309. <https://doi.org/10.1021/ed200776x>

Dahm, C. E., Hall, J. W., & Mattioni, B. E. (2004). A Laser-Pointer-Based Spectrometer for Endpoint Detection of EDTA Titrations. *Journal of Chemical Education*, 81(12), 1787–1789. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ed081p1787>

Dean, R. B., & Dixon, J. (1951). Simplified Statistics for Small Numbers of Observations. *Analytical Chemistry*, 23(4), 636–638. <https://doi.org/10.1021/ac60052a025>

Edwards, P. P., & Thomas, J. M. (2007). Essays Gold in a Metallic Divided State — From Faraday to Present -Day Nanoscience. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, 5480–5486. <https://doi.org/10.1002/anie.200700428>

Fan, Y., Li, J., Guo, Y., Xie, L., & Zhang, G. (2021). Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review. *Measurement*, 171(June 2020), 108829. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2020.108829>

Faraday, M. (1857). X. The Bakerian Lecture. —Experimental relations of gold (and other metals) to light. *Phil. Trans. R. Soc.*, 147, 145–181. <https://doi.org/https://doi.org/10.1098/rstl.1857.0011>

Fay, C. D., & Wu, L. (2024). Critical importance of RGB color space specificity for colorimetric bio / chemical sensing : A comprehensive study. *Talanta*, 266(P1), 124957. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124957>

Finageiv Neder, A. de V., García, E., & Viana, L. (2001). The Use of an Inexpensive Laser Pointer to Perform

- Qualitative and Semiquantitative Laser Refractometry. *Journal of Chemical Education*, 78(11), 1481–1483. <https://doi.org/doi:10.1021/ed078p1481>
- Fox, J. (2017). *Don't force your regression through zero just because you know the true intercept has to be zero*. *Dynamic Ecology*. <https://dynamicecology.wordpress.com/2017/04/13/dont-force-your-regression-through-zero-just-because-you-know-the-true-intercept-has-to-be-zero/>
- Gabe, D. R. (1972). Bibliography of Potentiostat Design Bibliography of Potentiostat Design. *British Corrosion Journal*, 7(5), 236–238. <https://doi.org/10.1179/000705972798322810>
- Garcia, M. A. (2011). Surface plasmons in metallic nanoparticles: Fundamentals and applications. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 44(28). <https://doi.org/10.1088/0022-3727/44/28/283001>
- Garcia, M. A., Llopis, J., & Paje, S. E. (1999). A simple model for evaluating the optical absorption spectrum from small Au-colloids in sol – gel films. *Chemical Physics Letters*, 315(December), 313–320.
- Grimaldi, A., Heijo, G., & Méndez, E. (2014). A multiple evaluation approach of commercially available screen-printed nanostructured carbon electrodes. *Electroanalysis*, 26(8), 1684–1693. <https://doi.org/10.1002/elan.201400122>
- Guan, H., Du, S., Han, B., Zhang, Q., & Wang, D. (2023). A rapid and sensitive smartphone colorimetric sensor for detection of ascorbic acid in food using the nanozyme paper-based microfluidic chip. *LWT*, 184(June), 115043. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115043>
- Hamamatsu Photonics. (2023). *Mini-spectrometers*. Recuperado 8 de Agosto de 2023. <https://www.hamamatsu.com/jp/en/product/optical-s>
- Hickling, A. (1942). Studies in electrode polarisation. Part IV: The automatic control of the potential of working electrode. *Transactions of The Faraday Society*, 38, 27–33.
- Hu, C., Mei, H., Guo, H., Wang, P., Li, Y., Li, H., & Zhu, J. (2023). Analyzing the color of forensic textile using smartphone-based machine vision. *Forensic Chemistry*, 34(17), 100500. <https://doi.org/10.1016/j.forc.2023.100500>
- King, B. (2002). *The Selection and Use of Reference Materials-A Basic Guide for Laboratories and Accreditation Bodies* (EEE/RM/062rev3). <https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/EEE-RM-062rev3.pdf>
- Kumar, S. K., Szamel, G., & Douglas, J. F. (2006). Nature of the breakdown in the Stokes-Einstein relationship in a hard. *The Journal of Chemical Physics*, 124. <https://doi.org/10.1063/1.2192769>
- Kuo, C., Liu, Y., Wu, S., Lin, C., Lin, C., & Chen, C. (2011). Visual Semiquantification via the Formation of Phase Segregation. *Analytical Chemistry*, 83, 3765–3769. <https://doi.org/10.1021/ac200242j>
- Kyvik, K. O., Traulsen, J., & Fwland, A. (1990). The ExacTech blood glucose testing system. *Diabetes Research*

and *Clinical Practice*, 10, 85–90.

- Lazos-Martínez, R. J., & González-Rojano, N. (2013). Nanometrology in Emerging Economies : The Case of Mexico. *MAPAN-Journal of Metrology Society of India*, 28(4), 299–309. <https://doi.org/10.1007/s12647-013-0083-8>
- Leach, R. (2014). *Fundamental Principles of Engineering Nanometrology* (William Andrew (ed.); 2nd Editio). Elsevier.
- Linsinger, T. P. J., Roebben, G., Solans, C., & Ramsch, R. (2011). Reference materials for measuring the size of nanoparticles. *Trends in Analytical Chemistry*, 30(1), 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.09.005>
- Lisi, F., Peterson, J. R., & Gooding, J. J. (2020). The application of personal glucose meters as universal point-of-care diagnostic tools. *Biosensors and Bioelectronics*, 148(October 2019), 111835. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111835>
- Lu, X., Rycenga, M., Skrabalak, S. E., Wiley, B., & Xia, Y. (2009). Chemical Synthesis of Novel Plasmonic Nanoparticles. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 60, 167–192. <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.040808.090434>
- Luo, R., Zhang, T., Wang, L., & Feng, Y. (2023). Emissions and mitigation potential of endocrine disruptors during outdoor exercise : Fate , transport , and implications for human health. *Environmental Research*, 236(Pt2), 116575. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116575>
- Manbohi, A., & Hamid, S. (2022). Portable smartphone - based colorimetric system for simultaneous on - site microfluidic paper - based determination and mapping of phosphate , nitrite and silicate in coastal waters. *Environmental Monitoring and Assessment*. <https://doi.org/10.1007/s10661-022-09860-6>
- Meija, J., Pagliano, E., & Mester, Z. (2014). Coordinate swapping in standard addition graphs for analytical chemistry: A simplified path for uncertainty calculation in linear and nonlinear plots. *Analytical Chemistry*, 86(17), 8563–8567. <https://doi.org/10.1021/ac5014749>
- Mie, G. (1908). Beitrage zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen [Contributions on the Optics of Turbid Media, particularly colloidal metal solutions]. *Annalen Jer Physik, Series IV*,(3), 377–445.
- Mourdikoudis, S., Pallares, R., & Thanh, N. (2018). Characterization Techniques for Nanoparticles: Comparison and Complementarity upon Studying Nanoparticle Properties Stefanos. *Nanoscale*, 10, 12871–12934. <https://doi.org/10.1039/C8NR02278J>
- Ocean Insight. (2023). *Spectrometers*. Recuperado 7 de Agosto de 2023. <https://www.oceaninsight.com/products/spectrometers/>
- Ogren, P., Nelson, S., & Henry, I. (2001). Using a Diode Laser Pointer to Count Drops and Automate Titration

- Systems. *Journal of Chemical Education*, 78(3), 353–355. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ed078p353>
- Pawar, A. A., Patwardhan, B. S., Barage, S., Raut, R., Lakkakula, J., Roy, A., Sharma, R., & Anand, J. (2023). Smartphone-based diagnostics for biosensing infectious human pathogens. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 180–181(May), 120–130. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2023.05.002>
- Pena-Pereira, F., Costas-mora, I., Romero, V., & Lavilla, I. (2011). Advances in miniaturized UV-Vis spectrometric systems. *Trends in Analytical Chemistry*, 30(10), 1637–1648. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.04.018>
- Reyes Gasga, J. (2020). Brief history of electron microscopy in Mexico and the world. *Mundo Nano*, 13(25), 79–100. <https://doi.org/doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2020.25.69610>
- Rozet, E., Ziemons, E., Marini, R. D., & Hubert, P. (2013). Usefulness of information criteria for the selection of calibration curves. *Analytical Chemistry*, 85(13), 6327–6335. <https://doi.org/10.1021/ac400630k>
- Schwarz, G. (1978). Estimating the Dimension of a Model. *The Annals of Statistics*, 6(2), 461–464. <http://www.jstor.org/stable/2958889>
- Škerlová, J., Ismail, A., Lindström, H., Sjödin, B., Mannervik, B., & Stenmark, P. (2021). Structural and functional analysis of the inhibition of equine glutathione transferase A3-3 by organotin endocrine disrupting pollutants. *Environmental Pollution*, 268. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115960>
- Spectral Evolution. (2023). PSR+. Recuperado 7 de Agosto de 2023. <https://spectralevolution.com/product/psr/>
- Stetefeld, J., Mckenna, S. A., & Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering : a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, 8, 409–427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>
- Stiefel, C., & Stintzing, F. (2023). Endocrine-active and endocrine-disrupting compounds in food – occurrence, formation and relevance. *NFS Journal*, 31(November 2022), 57–92. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2023.03.004>
- Stone, V., Nowack, B., Baun, A., Brink, N. Van Den, Kammer, F. Von Der, Dusinska, M., Handy, R., Hankin, S., Hassellöv, M., Joner, E., & Fernandes, T. F. (2010). Environment Nanomaterials for environmental studies : Classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterisation. *Science of the Total Environment*, 408(7), 1745–1754. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.10.035>
- Thacharodi, A., Hassan, S., Acharya, G., Vithlani, A., & Hoang, Q. (2023). Endocrine disrupting chemicals and their effects on the reproductive health in men. *Environmental Research*, 236(P2), 116825. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116825>
- Vellend, M., Dornelas, M., Baeten, L., Beauséjour, R., Brown, C. D., De Frenne, P., Elmendorf, S. C., Gotelli,

- N. J., Moyes, F., Myers-Smith, I. H., Magurran, A. E., McGill, B. J., Shimadzu, H., & Sievers, C. (2017). Estimates of local biodiversity change over time stand up to scrutiny. *Ecology*, 98(2), 583–590. <https://doi.org/10.1002/ecy.1660>
- Vernier® Science Education. (2023). *Go Direct® SpectroVis® Plus Spectrophotometer*. Recuperado 7 de Agosto de 2023. <https://www.vernier.com/product/go-direct-spectrovis-plus-spectrophotometer/>
- Wiley, B. J., Im, S. H., Li, S.-Y., McLellan, J., Siekkinen, A., & Xia, Y. (2006). Maneuvering the Surface Plasmon Resonance of Silver Nanostructures through Shape-Controlled Synthesis Benjamin. *J. Phys. Chem. B* 2006, 110, 15666–15675.
- Williamson, J. C., & Silverstein, T. P. (2021). Sweetness of Aspartame: Introducing Key Statistical Concepts in an Upper Division Bioanalytical Laboratory Project. *Journal of Chemical Education*, 98, 1233–1241. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.0c01072>
- World Health Organization & United Nations Environment Programme. (2021). *GLOBAL ALLIANCE TO ELIMINATE LEAD PAINT BUSINESS PLAN*. July, 4. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-HEP-ECH-CHE-2021.03>
- Xiang Y, L. Y. (2011). Using personal glucose meters and functional DNA sensors to quantify a variety of analytical targets. *Nat Chem.*, 3(9), 697–703. <https://doi.org/doi:10.1038/nchem.1092>
- Yang, W., Schatz, G. C., & Duyne, R. P. Van. (1995). Discrete dipole approximation for calculating extinction and Raman intensities for small particles with arbitrary shapes. *J. Chem. Phys.*, 103(3), 869–875. <https://doi.org/10.1063/1.469787>
- Yoo, E., & Lee, S. (2010). Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 10, 4558–4576. <https://doi.org/10.3390/s100504558>
- Yuan, K., Sun, Y., Liang, F., Pan, F., Hu, M., Hua, F., Yuan, Y., Nie, J., & Zhang, Y. (2022). Tyndall-effect-based colorimetric assay with colloidal silver nanoparticles for quantitative point-of-care detection of creatinine using a laser pointer pen and a smartphone. *RSC Advances*, 12, 23379–23386. <https://doi.org/10.1039/d2ra03598g>
- Zensor R & D. (2023). *Screen printed carbon electrode*. Recuperado 8 de Agosto de 2023. <https://www.zensorrd.com/Article13.html>
- Zumbragel, B. (2013). A workbook for 910 PSTAT mini. *Metrohm Monograph*, 132.

Capítulo 3 - Análisis de plomo en pinturas

El plomo es uno de los agentes contaminantes más dañinos que existen, y ha sido recientemente reconocido como disruptor endócrino, afectando principalmente a la población infantil en su desarrollo físico e intelectual. Su capacidad de reaccionar con diferentes aniones, sumado a su volatilidad y la amplitud de su uso hacen que su control sea virtualmente imposible. En este sentido, es necesario eliminar las fuentes de plomo donde las personas y los niños son más vulnerables, y es en sus hogares, en donde el plomo puede contaminar los alimentos y el ambiente en general, al ser transportado por el polvo aéreo. Una de las fuentes hogareñas más importantes de plomo son las pinturas antiguas de las paredes y aberturas, o las pinturas modernas en los juguetes. Al estar fuera del control estatal, es necesario contar con sistemas analíticos que puedan ser usados por la población, y allí es donde la descentralización analítica juega un papel fundamental. En este capítulo estudiaremos dos sistemas analíticos descentralizables para analizar plomo: el método del “trapo húmedo” y una técnica electroanalítica. Ambas metodologías pueden ser usadas fuera del laboratorio, aportando valores aproximados y exactos, respectivamente.

3.1. Introducción y antecedentes

La disminución de la contaminación por plomo sigue siendo de sumo interés y necesidad debido al impacto nocivo de este metal en la población (O'Connor et al., 2018; Singh et al., 2018). El plomo ha sido incorporado a la lista de disruptores endócrinos emergentes, siendo los bebés y niños en su primera infancia los que están más expuestos y corren mayor riesgo en su desarrollo. La contaminación con plomo se ha relacionado con diversas enfermedades, como anemia, daño renal, hipertensión. Asimismo, se han asociado altos niveles de plomo con el comportamiento antisocial, el déficit atencional, el bajo cociente intelectual y el bajo rendimiento escolar (Iavicoli et al., 2009; Mitra et al., 2017; Singh et al., 2018).

A nivel de Naciones Unidas, se han desarrollado programas a largo plazo conducentes a la eliminación de la exposición al plomo. Un primer programa, de 10 años de duración, permitió la eliminación total del plomo como aditivo en los combustibles, lo que produjo una disminución notoria en la contaminación aérea (Needleman, 2004). En Uruguay, además de eliminar el plomo en los combustibles, se implementaron programas para el control de la disposición de las baterías usadas (Cousillas et al., 2012; Needleman, 2004).

Hoy en día, la eliminación de la contaminación por plomo dentro de los hogares es un desafío para el sistema de salud mundial (Schukraft & Rhys Bernard, 2021), y en la actualidad hay un programa específico de la ONU para alcanzar este objetivo. Las fuentes de plomo en los hogares son muy diversas: polvo, suciedad en los zapatos, tuberías, pinturas viejas que aún están en paredes, puertas, muebles y juguetes viejos (Njati & Maguta, 2019; O'Connor et al., 2018). Debido a que dicha contaminación se encuentra en

el hogar, las diferentes agencias gubernamentales de monitoreo no pueden ingresar sin previa autorización. Para superar este problema, se encuentran disponibles en el mercado, varios *kits* para que usuarios no técnicos evalúen la presencia de plomo en el hogar; en el caso de un resultado positivo, el análisis debería confirmarse en un laboratorio oficial y mediante un método analítico robusto. Aunque el uso de estos *kits* es un paso inicial, la mayoría de ellos aún brindan resultados cuestionables, incluidos los falsos negativos (Rossiter et al., 2000; Shah et al., 2018). Dado que la disminución final de la contaminación por plomo incluye análisis dentro de los hogares, es necesario aún establecer métodos analíticos para obtener resultados de alto impacto, económicos y confiables. Estos requisitos excluyen los métodos que requieren el uso de equipos grandes y costosos, como el plasma acoplado inductivamente (ICP); en cambio, los métodos electroanalíticos, que pueden descentralizarse fácilmente, son deseables.

Un nuevo programa de las Naciones Unidas busca dos objetivos principales: establecer leyes para el control de plomo en las pinturas, y eliminar el plomo de las pinturas. Al 31 de diciembre de 2022, 87 países habían establecido controles legales vinculantes sobre el plomo en las pinturas, o sea el 45 % del total de países del mundo, el resto indicó que no tenía controles o directamente no contestó (Figura 3.1).

En los países con leyes establecidas para el contenido de plomo en pinturas, el límite máximo aceptado depende del bloque comercial: 90 mg/kg para la Unión Europea, China y los Estados Unidos, 600 mg/kg para el MERCOSUR y 1000 mg/kg para Oceanía (Figura 3.2).

Las pinturas viejas, que generalmente se encuentran en casas pintadas antes de la década de 1980, contienen niveles de plomo superiores a 10 000 mg/kg (Clark et al., 2015). Por lo tanto, para un control efectivo de la pintura dentro de los hogares, la metodología analítica debe abordar este rango de concentración extendido para el cual hay que considerar el efecto matriz.

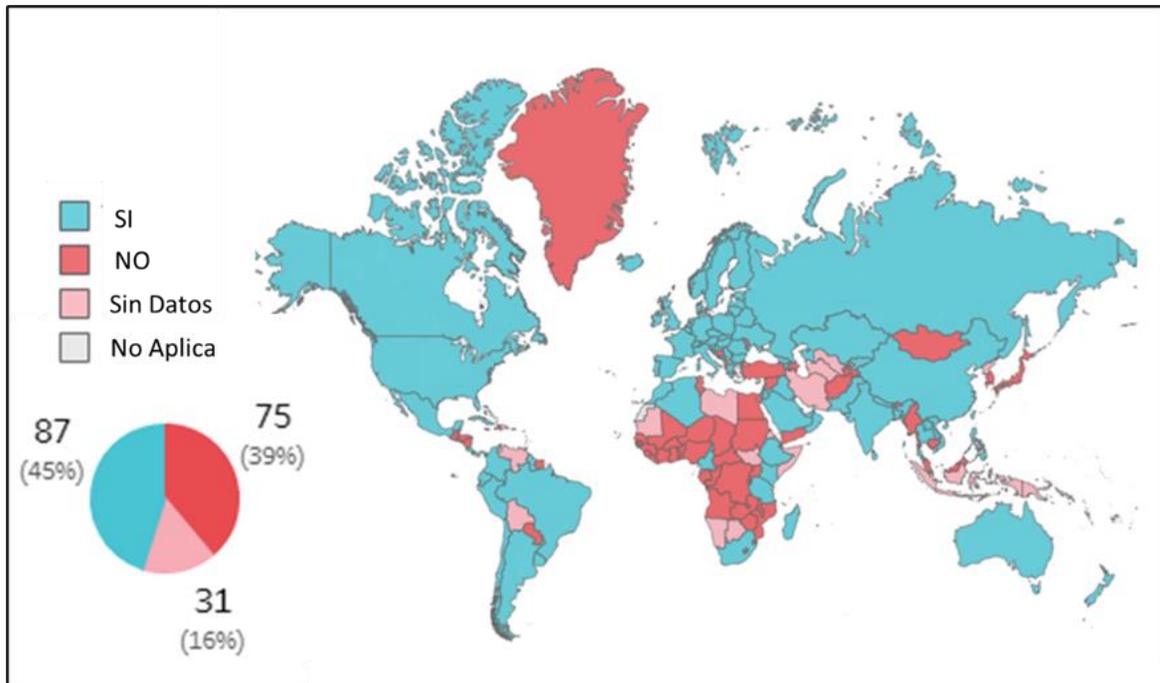


Figura 3.1. Países con leyes establecidas para plomo en pinturas al 31 de diciembre de 2022. Fuente de datos: <https://saicmknowledge.org/content/lead-paint-law-map> (acceso 15 mayo 2023).

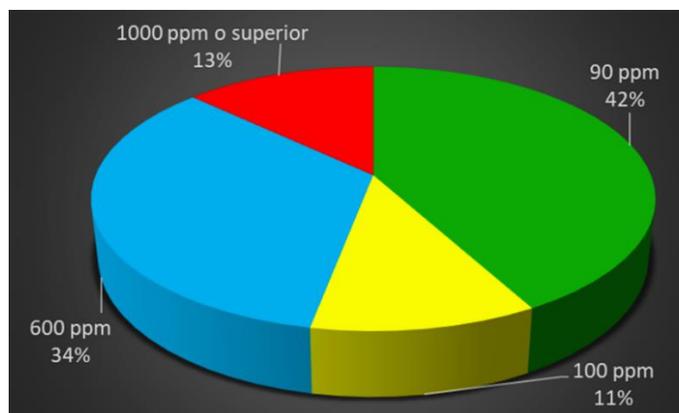


Figura 3.2. Porcentaje de países con los diferentes límites establecidos en el mundo para plomo en pinturas al 31 de diciembre de 2021. Tomado de UNEP, 2021.

Un programa gubernamental que incluya inspecciones masivas para detectar plomo en los hogares, se beneficiaría si tuviera una herramienta descentralizada para discriminar entre muestras positivas y negativas, seguida de un análisis preciso. El uso de grandes equipos centralizados no se tiene en cuenta para este esfuerzo, y se descartan los análisis con ICP y de fluorescencia de rayos X de mesada (XRF). Una buena alternativa son los XRF portátiles; sin embargo, el costo de las unidades individuales sigue siendo alto para inspecciones masivas (Shah et al., 2018). Por otro lado, los nuevos sistemas descentralizados, como los biosensores para la detección de metales pesados basados en nanotecnología, están aún lejos para ser aplicados en muestras reales (Maghsoudi et al., 2021; Mazumdar et al., 2010).

Debido a la necesidad de una metodología analítica rápida, confiable y económica que pueda cuantificar el plomo en las pinturas, se implementó el método voltamperométrico de redisolución anódica con onda cuadrada (*square-wave analytical stripping voltammetry*, SWASV), acoplada a una extracción ácida en baño ultrasónico (Ashley, 1998). Los electrodos clásicos de película de mercurio empleados con esta técnica fueron

reemplazados por los electrodos de película de bismuto, una plataforma verde bien establecida (Jovanovski et al., 2017; Wang et al., 2000). El uso de materiales de referencia certificados de pinturas con y sin plomo se usaron para la validación del método.

El método desarrollado fue aplicado en un programa de monitoreo *in situ* realizado en casas de barrios ubicados en las zonas periféricas de Montevideo y Canelones, en donde la mayoría de las puertas, ventanas y muebles aún tenían restos de pinturas viejas con plomo. En la selección de los hogares se priorizaron aquellos habitados por bebés o niños en edad escolar. Se empleó como herramienta de barrido para el análisis de plomo *in situ* “el método de la toalla” o del “trapo húmedo” (*Dust Wipe Method, DWM*) (Lewis et al., 2006). Las muestras positivas y dudosas se recogieron raspando una pequeña área de pintura y fueron analizadas posteriormente electroquímicamente. Finalmente, se empleó un análisis FTIR de las virutas de pintura para la identificación de sus componentes. Para el método electroquímico descentralizable, se emplearon potenciostatos y digestores portátiles. Cabe señalar que el uso de electrodos serigrafiados en esta etapa no arrojó buenos resultados, ya que tanto los tratamientos electroquímicos empleados (ondas cuadradas) como el procedimiento de adiciones estándar producía un debilitamiento de la capa serigrafiada, con resultados no reproducibles.

3.2. Materiales y métodos

El material de plástico se usó tal como fue adquirido y nunca se reutilizó. En todo el trabajo se utilizó agua ultrapura MilliQ® (resistividad > 18.2 Mohm cm). El material de vidrio se sumergió en HNO₃ 10 % (v/v) durante la noche y se enjuagó con abundante agua ultrapura

varias veces. El sistema electroquímico fue enjuagado con agua ultrapura después de cada uso. El electrodo de carbono vítreo se pulió con una dispersión de alúmina comercial de 0.05 μm (MicroPolish TM, Buehler, Alemania) sobre una felpa específica (Buehler 40-7212, Alemania), seguido de un breve ultrasonicado y varios enjuagues con agua ultrapura. Para el transporte, la superficie del electrodo se protegió con una gota de agua ultrapura para evitar el contacto con el aire.

3.2.1. Soluciones y Reactivos

El *buffer* acetato (0.1 M, pH 4.6) se preparó en matraz aforado de 100 mL con 0.821 g de acetato de sodio anhidro (Carlo Erba, 99 %), 590 μL de ácido acético glacial (R. Benzo, 99.8 %) y agua ultrapura hasta enrasar. La solución fue preparada semanalmente y almacenada a 4 °C. La solución estándar de Bismuto (1000 mg/L) se preparó a partir de la sal $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Fluka, ≥ 98 %, contenido de Pb < 0.002 % w/w) en HCl 1% (v/v) (Carlo Erba, 37 %, contenido de Pb < 0.002 % w/w). Un mL de la solución estándar de Bi se agregó a un matraz aforado de 50 mL y se llevó a volumen con *buffer* acetato 0.1 M, de forma tal de obtener una solución de trabajo de Bi de 20 mg/L.

3.2.2. Soluciones estándar de Pb y material de referencia certificado

Se empleó una solución estándar comercial de Pb de 1000 mg/L en HCl 2 % (w/w), (Sigma), la que fue diluida para la preparación de las soluciones de trabajo de Pb. Se emplearon dos materiales de referencia certificados (CRM):

- pintura en polvo libre de Pb (CRM050, Lote #LRAB3777, fecha de vencimiento 31.12.2021, SUPELCO) certificada con un contenido en Pb < 0.01 mg/kg
- pintura en polvo con Pb (SQC074, Lote #LRAB6519, fecha de vencimiento

31.12.2020, SUPELCO), certificada con un contenido de Pb de 1400 ± 25 mg/kg.

Los análisis se llevaron a cabo antes de las fechas de vencimiento.

3.2.3. Detección de Plomo con el *Dust Wipe Method* (DWM)

La presencia de plomo en superficies de paredes y puertas fue evaluado mediante el *Dust Wipe Method* (DWM) implementado en la norma NIOSH #9105 (Esswein & Kevin Ashley, 1996). El polvo presente (vehículo usual del plomo) se retiró de una superficie de 100 cm^2 con la ayuda de una toalla humectada con una solución de HNO_3 1 % (v/v) (Carlo Erba, 65 %) y posteriormente se aplicó sobre la misma en forma de *spray* la solución indicadora compuesta por 0.15 % (w/v) de rodizonato de sodio (Sigma-Aldrich, 97 %), el cual es preparado diariamente con agua ultrapura fría ($2 \text{ }^\circ\text{C}$). Una coloración roja característica indica la formación del complejo de rodizonato de Pb.

El límite de detección (LOD) para el DWM, según lo descrito en el método NIOSH #9105 (Esswein & Kevin Ashley, 1996), se encuentra entre 5 y $10 \mu\text{g}$, del mismo orden que el LOD para el test de ensayo a la gota que se encuentra entre 5 y $15 \mu\text{g}$ (Feigl & Anger, 1972). Las interferencias descritas para este test son: Tl(I), Ag(I), Cd(II), Ba(II) y Sn(II); todos estos iones forman compuestos coloreados con el ion rodizonato, pero con menor sensibilidad que Pb(II); además las coloraciones rosadas o rojas características, sólo son producidas por el ion Pb(II). Dado que existen otros componentes que podrían interferir, como algunos surfactantes, el límite de detección fue chequeado con las toallas húmedas comerciales empleadas en este trabajo (Figura 3.3). El interés en analizar estas toallas comerciales radicó en evitar la importación de las toallas diseñadas para este propósito que se venden en el extranjero.



Figura 3.3. Toallas húmedas utilizadas en el trabajo, usadas originalmente para higiene personal (izquierda) o higiene de bebés (derecha). Foto gentileza de Eduardo Méndez.

El ensayo fue realizado por triplicado, adicionando igual volumen de solución de Pb(II) conteniendo entre 1 a 100 μg . En la Figura 3.4 se observa el ensayo realizado con diferentes concentraciones de plomo, la menor concentración que da claramente positiva se consideró como “positiva”, en este caso corresponde a la posición E, de 10 μg de Pb. Tanto C como D dieron un resultado positivo, pero no pudieron ser concluyentes en las operaciones *in situ*. En estos casos, estos resultados se consideran “sospechosos”.



Figura 3.4. Cantidad de Pb en cada spot (en μg): A = 1, B = 2, C = 5, D = 7, E = 10, F = 20, G = 40, H = 60, I = 80 & J = 100. Foto gentileza de Andrés Ansin.

El área de la zona del ensayo mostrada en la Figura 3.4 es de *ca.* 10 cm^2 , lo que significa que el LOD es de $100 \mu\text{g}/100 \text{ cm}^2$ para un resultado positivo y de $50 \mu\text{g}/100 \text{ cm}^2$ para un resultado sospechoso. La relación de estos valores con el contenido de Pb en la pintura es aún motivo de controversia, pero como referencia, los límites establecidos en algunas normas, indican que el contenido de Pb en las pinturas no debe superar los 600 mg/kg o 0.1 mg/cm^2 . Esta equivalencia implica que 1 cm^2 de muestra pesa 0.17 g .

No hemos encontrado el origen de esta equivalencia, pero algunos cálculos pueden hacerse. Si tenemos en cuenta que la técnica NIOSH pide analizar un área de 100 cm^2 , esto significa que se pueden detectar $100 \mu\text{g}$ Pb en una masa de 17 g de muestra (100 cm^2 de pared), lo que equivaldría a 6 ppm . Por lo tanto, el DWM es un método adecuado para la detección *in situ* de Pb en pinturas.

3.2.4. Preparación de las muestras

Las muestras se prepararon de acuerdo con el método NIOSH #7701 (Ashley, 1996). Se pesaron en una balanza de precisión entre 50 a 400 mg de pintura extraída de paredes o puertas (m_{muestra}) y se transfirió a un tubo Falcon de 50 mL, seguido de la adición de 10 mL de HNO₃ 20 % (v/v). La dispersión se sonicó durante 30 min a temperatura ambiente. Una vez finalizado el procedimiento, se adicionó agua ultrapura hasta los 50 mL, se agitó vigorosamente durante 5 a 10 s y se filtró por membranas de PVDF de tamaño de poro 0.22 μm (Merck-Millipore). El filtrado se analizó por SWASV.

3.2.5. Determinación de Plomo mediante SWASV

El sistema electroquímico consistió de un electrodo de trabajo de carbono vítreo de 3 mm (CHI 104), un electrodo auxiliar de platino (CHI 115) y un electrodo de referencia de AgCl/Ag/0.1 M KCl (CHI 111). Todos los potenciales referidos en este Capítulo están referidos al electrodo de referencia. Como electrolito soporte se empleó un volumen de 9.5 mL de la solución *buffer* pH 4.6. El electrodo de trabajo se cicló inicialmente en la solución *buffer* entre -0.6 V y 0.3 V a 0.1 V/s hasta obtener un registro voltamperométrico estable (normalmente son necesarios 10 ciclos).

Posteriormente se reemplazó la solución con 9.50 a 9.90 mL de *buffer* Bi-acetato, se detuvo la agitación y se aplicó una onda cuadrada con potenciales entre -1.4 V y 0.3 V, con un paso de potencial de 0.02 V, una amplitud de 0.04 V y una frecuencia de 25 Hz. La deposición electroquímica fue realizada a -1.4 V durante 120 s bajo agitación magnética constante. El resultado de este análisis se registró como “blanco”. Posteriormente se agregó una alícuota

de entre 100 y 500 μL ($V_{\text{alícuota}}$) de la muestra o estándar (diluido por un factor f) de manera que el volumen final de solución en la celda fue de 10 mL y se repitió el protocolo analítico. Entre cada corrida, el electrodo de trabajo se limpió aplicando un potencial de 0.4 V durante 140 s, para redissolver oxidativamente cualquier metal remanente amalgamado en la película de Bismuto. El contenido de Pb en la solución ($\text{Pb}_{\text{solución}}$) fue obtenido por el método de adición estándar, mientras que el contenido de Pb en los chips de pintura ($\text{Pb}_{\text{muestra}}$) fue calculada a partir de la $\text{Pb}_{\text{solución}}$, siguiendo los pasos que se detallan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Protocolo para la determinación del contenido de Pb en los chips de pinturas.

Etapas	Procedimiento	Parámetros Involucrados (unidades)	Valor o Rango	¿Puede ser cambiado?
1.	Pesar una lasca o chip con pintura	m_{muestra} (g)	0.050-0.400	Sí, en el rango especificado por el método NIOSH 7701
2.	Digestión a un volumen final	$V_{\text{digestión}}$ (mL)	50	NO. Técnica oficial, método NIOSH 7701
3.	Tomar una alícuota de la digestión	$V_{\text{alícuota}}$ (μL)	100-500	Sí, en un rango limitado, mientras la corriente normalizada de Pb está dentro del rango de 0 a 100 $\mu\text{g} / \text{L}$.
4.	Para altos contenidos de Pb, diluir la muestra $1/f$ (f =factor de dilución)	f	Como sea necesario	Sí, para que la corriente normalizada de Pb esté dentro del rango de 0 a 100 $\mu\text{g}/\text{L}$.
5.	Agregar buffer a la celda electroquímica para tener un volumen final	V_{celda} (mL)	10	NO, es el volumen final para el que se validó la presente técnica electroquímica.

Si se considera una muestra con un contenido de Pb de “ $Pb_{muestra}$ ” (mg Pb/kg muestra), el contenido de Pb en cada etapa está dado por las siguientes ecuaciones:

$$\text{Etapa 1.} \quad Pb (mg) = \frac{Pb_{muestra} m_{muestra}}{1000} \quad (\text{ec. 3.1})$$

$$\text{Etapa 2.} \quad Pb (mg/mL) = \frac{Pb_{muestra} m_{muestra}}{1000 V_{digestión}} \quad (\text{ec. 3.2})$$

$$\text{Etapa 3.} \quad Pb (mg) = \frac{Pb_{muestra} m_{muestra} V_{alícuota}}{(1000)^2 V_{digestión}} \quad (\text{ec. 3.3})$$

$$\text{Etapa 4.} \quad Pb (mg) = \frac{Pb_{muestra} m_{muestra} V_{alícuota}}{(1000)^2 V_{digestión} f} \quad (\text{ec. 3.4})$$

$$\text{Etapa 5.} \quad Pb (\mu g/L) = \frac{Pb_{muestra} m_{muestra} V_{alícuota}}{V_{digestión} f V_{celda}} \quad (\text{ec. 3.5})$$

En la ec. 3.5, el $V_{celda} = 10$ mL y $V_{digestión} = 50$ mL no pueden ser cambiados. Por lo tanto, el cálculo de $Pb_{muestra}$ (mg/kg) viene dado por la ec. 3.6:

$$Pb_{muestra} (mg/kg) = \frac{500 (mL^2) f Pb_{solución}(\mu g/L)}{m_{muestra} (g) V_{alícuota}(\mu L)} \quad (\text{ec. 3.6})$$

3.2.6. Análisis por FTIR de virutas de pintura

Aproximadamente 25 mg de lascas o virutas de pintura se mezclaron con 75 mg de KBr (grado espectroscópico, Pike Technologies, USA) en un mortero de ágata para obtener una mezcla finamente pulverizada. Con esta mezcla se prepararon discos de 13 mm empleando una prensa hidráulica CrushIR™ (Pike Technologies, USA) a una presión de 10 t. La muestra procesada fue analizada por FTIR (IR-Prestige 21, Shimadzu, Japón), entre 4000 y 400 cm^{-1} , promediando 10 barrido a una resolución nominal de 4 cm^{-1} . El procesamiento de los datos implicó la apodización de Happ-Genzel y corrección por CO_2 y humedad. Como blanco se empleó una pastilla de KBr. Los resultados fueron comparados contra una amplia colección de espectros de pigmentos y aditivos de pinturas curada por la Universidad de Tartu (Estonia), la cual está disponible en la siguiente dirección: http://lisa.chem.ut.ee/IR_spectra/paint/ (Vahur et al., 2016).

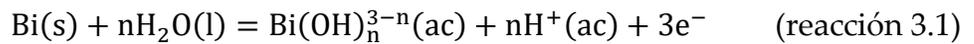
3.3. Resultados y Discusión

El uso de materiales de referencia adecuados permite considerar diferentes aspectos relacionados con la validación del método. Esto incluye la idoneidad del procedimiento de digestión y del método SWASV para la recuperación del plomo en la muestra y su análisis voltamperométrico, la evaluación del efecto matriz, la determinación de la función matemática apropiada para la calibración y la evaluación del punto cero en la calibración (Raposo, 2016).

3.3.1. Electroanálisis sobre electrodos de película de Bi

La redisolución anódica de la película de bismuto sobre el electrodo de carbono vítreo a -1.2 V muestra dos picos (Figura 3.5): uno principal está ubicado a -0.16 V, y un pico menor a -0.55 V.

La contribución principal corresponde a la oxidación de la capa depositada de Bi a Bi^{3+} , el cual es hidrolizado en solución acuosa (Arduini et al., 2010):



La contribución minoritaria ha sido observada por otros autores pero en general no fue asignada a un proceso particular (Lezi et al., 2012; Niu et al., 2016; Vladislavić et al., 2016; Zhou et al., 2016). En algún caso fue atribuida a la formación de Bi_2O_3 a través de la siguiente reacción (Hwang et al., 2008):

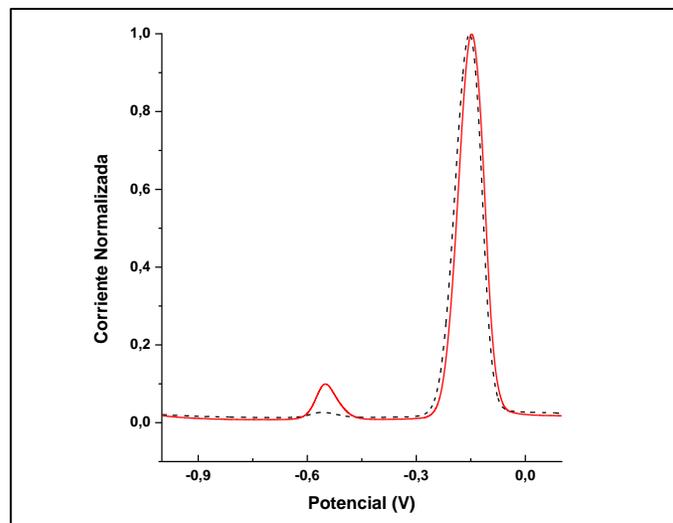
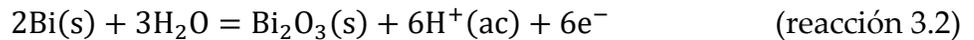


Figura 3.5. Registro normalizado de SWASV para la solución buffer acetato (0.1 M, pH 4.6) en ausencia (línea punteada) y presencia de 30 $\mu\text{g/L}$ de Pb(II) .

También se ha sugerido que la señal pueda provenir del Pb de las trazas de los reactivos (Quintana et al., 2011). Los reactivos empleados en esta Tesis contenían certificación por contenido de plomo (ver Sección 3.2.1), y los valores reportados no alcanzarían para dar la señal observada.

Independientemente de la naturaleza exacta de este pico, la contribución minoritaria a -0.55 V constituye una interferencia para el pico de disolución de Pb (Figura 3.5), por lo que la medida de corriente debe ser corregida. Como el principal pico anódico a -0.16 V (oxidación de la película de Bi) puede ser usado como un estándar interno (Wang et al., 2001), la corriente de desorción oxidativa del Pb se corrige por la contribución minoritaria de corriente (I_{menor}) a -0.55 V, y el resultado es normalizado al pico principal de oxidación de Bi a -0.16 V (I_{Bi}):

$$I_{Pb}(\text{normalizada}) = \frac{I_{Pb} - I_{menor}}{I_{Bi}} \quad (\text{ec. 3.7})$$

Esta señal corregida es la que se estudió en cuanto a su carácter de propiedad aditiva para la concentración de plomo.

3.3.2. Calibración analítica

La calibración analítica general se realizó con soluciones acuosas diseñadas conteniendo iones Pb(II) en un rango de concentraciones entre 5 a 100 $\mu\text{g/L}$, preparadas a partir de diluciones adecuadas de una solución estándar de 1000 mg/L (Figura 3.6). El aumento constante de la desviación estándar en cada nivel de concentración en la regresión lineal, indica que las varianzas no son homogéneas (heterocedasticidad); por lo tanto, se empleó el método de mínimos cuadrados ponderados.

El ajuste lineal a los datos experimentales, considerando el método de mínimos cuadrados ponderados, no mostró evidencia de falta de ajuste en un límite de confianza del 95 % basado en el análisis ANOVA (Tabla 3.2). Sin embargo, la prueba t de Student rechaza la hipótesis de intersección = 0; por lo tanto, con un límite de confianza del 95 %, la intersección ajustada es significativamente diferente de cero. Además, el intervalo del límite de confianza para la intersección no incluye el valor cero, lo que refuerza esta conclusión. Por tanto, se consideró un modelo cuadrático, para el que la prueba t de Student acepta la hipótesis nula y en el límite de confianza del 95 %, la intersección puede considerarse nula.

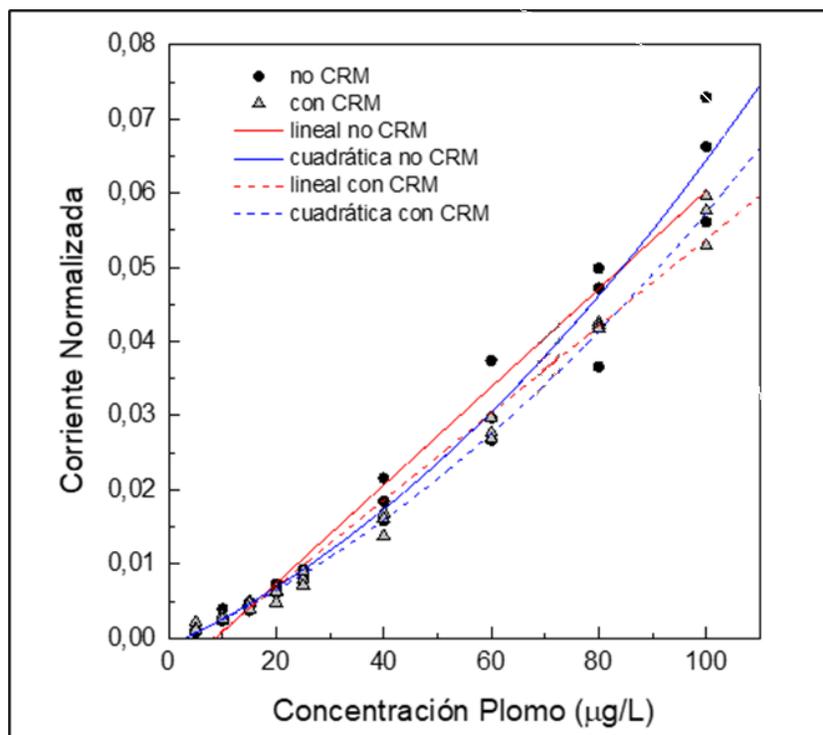


Figura 3.6. Gráficos lineales y cuadráticos de la calibración analítica en ausencia (líneas continuas) y presencia (líneas punteadas) de Material de Referencia Certificado (CRM).

Tabla 3.2. Ajustes lineal y cuadrático de los valores experimentales obtenidos en ausencia del efecto matriz.

	Valor	Error estándar	Valor-t	P > t	Rango de Confianza 95%
Ajuste Lineal					
Intercepto	-0.00577	0.00139	-4.14075	3.45 x 10 ⁻⁴	(-0.00863) – (-0.0029)
Pendiente	6.61x10 ⁻⁴	0.28 x 10 ⁻⁴	23.9888		(6.04x10 ⁻⁴) – (7.18x10 ⁻⁴)
Ajuste Cuadrático					
Intercepto	-0.00103	0.00181	-0.57208	0.57259	(-0.00477) – (0.0027)
Término Lineal	3.32x10 ⁻⁴	0.99x10 ⁻⁴	3.35952	0.0026	(1.28x10 ⁻⁴) – (5.36x10 ⁻⁴)
Término cuadrático	3.23x10 ⁻⁶	0.94x10 ⁻⁶	3.4218	0.00223	(1.28x10 ⁻⁶) – (5.18x10 ⁻⁶)

Estos resultados sugieren que el modelo cuadrático debería ajustarse mejor a los datos que el modelo lineal. Sin embargo, la prueba ANOVA no proporciona evidencia significativa de falta de ajuste para ambos modelos al límite de confianza del 95 % (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Prueba de ANOVA en ausencia del efecto matriz.

	Df	Suma de Cuadrados	Media al cuadrado	Valor F	Probabilidad > F
Ajuste Lineal					
Falta de ajuste	7	1.866 x10 ⁻⁴	2.666x 10 ⁻⁵	1.47883	0.23633
Error Puro	8	3.2447x 10 ⁻⁴	1.803x 10 ⁻⁵		
Error	25	5.11 x 10 ⁻⁴			
Ajuste Cuadrático					
Falta de ajuste	6	1.902x 10 ⁻⁵	3.171x 10 ⁻⁵	0.1759	0.97996
Error Puro	18	3.245x10 ⁻⁴	1.803x 10 ⁻⁵		
Error	24	3.435x10 ⁻⁶			

En vista de los resultados obtenidos, ambos modelos fueron comparados utilizando diferentes criterios: a) el criterio AIC, b) el criterio BIC y c) la prueba de Mandel (prueba F)

(Tabla 3.4). Con un nivel de confianza del 95 %, las tres pruebas indican que es más probable que el modelo cuadrático sea más correcto que el modelo lineal. Estos resultados son una consecuencia del rango de concentración extendido empleado, que conduce a un aumento en la fuerza de adsorción de Pb en el electrodo de película de Bi (Mirceski et al., 2012).

Tabla 3.4. Comparación de los modelos lineal y cuadrático utilizando los criterios Akaike, Bayesiano y prueba de Mandel en ausencia del efecto matriz.

Test AIC	RSS	N	Parámetros	AIC	Peso Akaike
Modelo Lineal	5.1104 x10 ⁻⁴	27	2	-286.57748	0.0184
Modelo Cuadrático	3.4349 x10 ⁻⁴	27	3	-294.53097	0.9816

Test BIC	RSS	N	Parámetros	BIC	Dif. BIC
Modelo Lineal	5.1104 x10 ⁻⁴	27	2	-283.73345	7.43235
Modelo Cuadrático	3.4349 x10 ⁻⁴	27	3	-291.1658	0

Test F			
F	Numeración df	Denominación df	Probabilidad > F
11.70869	1	24	0.0023

3.3.3. Evaluación del efecto matriz

Para evaluar la existencia del efecto matriz, se comparó la curva de calibración obtenida con adición de Pb(II) al buffer Bi-acetato y al CRM libre de plomo, sujetos al protocolo de la preparación de la muestra (Figura 3.6). En el CRM libre de plomo, el contenido de éste se encuentra por debajo de 0.01 mg/kg; esto significa que para una muestra de por ejemplo 0.15 g y un $V_{alícuota}$ de 500 μ L, el contenido esperado de Pb en la celda electroquímica estaría muy por debajo del límite de detección de la metodología desarrollada (ec. 3.5). El efecto matriz (EM) fue cuantificado según la ecuación (Matuszewski et al., 2003):

$$EM (\%) = \left(\frac{I_{CRM-Libre Pb} - I_{no CRM}}{I_{no CRM}} \right) 100 \quad (\text{ec. 3.8})$$

El efecto matriz no varió con la tendencia de la concentración, y la presencia de la matriz se reflejó en una ligera disminución, aproximadamente del 9%, de las corrientes medidas para una concentración de plomo determinada. En comparación con las calibraciones analíticas obtenidas en soluciones sin matriz, las varianzas fueron homogéneas (homocedasticidad) en presencia de CRM libre de plomo dentro del rango de concentraciones analizado. Nuevamente se observó que el modelo cuadrático ofreció un mejor ajuste frente al modelo lineal (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Parámetros obtenidos del ajuste lineal y cuadrático evaluando el efecto matriz.

	Valor	Error estándar	Valor-t	$P > t $	Rango de Confianza 95%
Ajuste Lineal					
Intercepto	-0.00479	7.88×10^{-4}	-6.08121	2.35×10^{-6}	$(-0.00641) - (-0.00317)$
Pendiente	5.86×10^{-4}	0.16×10^{-4}	37.61669		$(5.54 \times 10^{-4}) - (6.18 \times 10^{-4})$
Ajuste Cuadrático					
Intercepto	-8.38×10^{-4}	6.66×10^{-4}	-1.25797	0.2205	$(-0.00221) - (5.37 \times 10^{-4})$
Térmico Lineal	3.12×10^{-4}	0.36×10^{-4}	8.55652	9.4×10^{-9}	$(2.36 \times 10^{-4}) - (3.87 \times 10^{-4})$
Térmico cuadrático	2.70×10^{-6}	0.35×10^{-6}	7.75851	5.4×10^{-4}	$(1.98 \times 10^{-6}) - (3.41 \times 10^{-6})$

Para el ajuste lineal, el test t de Student rechaza la hipótesis nula (intercepto = 0) y, por tanto, en el límite de confianza del 95 %, la ordenada en el origen es significativamente diferente de cero. Además, el intervalo del límite de confianza para la ordenada en el

origen no incluye el valor cero, reforzando la idea de un valor no nulo. En el caso del ajuste cuadrático, el test t de Student acepta la hipótesis nula y, por lo tanto, en el límite de confianza del 95 %, la ordenada en el origen NO es significativamente diferente de cero.

Estos resultados sugieren que el modelo cuadrático debería ajustarse mejor a los datos que el modelo lineal. La prueba ANOVA indica que sólo el modelo cuadrático no da pruebas significativas de falta de ajuste en el límite de confianza del 95 %. Por lo tanto, según este criterio, se puede descartar el modelo lineal (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Prueba de ANOVA para evaluar el efecto matriz.

	Df	Suma de cuadrados	Media al cuadrado	Valor F	Probabilidad $> F$
Ajuste Lineal					
Falta de ajuste	7	1.2496×10^{-4}	1.785×10^{-5}	8.3361	1.408×10^{-4}
Error Puro	8	3.8546×10^{-5}	2.1414×10^{-6}		
Error	25	1.635×10^{-4}			
Ajuste Cuadrático					
Falta de ajuste	6	8.0618×10^{-6}	1.3436×10^{-6}	0.62744	0.70647
Error Puro	18	3.8546×10^{-5}	2.1414×10^{-6}		
Error	24	4.6608×10^{-5}			

Se obtuvo un apoyo adicional utilizando las pruebas del criterio AIC, del criterio BIC y de Mandel (prueba F) (Tabla 3.7).

Tabla 3.7. Comparación de los modelos lineal y cuadrático utilizando los criterios Akaike, Bayesiano y prueba de Mandel evaluando el efecto matriz.

Test AIC	RSS	N	Parámetros	AIC	Peso Akaike
Modelo Lineal	1.63504x10 ⁻⁴	27	2	-317.34822	1.754 x10 ⁻⁷
Modelo Cuadrático	4.66076x10 ⁻⁵	27	3	-348.46058	1
Test BIC	RSS	N	Parámetros	BIC	Dif. BIC
Modelo Lineal	1.63504x10 ⁻⁴	27	2	-314.5402	30.59122
Modelo Cuadrático	4.66076x10 ⁻⁵	27	3	-345.0954	0
Test F					
F	Numeración df	Denominación df		Probabilidad > F	
60.19454	1	24		5.406 x10 ⁻⁸	

Con un nivel de confianza del 95 %, las tres pruebas indican que es más probable que el modelo cuadrático sea el correcto. Sin embargo, debido a que las pinturas contienen una gran variedad de componentes, se eligió el método de adición estándar para la cuantificación de plomo en las muestras de pintura. Además, la combinación de un ajuste al modelo cuadrático con el método de regresión inversa confiere la ventaja de obtener la concentración de Pb con su incertidumbre (Meija et al., 2014; Tellinghuisen, 2000).

3.3.4. Análisis de recuperación

Se utilizó el material certificado (Pb-CRM) para la evaluar la recuperación de Pb al emplear el protocolo analítico propuesto. Una muestra de este material certificado se sometió al protocolo analítico completo y se analizó con el método de adición estándar con regresión

inversa. Se concluye que el procedimiento de extracción empleado fue adecuado para la extracción de Pb de la pintura (tabla 3.8).

Tabla 3.8. Análisis de recuperación media ($n = 3$) de una pintura con plomo CRM

	Pb_{solución} ($\mu\text{g/L}$)	Pb_{muestra} (mg/kg)	% Recuperación Media
Esperado	48.1 \pm 0.9	1400 \pm 25	
Obtenido	53.4 \pm 6.6	1554 \pm 192	111

^a Intervalo aceptado entre 980 a 1830 mg/kg

El uso del ultrasonido fue necesario porque la mayoría de los compuestos de plomo están dispersos en el medio en que se encuentra la pintura. Además, estos compuestos de plomo son solubles en medios ácidos suaves (Tabla 3.9).

Tabla 3.9. Solubilidad de algunos compuestos de plomo

Compuesto	Fórmula	Masa molar (g/mol)	Solubilidad en agua (g/L)	Solubilidad en ácidos y bases
Carbonato de plomo	PbCO ₃	267.2	Insoluble	Ácidos y bases
Cromato de plomo	PbCrO ₄	323.2	Insoluble	HNO ₃ diluido y bases
Hidróxido de plomo	Pb(OH) ₂	241.2	0.016	Ácidos y Bases
Óxido de plomo (II)	PbO	223.2	0.0017	HNO ₃
Óxido de plomo (IV)	PbO ₂	239.2	Insoluble	HCl, HNO ₃ diluido+H ₂ O ₂ , H ₂ C ₂ O ₄
Fosfato de plomo	Pb ₃ (PO ₄) ₂	811.5	Insoluble	HNO ₃ y bases
Sulfato de plomo	PbSO ₄	303.3	0.00425	NaOH
Sulfuro de plomo	PbS	293.3	0.0006	HCl diluido caliente

Datos tomados de (Lide, 1998)

3.3.5. Análisis del blanco analítico

El análisis del blanco fue realizado en CRM sin Pb y permite evaluar la interferencia del pico de oxidación menor, I_{minor} , a -0.55 V. Esta contribución de corriente, medida diez veces con respecto al pico principal de redisolución de Bi, arrojó un valor medio de 0.00114 y una desviación estándar de 0.00083. Sobre la base de estos valores, el límite de detección (LOD) en $\mu\text{g/L}$ para el Pb en la célula electroquímica está dado por la ec. 3.9:

$$\text{LOD} = 2t_{n,\alpha}s\sqrt{\frac{1}{n_S} + \frac{1}{n_B}} \quad (\text{ec. 3.9})$$

donde $t_{n,\alpha} = 1.812$ es el valor del test de Student para una cola $\alpha = 0.05$ y $n = 10$, s es la desviación estándar, n_B es el número de blancos analizados y n_S es el número de réplicas de la solución problema. Para este protocolo de trabajo $n_B = n_S = 1$. El LOD calculado para la celda es de $14 \mu\text{g/L}$, mientras que el límite de cuantificación (LOQ), calculado como $10s$ es de $23 \mu\text{g/L}$. Estos valores de LOD y LOQ para el contenido de plomo en la solución electroquímica, implica concentraciones de Pb en las virutas de pintura de 35 mg/kg y 58 mg/kg , respectivamente, utilizando 400 mg de muestra problema y un volumen de digestión ($V_{\text{alícuota}}$) de $500 \mu\text{L}$. Por lo tanto, este protocolo es adecuado para determinar la concentración de Pb en pinturas, según los límites actualmente establecidos en cualquiera de las normas empleadas a nivel mundial (90 mg/kg y 600 mg/kg).

3.3.6. Análisis en Muestras Reales

El conjunto de técnicas propuestas permite diseñar un protocolo descentralizado que se pueda aplicar en campo.

Diseño de un protocolo descentralizado. El protocolo que se propone involucra las siguientes etapas:

- Detección de la presencia de plomo a nivel del ensayo DWM. Este análisis, de tipo +/-, cumple con dos finalidades: descartar las muestras negativas, evitando las siguientes etapas del protocolo, y detectar “puntos calientes” en zonas de muestreo, dada la facilidad de su uso.
- Análisis por SWASV de las muestras positivas o dudosas en el ensayo DWM. Si se emplean digestores y potenciostatos portátiles, la técnica es factible de realizarse en campo. Idealmente el uso de electrodos serigrafiados hubiera sido ideal, pero como ya se comentó, los intentos de adaptar estos electrodos a la técnica SWASV no fueron buenos. En forma alternativa, las muestras pueden almacenarse en tubos Falcon y trasladarse al laboratorio para su análisis posterior.
- Complementar el estudio de las muestras con un análisis por FTIR. Este análisis necesariamente se lleva a cabo en el laboratorio, debido a las dimensiones del equipo. De todos modos, ya se están comercializando equipos Raman de mano que permitirían cumplir el mismo propósito.

Aplicación en campo. El procedimiento analítico completo se aplicó en 50 hogares en dos barrios de Montevideo y Canelones (Uruguay)⁸ (Fotos en Anexo III). Las viviendas de estos

⁸ El trabajo en campo fue posible gracias a la invitación del Ministerio de Industria, Energía y Minería a participar de su programa de eficiencia energética en el año 2019. Las medidas de plomo se complementaron con medidas realizadas con un equipo portátil de fluorescencia de rayos X de la Intendencia de Montevideo; sin embargo, este equipo mostró fallas durante los procedimientos, y no se pudieron usar los datos con fines comparativos. Para el trabajo en campo se contó con la colaboración de la Institución “El Abrojo” cuyos integrantes recibieron una capacitación por parte del Laboratorio de Biomateriales en el uso del método DWM.

barrios están construidas con materiales básicos, complementado con puertas y ventanas con pinturas viejas, así como algunos muebles, que se obtienen principalmente como materiales reciclados. Estas piezas ya han sido pintadas, probablemente antes de los años 80, constituyendo una de las principales fuentes de Pb en el hogar. Otra fuente de Pb es el uso de pinturas antiguas que se recuperan mediante la adición de disolventes adecuados.

El protocolo consistió en una inspección inicial realizada con el DWM en una superficie seleccionada de unos 100 cm² para determinar las muestras positivas o sospechosas. Estas muestras se retiraron cuidadosamente de la superficie con una navaja y se guardaron en un tubo Falcon con tapa de rosca. Tras el procedimiento de digestión, las muestras se analizaron para determinar el contenido de Pb mediante el protocolo SWASV previamente descrito. Por último, como prueba confirmatoria adicional, las muestras se analizaron por FTIR para identificar los componentes de la pintura comparándolos con estándares publicados. En la Figura 3.7 se observan los resultados obtenidos.

De las 50 muestras a analizadas, el DWM detectó 4 muestras positivas y 5 sospechosas. Por lo tanto, el 18 % del total de muestras inspeccionadas fue analizada mediante el protocolo electroquímico, previamente descrito, para tener resultados precisos. De las 4 muestras positivas por el método DWM, dos de ellas dieron concentraciones por encima de los 600 mg/kg, mientras que las otras dos dieron por encima de 30 000 mg/kg. En cuanto a las 5 muestras sospechosas, el método electroquímico no pudo detectar Pb en ninguna de ellas ($[Pb] < 35 \text{ mg/kg}$), indicando que el DWM produce falsos positivos en el LOD, lo que es un resultado deseable en las pruebas rápidas (Rossiter et al., 2000). El 82 % de las muestras analizadas por el método del DWM dan resultados seguros, sin necesidad de nuevos

análisis, por lo tanto, la aplicación de esta técnica implica una disminución significativa de los costos para el monitoreo *in situ* de plomo en hogares.

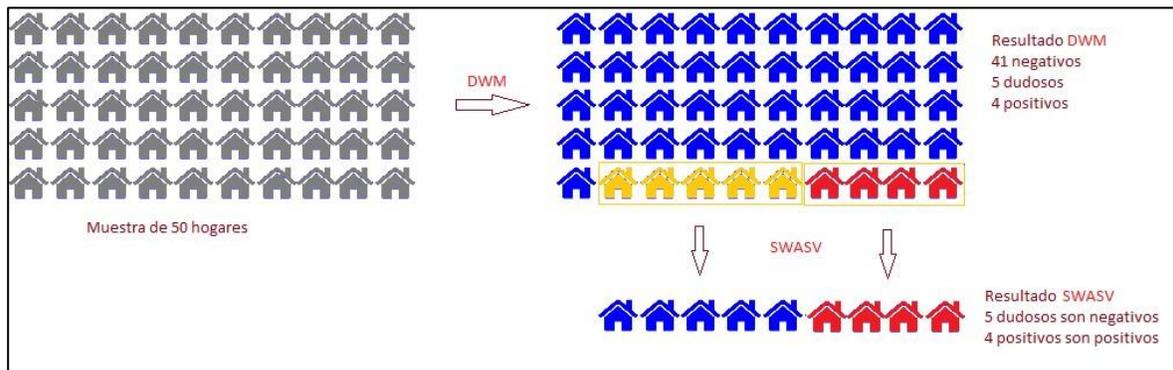


Figura 3.7. Resumen de los resultados obtenidos en las inspecciones realizadas *in situ* empleando el DWM y las metodologías electroquímicas. Tomado de: Ansin et al., 2022.

Actividades adicionales. En el ejercicio de análisis en campo, se puede detectar de forma sencilla y muy económica la presencia de plomo en el hogar. Como trabajo adicional, en aquellos hogares en que se encontró plomo, se indicó a los progenitores que hicieran una consulta a la Unidad Pediátrica Ambiental de ASSE/Hospital de Clínicas, para controlar a los menores habitantes de esos hogares. En todos los casos positivos, las familias respondieron positivamente, y en ningún caso, los niños estaban con niveles de plomo que requirieran cuidado.

3.3.7. Análisis detallado de casos

Con el fin de ilustrar la aplicación de un protocolo completo de base descentralizada, para la detección de plomo en el hogar, mostraremos 3 ejemplos diferentes, que denominamos Caso I, II y III (Tabla 3.10).

Tabla 3.10. Resumen de las muestras analizadas con la metodología propuesta.

Caso	Muestra	DWM ^a	[Pb] ^b (mg/kg)	FTIR
I	Pintura verde oscura de una ventana ubicada en un edificio público antiguo	+++	30 000 LCI = 23 000 LCS = 36 000	Amarillo cromo (pigmento) y aceite de linaza (aglomerante)
II	Pintura blanca en paredes de una casa antigua en Montevideo	+++	90 000 LCI = 80 000 LCS = 100 000	Blanco de plomo (pigmento) y yeso (relleno)
III	Pintura amarilla clara de paredes del Laboratorio de Biomateriales, Facultad de Ciencias, Udelar	-	< 35	Mezcla de carbonatos sin Pb

^a DWM (Método NIOSH 9105). En función de la presencia y la intensidad de la prueba, se da una descripción cualitativa de los resultados como - (negativo), +/- (dudoso), ó + ... +++ (positivo, mayor concentración). ^b LCI y LCS son los límites inferior y superior del intervalo de confianza del 95%, respectivamente.

Caso I. Corresponde a una ventana de un edificio público de la ciudad de Montevideo, pintada de color verde oscuro, en buen estado, sin descascaramientos visibles. Para la toma de la muestra, se raspó en pequeñas zonas de la ventana con una navaja. El resultado obtenido por el DWM dio un consistente resultado positivo, el cual estuvo en concordancia con lo obtenido por el método electroquímico (dilución 1/10) de 30000 mg/kg. Además de plomo, el análisis electroquímico detectó la presencia de zinc y cobre (figura 3.8).

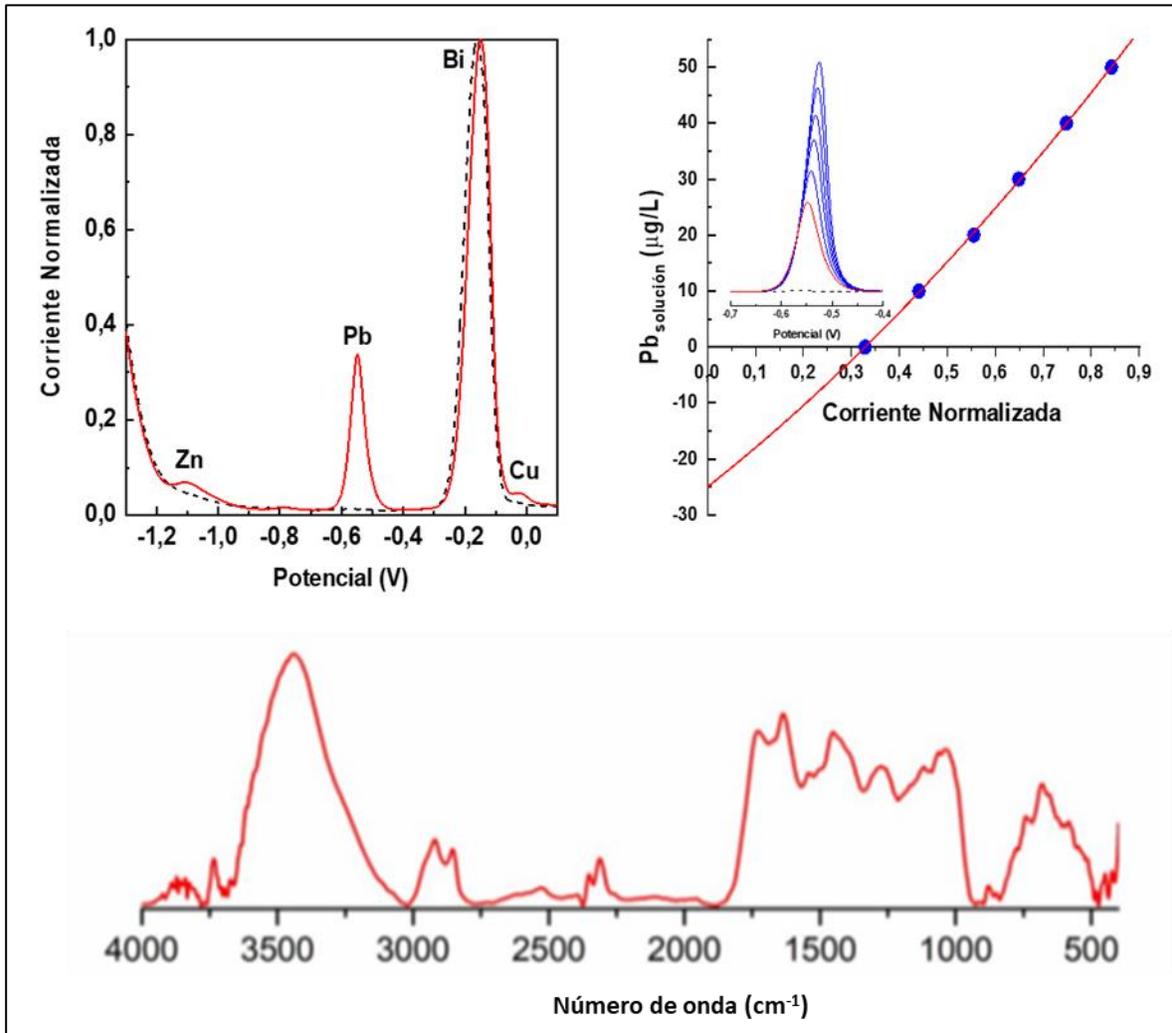


Figura 3.8. Análisis electroquímico y FTIR de la pintura del Caso I.

El método de adiciones estándar ajustó mejor al modelo cuadrático frente al lineal (según criterios BIC y *F*-Test, el criterio AIC favorece la curva lineal). Los ejes se intercambiaron para obtener la $Pb_{\text{solución}}$ directamente del gráfico, así como el intervalo de confianza del 95 %. Los datos obtenidos fueron para la concentración de $Pb_{\text{solución}}$ de 25 µg/L (IC: 19 µg/L – 30 µg/L), mientras que la cantidad de Pb_{muestra} fue de 30 000 mg/kg (IC: 23 000 mg/kg – 36 000 mg/kg). El análisis por FTIR reveló la presencia de “amarillo cromo” como pigmento,

diluido en aceite de linaza, usado como aglomerante; el color verde de la pintura fue probablemente preparado por una mezcla de cromo amarillo con el pigmento azul Prusia, un color identificado como verde cromo (Gooch, 2002) o verde Brunswick (Alphen, 1998) (Tabla 3.11).

Tabla 3.11. Bandas de absorción en el FTIR de la pintura del Caso I

Cromo Amarillo (cm⁻¹)	Aceite de Linaza (cm⁻¹)	Experimental (cm⁻¹)	Asignación
	495 <i>d</i>	448 <i>d</i>	Aceite de Linaza
595 <i>f</i>	581 <i>m</i>	580 <i>h</i>	Aceite de Linaza
627 <i>f</i>		649 <i>f</i>	PbCrO ₄
		677 <i>f</i>	¿?
	721 <i>f</i>	730 <i>d</i>	Aceite de Linaza
853 <i>f</i>		848 <i>d</i>	PbCrO ₄
967 <i>d</i>			
1040 <i>f</i>		1033 <i>f</i>	PbCrO ₄
	1098 <i>m</i>		
1173 <i>h</i>	1160 <i>f</i>	1121 <i>f</i>	PbCrO ₄ + Aceite de Linaza
	1237 <i>m</i>		
		1270 <i>f</i>	¿?
	1461 <i>m</i>	1453 <i>f</i>	Aceite de Linaza
	1655 <i>d</i>	1634 <i>f</i>	Aceite de Linaza
	1742 <i>f</i>	1733 <i>f</i>	Aceite de Linaza
	2853 <i>f</i>	2853 <i>m</i>	Aceite de Linaza
	2923 <i>f</i>	2922 <i>m</i>	Aceite de Linaza
	3010 <i>m</i>		
		3440 <i>f</i>	

Nota. Fuerza relativa de las señales: *d*: débil, *m*: media, *f*: fuerte y *h*: hombro

Caso II. Corresponde a una casa antigua de familia, la cual estaba en renovación. El área de la cocina presentaba descascaramientos importantes, los cuales fueron tomados como muestras para los análisis. El DMW aplicado *in situ*, arrojó un resultado positivo contundente, el cual estuvo en concordancia con el análisis electroquímico que dio 90 000 mg/kg de Pb. El análisis electroquímico (dilución 1/100) confirmó la presencia de Pb, así como de Zn (Figura 3.9). El método de adición estándar produjo una línea recta que representó un mejor ajuste que la curva cuadrática (apoyado por los criterios AIC y Test *F*, mientras que el criterio BIC no fue concluyente). Se intercambiaron los ejes para obtener la concentración de Pb_{solución} directamente del gráfico, la cual fue de 72 µg/L (IC: 64 µg/L – 80 µg/L), mientras que la concentración de Pb en la muestra fue de 90000 mg/kg (IC: 80000 mg/kg – 100000 mg/kg).

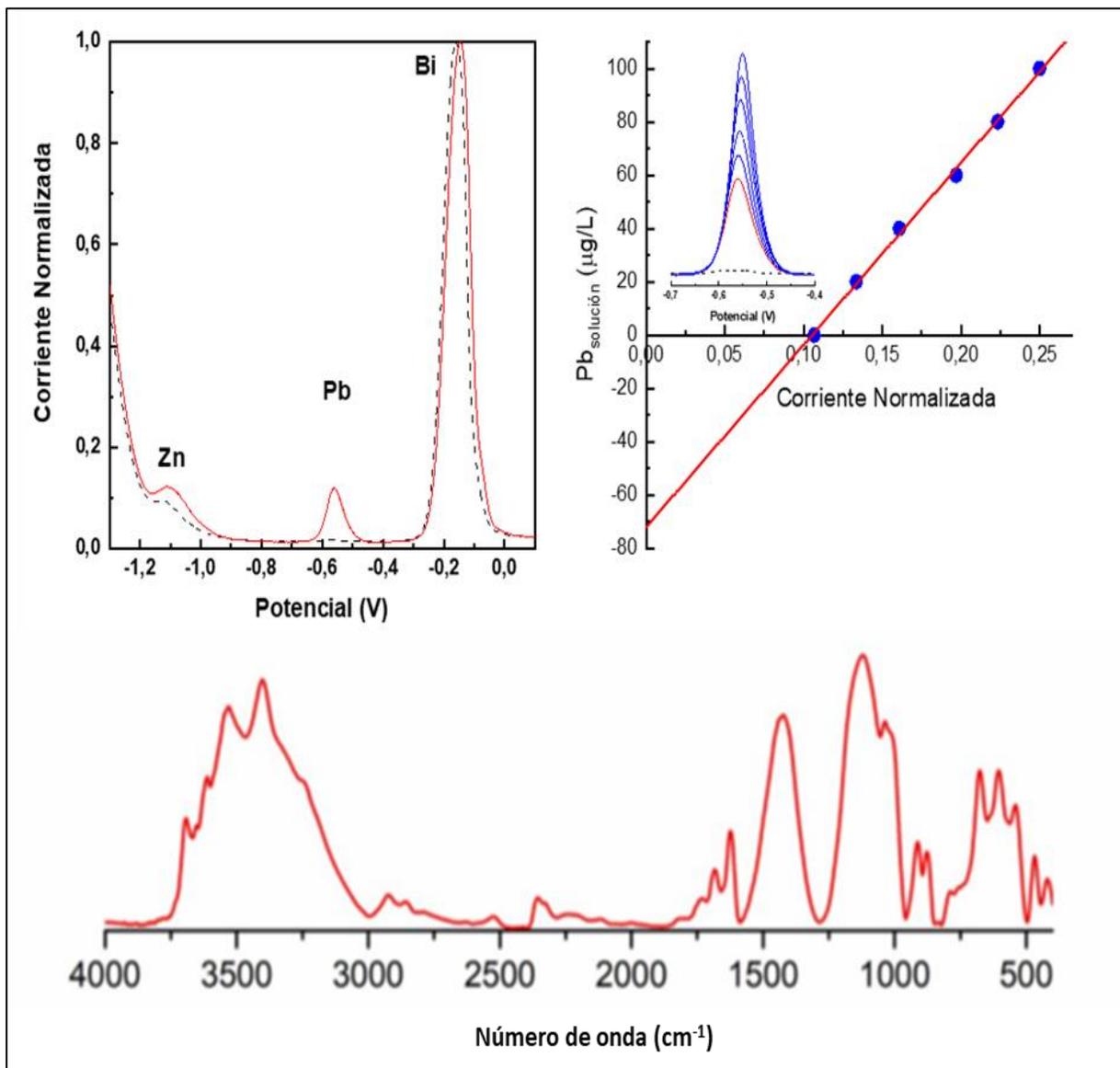


Figura 3.9. Análisis electroquímico y FTIR de la pintura del Caso II

El análisis por FTIR (Figura 3.9 y Tabla 3.12) identificó al "blanco de plomo" $[2\text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2]$ como el pigmento y al yeso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) como agente de secado.

Tabla 3.12. Bandas de absorción en el FTIR de la pintura del Caso II

Plomo Blanco (cm ⁻¹)	Yeso (cm ⁻¹)	Experimental (cm ⁻¹)	Asignación
	418 <i>m</i>	418 <i>m</i>	CaSO ₄ . 2H ₂ O
	460 <i>m</i>	468 <i>m</i>	CaSO ₄ . 2H ₂ O
		541 <i>m</i>	¿?
	596 <i>f</i>	604 <i>f</i>	CaSO ₄ . 2H ₂ O
	667 <i>f</i>		
678 <i>f</i>		676 <i>f</i>	2PbCO ₃ .Pb (OH) ₂
691 <i>h</i>			
	729 <i>d</i>		
762 <i>m</i>			
833 <i>d</i>			
853 <i>d</i>			
	879 <i>m</i>	876 <i>m</i>	CaSO ₄ . 2H ₂ O
891 <i>d</i>			
	1005 <i>h</i>	1003 <i>m</i>	CaSO ₄ . 2H ₂ O
1045 <i>f</i>		1035 <i>f</i>	2PbCO ₃ .Pb (OH) ₂
	1108 <i>f</i>	1121 <i>f</i>	CaSO ₄ . 2H ₂ O
1364 <i>h</i>			
1397 <i>f</i>		1424 <i>f</i>	2PbCO ₃ .Pb (OH) ₂
	1445 <i>m</i>		
1541 <i>h</i>			
	1620 <i>f</i>	1623 <i>m</i>	CaSO ₄ . 2H ₂ O
	1683 <i>m</i>	1683 <i>m</i>	CaSO ₄ . 2H ₂ O
1729 <i>m</i>		1735 <i>d</i>	2PbCO ₃ .Pb (OH) ₂
	2324 <i>d</i>	2325 <i>d</i>	CaSO ₄ . 2H ₂ O
2849 <i>d</i>		2858 <i>d</i>	2PbCO ₃ .Pb (OH) ₂
2916 <i>d</i>		2926 <i>d</i>	2PbCO ₃ .Pb (OH) ₂
	3242 <i>d</i>	3244 <i>h</i>	CaSO ₄ . 2H ₂ O
	3402 <i>f</i>	3401 <i>f</i>	CaSO ₄ . 2H ₂ O
	3526 <i>f</i>		
3534 <i>f</i>		3534 <i>f</i>	2PbCO ₃ .Pb (OH) ₂

Nota. Fuerza relativa de las señales: *d*: débil, *m*: media, *f*: fuerte y *h*: hombro

Caso III. Corresponde a una muestra negativa: virutas de la pintura amarilla clara, descascarada de la pared del Laboratorio de Biomateriales de Facultad de Ciencias, UdelaR. Esta pared nunca fue re-pintada, por lo que se estima que data de principios de 1990s (inauguración de la Facultad de Ciencias), época en la que no existía en Uruguay leyes que controlaran el contenido de plomo en las pinturas.

El DWM dio resultados negativos para el Pb. El análisis electroquímico dio una señal menor que fue procesada por el método de adición estándar, con intercambio de ejes. La solución de Pb extrapolada fue de $3.6 \mu\text{g/L} < \text{LOD}$ ($14 \mu\text{g/L}$). Por lo tanto, para las condiciones experimentales utilizados ($m_{\text{muestra}} = 0,396 \text{ g}$ y $V_{\text{alícuota}} = 500 \mu\text{L}$) el contenido de plomo en la muestra es $\text{Pb}_{\text{muestra}} < 35 \text{ mg/kg}$. El análisis FTIR (Figura 3.10) muestra la presencia de dolomita (carbonato mixto de Ca y Mg), junto con el aceite de linaza como aglutinante (Tabla 3.13).

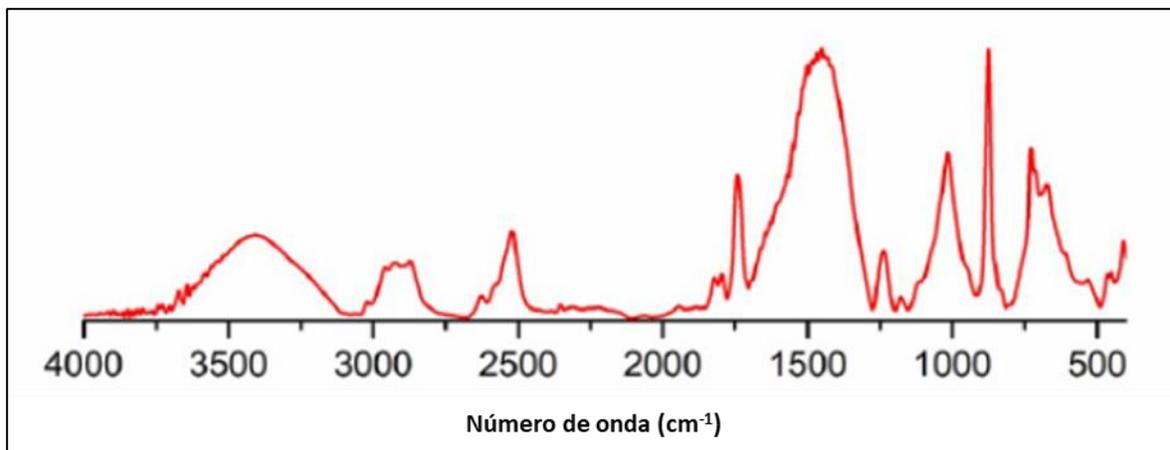


Figura 3.10. FTIR de la pintura del Caso III

Tabla 3.13. Bandas de absorción en el FTIR de la pintura del Caso III

CaMg(CO ₃) ₂ (cm ⁻¹)	Aceite de Linaza (cm ⁻¹)	Experimental (cm ⁻¹)	Asignación
	459 <i>d</i>	465 <i>d</i>	Aceite de Linaza
	721 <i>f</i>	720 <i>f</i>	Aceite de Linaza
726 <i>f</i>		727 <i>f</i>	CaMg(CO ₃) ₂
878 <i>mf</i>		876 <i>mf</i>	CaMg(CO ₃) ₂
	1098 <i>m</i>	1117 <i>h</i>	Aceite de Linaza
	1160 <i>f</i>		
	1237 <i>m</i>	1236 <i>m</i>	Aceite de Linaza
1431 <i>mf</i>	1461 <i>m</i>	1450 <i>f</i>	CaMg(CO ₃) ₂ + Aceite de Linaza
	1742 <i>f</i>	1741 <i>f</i>	Aceite de Linaza
	2853 <i>f</i>	2874 <i>m</i>	Aceite de Linaza
	2923 <i>f</i>	2926 <i>m</i>	Aceite de Linaza
	3010 <i>m</i>	3021 <i>d</i>	Aceite de Linaza
		3406 <i>f</i>	

Nota. Fuerza relativa de las señales: *d*: débil, *m*: media, *f*: fuerte, *mf*: muy fuerte y *h*: hombro

3.4. Conclusiones

Se desarrolló un procedimiento general para la evaluación de plomo en hogares buscando principalmente simplicidad, precisión y bajo costo. El procedimiento comienza con la selección *in situ* de muestras asistidas por el conocido método DWM, seguido del análisis de estas muestras mediante voltamperometría de onda cuadrada con redisolución anódica en electrodos de bismuto, previa digestión ácida y extracción por ultrasonido. El procedimiento puede llevarse a cabo *in situ*, obteniendo resultados en menos de una hora.

El análisis FTIR aportó pruebas adicionales de la naturaleza química de las muestras, ayudando a identificar los pigmentos con base de plomo, así como los rellenos y los aglutinantes utilizados en la fabricación de las pinturas. El método electroquímico validado en este trabajo ofrece una alternativa más ecológica que el análisis basado en el mercurio, así como una alternativa al análisis de ICP, que es costoso y no está descentralizado. Las altas recuperaciones indican que la extracción asistida por ultrasonidos es suficiente para el tratamiento de la muestra. Desde el punto de vista analítico, se demostró que el modelo cuadrático puede implementarse fácilmente en el método de adición estándar, incluyendo la evaluación de errores empleando gráficos inversos. Ambos procedimientos parecen estar descuidados en muchos estudios; aquí se demuestra que este método es fácil como el método lineal aplicado a muestras reales. Los LOD y LOQ obtenidos siguiendo el protocolo propuesto, son adecuados para el análisis de muestras de virutas de pintura para los límites establecidos para el contenido de plomo de 90 mg/kg (Unión Europea y EEUU) y 600 mg/kg (MERCOSUR). Con el permiso por escrito de las familias y las autoridades, un equipo multidisciplinar llevó a cabo 50 inspecciones, en hogares, jardines de infancia y edificios públicos, para determinar la presencia de plomo. En el mismo día, se pudo identificar la fuente de plomo, proporcionar un análisis preciso de la muestra e iniciar el proceso de eliminación o repintado de la fuente contaminada, así como enviar a los niños a una evaluación médica. En resumen, se diseñó un control domiciliario de alto impacto que permite el análisis preciso del plomo a un coste asequible, lo que permite realizar inspecciones masivas.

La metodología propuesta ha sido presentada a las autoridades del Ministerio de Salud de Uruguay para el desarrollo de un programa oficial de inspección. En el año 2022, se llevó

a cabo una capacitación en la técnica DWM a nivel nacional de los trabajadores del Ministerio de Salud (60 participantes de los 19 departamentos del Uruguay).

3.5. Bibliografía del Capítulo

- Alphen, M. (1998). Paint Film Components. *National Environmental Health Forum*.
- Ansin, A., Botasini, S., & Méndez, E. (2022). *CONVIVIR CON EL PLOMO Un aprendizaje necesario* (C. S. E. Permanente (ed.); Primera Ed). (Unidad de Comunicación de la Universidad de la República. <https://udelar.edu.uy/eduper/wp-content/uploads/sites/29/2022/09/plomoconv.pdf>)
- Arduini, F., Calvo, J. Q., Palleschi, G., Moscone, D., & Amine, A. (2010). Bismuth-modified electrodes for lead detection. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 29(11), 1295–1304. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.08.003>
- Ashley, K. (1996). Lead By Portable Ultrasonic Extraction / Asv: Method 7701. *NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM), Fourth Edi(1)*. <https://www.cdc.gov/niosh/docs/96-135/pdf/96-135.pdf>
- Ashley, K. (1998). Ultrasonic extraction of heavy metals from environmental and industrial hygiene samples for their subsequent determination. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 17(6), 366–372. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(98\)00018-1](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(98)00018-1)
- Clark, C. S., Speranskaya, O., Brosche, S., Gonzalez, H., Solis, D., Kodeih, N., Roda, S., & Lind, C. (2015). Total lead concentration in new decorative enamel paints in Lebanon, Paraguay and Russia. *Environmental Research*, 138, 432–438. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.02.020>
- Cousillas, A., Pereira, L., Heller, T., Alvarez, C., & Mañay, N. (2012). Impacts of multidisciplinary actions on environmental lead exposure in Uruguay. *Environmental Geochemistry and Health*, 34(2), 207–211. <https://doi.org/10.1007/s10653-011-9426-y>
- Esswein, E. J., & Kevin Ashley, N. (1996). LEAD IN DUST W IPES: METHOD 9105. *NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM), Fourth Edi(1)*. <https://www.cdc.gov/niosh/docs/96-135/pdf/96-135.pdf>
- Feigl, F., & Anger, V. (1972). *Spot Tests in Inorganic Analysis*. (Elsevier-Amsterdam (ed.)).
- Gooch, J. W. (2002). *Lead-Based Paint Handbook*. Springer US.

- Hu, W., Dong, T., Wang, L., Guan, Q., Song, L., Chen, D., Zhou, Z., Chen, M., Xia, Y., & Wang, X. (2017). Obesity aggravates toxic effect of BPA on spermatogenesis. *Environment International*, 105(March), 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.04.014>
- Hwang, G. H., Han, W. K., Park, J. S., & Kang, S. G. (2008). An electrochemical sensor based on the reduction of screen-printed bismuth oxide for the determination of trace lead and cadmium. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 135(1), 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2008.08.039>
- Iavicoli, I., Fontana, L., & Bergamaschi, A. (2009). The effects of metals as endocrine disruptors. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, 12(3), 206–223. <https://doi.org/10.1080/10937400902902062>
- Jovanovski, V., Hočevnar, S. B., & Ogorevc, B. (2017). Bismuth electrodes in contemporary electroanalysis. *Current Opinion in Electrochemistry*, 3(1), 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2017.07.008>
- Lewis, R. D., Condoor, S., Batek, J., Ong, K. H., Backer, D., Sterling, D., Siria, J., Chen, J. J., & Ashley, P. (2006). Removal of lead contaminated dusts from hard surfaces. *Environmental Science and Technology*, 40(2), 590–594. <https://doi.org/10.1021/es050803s>
- Lezi, N., Economou, A., Dimovasilis, P. A., Trikalitis, P. N., & Prodromidis, M. I. (2012). Disposable screen-printed sensors modified with bismuth precursor compounds for the rapid voltammetric screening of trace Pb(II) and Cd(II). *Analytica Chimica Acta*, 728, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.03.036>
- Lide, D. R. (1998). *CRC Handbook of Chemistry and Physics* (CRC Press (ed.); 79th ed.).
- Maghsoudi, A. S., Shokoufeh, H., Mirnia, K., & Abdollahi, M. (2021). Recent Advances in Nanotechnology-Based Biosensors Development for Detection of Arsenic , Lead , Mercury , and Cadmium. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 803–832.
- Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L., & Chavez-Eng, C. M. (2003). Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 75(13), 3019–3030. <https://doi.org/10.1021/ac020361s>
- Mazumdar, D., Liu, J., Lu, G., Zhou, J., & Lu, Y. (2010). Easy-to-use dipstick tests for detection of lead in paints using non-cross-linked gold nanoparticle-DNAzyme conjugates. *Chemical Communications*, 46(9), 1416–1418. <https://doi.org/10.1039/b917772h>
- Meija, J., Pagliano, E., & Mester, Z. (2014). Coordinate swapping in standard addition graphs for analytical chemistry: A simplified path for uncertainty calculation in linear and nonlinear plots. *Analytical Chemistry*, 86(17), 8563–8567. <https://doi.org/10.1021/ac5014749>

- Mirceski, V., Hocevar, S. B., Ogorevc, B., Gulaboski, R., & Drangov, I. (2012). Diagnostics of anodic stripping mechanisms under square-wave voltammetry conditions using bismuth film substrates. *Analytical Chemistry*, 84(10), 4429–4436. <https://doi.org/10.1021/ac300135x>
- Mitra, P., Sharma, S., Purohit, P., & Sharma, P. (2017). Clinical and molecular aspects of lead toxicity: An update. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 54(7–8), 506–528. <https://doi.org/10.1080/10408363.2017.1408562>
- Needleman, H. (2004). Lead poisoning. *Annual Review of Medicine*, 55(1), 209–222. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.55.091902.103653>
- Niu, P., Fernández-Sánchez, C., Gich, M., Navarro-Hernández, C., Fanjul-Bolado, P., & Roig, A. (2016). Screen-printed electrodes made of a bismuth nanoparticle porous carbon nanocomposite applied to the determination of heavy metal ions. *Microchimica Acta*, 183(2), 617–623. <https://doi.org/10.1007/s00604-015-1684-4>
- Njati, S. Y., & Maguta, M. M. (2019). Lead-based paints and children's PVC toys are potential sources of domestic lead poisoning – A review. *Environmental Pollution*, 249, 1091–1105. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.062>
- O'Connor, D., Hou, D., Ye, J., Zhang, Y., Ok, Y. S., Song, Y., Coulon, F., Peng, T., & Tian, L. (2018). Lead-based paint remains a major public health concern: A critical review of global production, trade, use, exposure, health risk, and implications. *Environment International*, 121(September), 85–101. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.08.052>
- Quintana, J. C., Arduini, F., Amine, A., Punzo, F., Destri, G. L., Bianchini, C., Zane, D., Curulli, A., Palleschi, G., & Moscone, D. (2011). Part I: A comparative study of bismuth-modified screen-printed electrodes for lead detection. *Analytica Chimica Acta*, 707(1–2), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.08.052>
- Raposo, F. (2016). Evaluation of analytical calibration based on least-squares linear regression for instrumental techniques: A tutorial review. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 77, 167–185. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.12.006>
- Rossiter, W. J., Vangel, M. G., McKnight, M. E., & Dewalt, G. (2000). *Spot Test Kits For Detecting Lead in Household Paint : A Laboratory Evaluation*. 102.
- Schukraft, J., & Rhys Bernard, D. (2021). Global Lead Exposure Report. *Rethink Priorities*, 1–37. <https://rethinkpriorities.org/publications/global-lead-exposure-report>
- Shah, M. P., Shendell, D. G., Meng, Q., Ohman-Strickland, P., & Halperin, W. (2018). Efficacy of a lead based paint XRF analyzer and a commercially available colorimetric lead test kit as qualitative field tools for determining presence of lead in religious powders. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 15(7), 541–548. <https://doi.org/10.1080/15459624.2018.1468078>

- Singh, N., Kumar, A., Gupta, V. K., & Sharma, B. (2018). Biochemical and Molecular Bases of Lead-Induced Toxicity in Mammalian Systems and Possible Mitigations. *Chemical Research in Toxicology*, 31(10), 1009–1021. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00193>
- Tellinghuisen, J. (2000). A simple, all-purpose nonlinear algorithm for univariate calibration. *Analyst*, 125(6), 1045–1048. <https://doi.org/10.1039/b002171g>
- UNEP. (2021). *2020 Update on the Global Status of Legal Limits on Lead in Paint*. December. <https://www.unep.org/resources/report/2020-update-global-status-legal-limits-lead-paint>
- Vahur, S., Teearu, A., Peets, P., Joosu, L., & Leito, I. (2016). ATR-FT-IR spectral collection of conservation materials in the extended region of 4000–80 cm⁻¹. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(13), 3373–3379. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9411-5>
- Vladislavić, N., Buzuk, M., Brinić, S., Buljac, M., & Bralić, M. (2016). Morphological characterization of ex situ prepared bismuth film electrodes and their application in electroanalytical determination of the biomolecules. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 20(8), 2241–2250. <https://doi.org/10.1007/s10008-016-3234-3>
- Wang, J., Anik Kirgöz, Ü., & Lu, J. (2001). Stripping voltammetry with the electrode material acting as a “built-in” internal standard. *Electrochemistry Communications*, 3(12), 703–706. [https://doi.org/10.1016/S1388-2481\(01\)00242-9](https://doi.org/10.1016/S1388-2481(01)00242-9)
- Wang, J., Lu, J., Hocevar, S. B., Farias, P. A. M., & Ogorevc, B. (2000). Bismuth-coated carbon electrodes for anodic stripping voltammetry. *Analytical Chemistry*, 72(14), 3218–3222. <https://doi.org/10.1021/ac000108x>
- Zhou, H., Hou, H., Dai, L., Li, Y., Zhu, J., & Wang, L. (2016). Preparation of dendritic bismuth film electrodes and their application for detection of trace Pb (II) and Cd (II). *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 24(3), 410–414. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2015.08.012>

Capítulo 4. Análisis de nanopartículas de plata

El desarrollo de la nanotecnología en las últimas décadas, fue de la mano con la elaboración de miles de productos en diferentes campos de aplicación. En particular, los productos basados en nanopartículas de plata (AgNPs) han encontrado un gran campo de comercialización como agentes sanitizantes. A pesar del potencial atractivo que presentan estas nanopartículas, se genera una dificultad con su detección y establecimiento de su concentración, lo que implica un inconveniente tanto para conocer su disposición final en el ambiente, así como para conocer su real concentración en los productos desarrollados. En el presente capítulo se estudiarán diferentes metodologías para analizar AgNPs en productos comerciales líquidos que se encuentran actualmente disponibles en el mundo

4.1. Introducción

¿Son realmente las AgNPs el material de plata que claman tener las muestras comerciales líquidas bajo el rótulo “plata coloidal” o “nanoplata”? Esta pregunta básica envuelve diversas dificultades, relacionada al tipo de muestra en dónde se usan y la respuesta no resulta ser sencilla. Las AgNPs, son un tipo de nanopartículas (NPs) con múltiples usos, tanto a nivel industrial como doméstico. Actualmente, según *Nanotechnology Products Database* (NPD), hay más de 11080 productos que contienen diferentes tipos de nanomateriales de ingeniería, distribuidos en 3829 compañías de 68 países de todo el mundo (StatNano Project, 2023). Las AgNPs debido a su reconocida acción bactericida (Chernousova & Epple, 2013; Eckhardt et al., 2013; Kulthong et al., 2010), son las NPs más usadas en la mayoría de los productos con nanotecnología. Según la NPD, más de 1100 de los 11080 productos registrados, están asociados con algún nanoproducto de la plata (AgNPs, nanofibras y nanoporos), resaltando sus propiedades antibacterianas, antifúngicas y de desodorización, siendo en las áreas de la medicina, cosmética y textil en donde más se destaca su presencia. Sin embargo, este hecho no ha sido acompañado por el desarrollo de protocolos analíticos reconocidos que son universalmente aceptados y ampliamente aplicados en todo el mundo por las agencias reguladoras.

La dificultad en el desarrollo de protocolos analíticos para detectar y cuantificar AgNPs depende de varias cuestiones. Primero, la necesidad de separar AgNPs de iones Ag^+ , ya que la mayoría de los métodos analíticos no pueden distinguir entre ambas estructuras. Segundo, la búsqueda de AgNPs en medios reales podría ser una tarea difícil, pues hay que tener en cuenta que la transformación que pueden sufrir puede cambiar la química de su superficie. Finalmente, otra tarea difícil, es la conservación de las AgNPs en su estado

original, y evitar su transformación no deseada debido a los protocolos de los pretratamientos analíticos de la muestra (sonicación, digestión de la matriz, etc).

Una vez que las AgNPs se incorporan en un producto comercial, pueden sufrir diferentes procesos químicos y físicos que cambian drásticamente su identidad química (Figura 4.1). No solo pueden cambiar en la matriz del producto, sino también en el medio ambiente donde el producto finalmente se elimina (Baalousha et al., 2015).

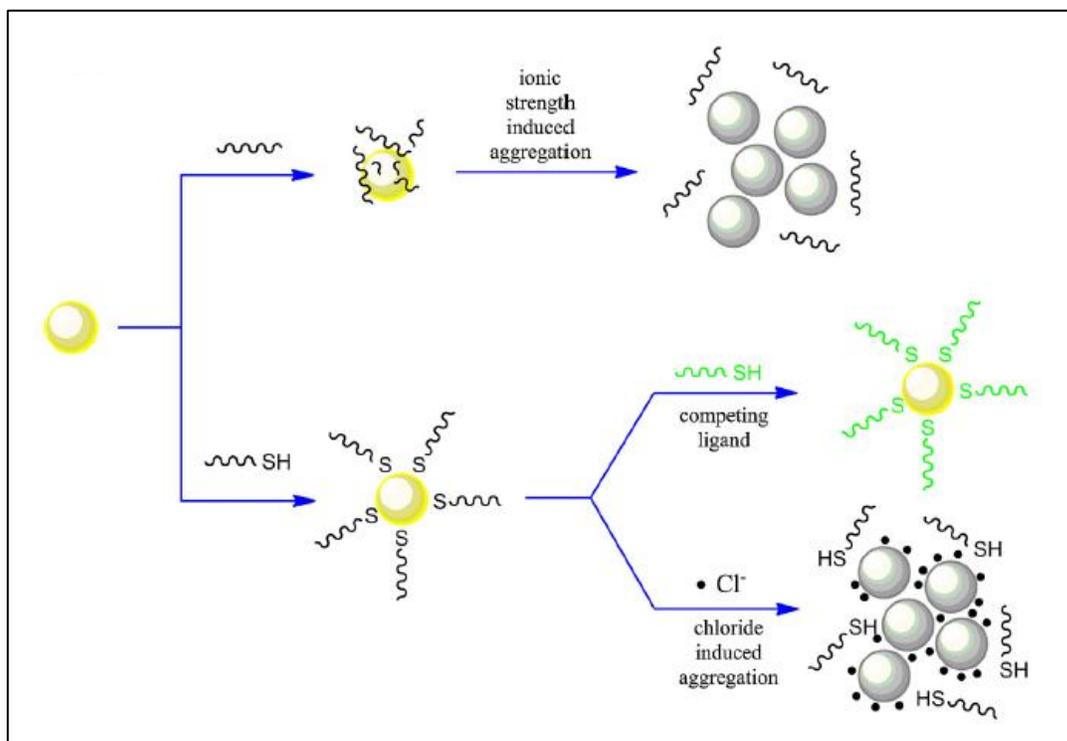


Figura 4.1. Las AgNPs pueden estabilizarse electrostáticamente o covalentemente. En el caso de la estabilización electrostática, el aumento de la fuerza iónica del medio conduce a su agregación, mientras que, para la estabilización covalente, puede ocurrir una reacción de cambio de ligando, o pueden formarse núcleos superficiales de AgCl por la presencia de iones cloruro en el medio, conduciendo a la agregación. Adaptado de Botasini et al., 2013.

Por esta razón, los atributos declarados para un estado dado de una nanopartícula, no necesariamente se cumplen para todas las AgNPs, como la naturaleza química de la superficie y el agente de protección, son claves para determinar las propiedades de las AgNPs.

Para los productos comerciales, una técnica que mide el contenido total de Ag, como es el ICP, no distinguiría entre AgNPs e iones Ag^+ (Rogers et al., 2018). En estos casos, el fraude es un tema relevante, e idealmente, una técnica analítica para ser aplicada en nanoproductos comerciales bajo la etiqueta “contienen nanoplata” debería ser capaz no solo de medir el contenido total de Ag, sino también sus especies más probables como: AgNPs, Ag^+ , AgCl y Ag_2S (Kulthong et al., 2010; Miseljic & Olsen, 2014; Mitrano et al., 2015; Pourzahedi & Eckelman, 2015).

En conclusión, para este tipo particular de muestras, estudiar métodos analíticos que proporcionen una respuesta homogénea e independiente del tamaño y de la naturaleza del agente protector de las NPs, sería ideal para proporcionar un control confiable para los líquidos comerciales que contienen nanoplata. En el presente capítulo, se discuten algunas de estas herramientas analíticas propuestas, que se comparan con otras ya reconocidas para dicho análisis, en la búsqueda de respuestas simples como: ¿Están presentes las AgNPs en las muestras?

Para la ingeniería de nanopartículas, el análisis de las mismas es uno de los temas más desafiantes hoy en día. Tanto las nanopartículas de plata como las de oro están presentes en diferentes productos comerciales, formulaciones farmacéuticas, o se emplean en ensayos clínicos (StatNano Project, 2023). En este sentido, existe una urgente necesidad de

cuantificar su concentración. Por otro lado, la falta de normas internacionales que regulen su presencia en el mercado, e incluso la no obligatoriedad de declarar su presencia en los productos comerciales, abren la puerta a la introducción de fraudes en el mercado. Esto es especialmente cierto para las AgNPs, que se incluyen en una miríada de productos comerciales empleados en el hogar como agentes desinfectantes (StatNano Project, 2023) y en los que las nanopartículas de plata podrían sustituirse por proteínas de plata o sales de plata, con el mismo efecto. Por lo tanto, además de la cuantificación, la identificación es un tema de preocupación *per se*.

Hay diversos métodos para identificar la presencia de AgNPs. La microscopía TEM aporta evidencia directa de su presencia, al tiempo que permite determinar el diámetro de su núcleo metálico y la distribución de tamaños (Botasini, 2021). Los espectros electrónicos brindan características específicas en el rango visible de los espectros electromagnéticos (Botasini & Méndez, 2013) y pueden usarse con fines cuantitativos si se conoce el coeficiente de extinción molar. La oxidación electroquímica da lugar a curvas voltamperométricas centradas en los potenciales correspondientes a la primera oxidación de AgNPs a iones Ag^+ , con la sensibilidad adecuada para ser utilizada con fines cuantitativos (Hernández et al., 2019) La incidencia del agente protector de las NPs en los métodos analíticos es variable. En el caso del análisis por TEM, la fracción orgánica no es distinguible por esta técnica, por lo que no hay incidencia. En el caso de los espectros electrónicos, hay varias diferencias. Por lo general, hay un cambio mínimo en la posición del pico debido al agente de protección (generalmente de 2 a 5 nm), pero el coeficiente de extinción es diferente, ya que la dispersión de la luz aumenta con el tamaño, y esto podría ser particularmente relevante con grandes agentes de protección. Ejerciendo protección

estérica. Finalmente, algunos informes demuestran que la posición del pico voltamperométrico cambia según el agente de protección. La incidencia del agente de protección en las características espectrales y voltamperométricas de las AgNPs podría aprovecharse para obtener información relevante que permita discriminar a las AgNPs según el agente que las recubra.

4.2. Materiales y métodos

Todos los reactivos y solventes fueron grado analítico y usados sin mayor purificación que el dado originalmente por los proveedores. El agua ultrapura (resistividad > 18.2 Mohm.cm) fue obtenida de un sistema de purificación Milli-Q®, y empleada en la preparación de todas las soluciones. El material de vidrio fue cuidadosamente limpiado sumergiéndolo en una solución de HNO₃ al 10% (v/v), bajo campana ventilada y usando con elementos de protección personal. Posteriormente se hicieron enjuagues repetidos con agua ultrapura, secado en estufa y almacenado protegido de partículas de polvo ambiental.

4.2.1. Material Certificado

En primer lugar, cabe mencionar que el único material de referencia de AgNPs (RM 8017) introducido por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) en 2015 se encuentra actualmente discontinuado. Por otra parte, no existe material de referencia de productos de consumo que contengan AgNPs para realizar estudios de recuperación (Gmoshinski et al., 2013). Estas circunstancias ponen una primera barrera de dificultad

para el análisis de las AgNPs en productos comerciales, y las técnicas desarrolladas deben tener en cuenta esta limitante.

Algunas empresas de elaboración de nanomateriales para su uso en laboratorios de investigación cuentan con el prestigio suficientes como para considerar a sus productos certificados como estándares no trazables. Tal es el caso de la empresa nanoComposix® (San Diego, CA, EE.UU), cuyos productos son ampliamente utilizados por la comunidad científica. Las AgNPs adquiridas para este estudio a esta firma incluyen diferentes tamaños y agentes de recubrimiento, a saber: ácido cítrico, polivinilpirrolidona (PVP) y ácido lipoico (Figura 4.2). El tipo de estabilización provista por cada uno de estos agentes varían desde puramente electrostático (citrato) y puramente estérico (PVP) a mixto (ácido lipoico).

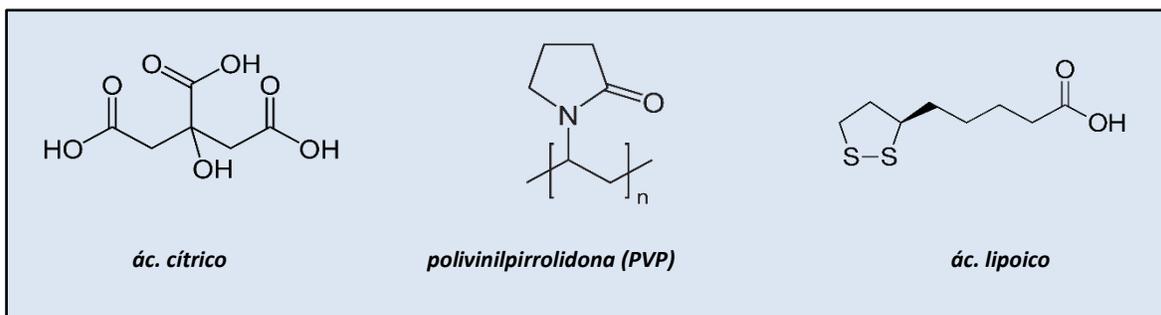


Figura 4.2. Estructuras químicas de las moléculas empleadas como agentes de recubrimiento de las AgNPs de nanoComposix®.

4.2.2. Selección de muestras

Los productos comerciales estudiados en la presente tesis y que afirman contener nanopartículas de plata se compraron aleatoriamente a través de la página *web* de Amazon

o fueron donados por diferentes distribuidores. Las muestras comerciales se analizaron directamente sin previo tratamiento. Para la presente discusión fueron seleccionados tres ejemplos que ilustran diferentes características y que, en su comparación, brindan un punto de vista interesante para ilustrar las ventajas y/o dificultades de las técnicas descentralizadas para la detección de AgNPs en muestras comerciales. Como se desprende de la Tabla 4.1, la información provista por el proveedor suele ser variada, así como los usos sugeridos de sus productos.

Tabla 4.1. Información provista por el proveedor de las muestras comerciales analizadas.

Código	Proveedor	Concentración declarada	Color^a	Uso indicado y componentes	Origen
M1	Mesosilver®	20 mg Ag/L	amarillo	<ul style="list-style-type: none"> ○ Spray antifúngico y antibacteriano ○ Sólo contiene agua como aditivo 	EE.UU
M2	Blue Ridge®	5 mg Ag/L	amarillo	<ul style="list-style-type: none"> ○ Suplemento dietario ○ Sólo contiene agua como aditivo 	EE.UU
M3	Kimia Chemie Sahand	no indica	amarillo	<ul style="list-style-type: none"> ○ Solución de limpieza ○ Contiene material biológico 	Irán

^a El color indicado corresponde a la percepción visual del observador.

Por otra parte, cabe destacar que los productos analizados provienen de dos de los países que tienen un mayor desarrollo en Nanotecnología y la elaboración de productos comerciales conteniendo “nano”.

4.2.3. Métodos analíticos

La correcta descripción de los sistemas nanotecnológicos requiere del uso de diferentes técnicas, que dan información complementaria sobre el mismo, y que fueron discutidos en detalle en el Capítulo 2. Los protocolos empleados en cada una de las técnicas se detallan a continuación; en términos generales siguen las especificaciones publicadas por el Laboratorio de Biomateriales (Botasini, 2021; Fagúndez et al., 2021).

Espectroscopía UV-visible (UV/VIS). Los espectros electrónicos se midieron de forma rutinaria el rango de longitudes de onda entre 350 y 900 nm, empleando cubetas desechables de poli(metacrilato de metilo) de 1 cm de paso óptico; para el rango espectral extendido por debajo de 350 nm, las cubetas fueron de cuarzo. Las medidas se efectuaron en un espectrofotómetro Analytika Spelec 200 de doble haz (Alemania), con una resolución espectral de 0.5 nm y una velocidad de barrido de longitud de onda de 10 nm/s.

Efecto Tyndall. La presencia de material dispersante en la solución coloidal fue evaluada mediante el efecto Tyndall, irradiando con luz la solución (*Precaución: evitar la exposición directa del haz laser a los ojos*)

Dispersión dinámica de luz (DLS). El diámetro hidrodinámico promedio de las soluciones coloidales que contienen AgNPs se realizó mediante dispersión dinámica de luz (DLS) a 25°C utilizando un equipo Brookhaven modelo ZetaPlus 90 (EE.UU), equipado con un láser de diodo rojo de 35 mW (nominal 660 nm), y un correlador para DLS en un ángulo fijo de 90°. Las mediciones DLS, fueron realizadas en cubetas de poliestireno de 1 cm de paso óptico. Los datos fueron analizados de acuerdo con el protocolo ISO 22412 (ISO, 2017), que exige un mínimo de 6 medidas concordantes. Para ello, se llevaron a cabo

10 medidas por cada muestra, y los datos fueron analizados con el test de Dixon para la detección de valores atípicos (*outliers*).

Microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se realizaron en un equipo JEOL modelo 1010 (Japón), con una aceleración de voltaje de 100 kV. Para las medidas se adicionaron 10 μL de las soluciones coloidales que contienen AgNPs sobre una grilla de cobre-carbono. Esta última se secó a temperatura ambiente. Las imágenes fueron analizadas con el programa de dominio público *ImageJ* (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) (Schindelin et al., 2012). Para cada micrografía, se hicieron las medidas de diámetro en forma automatizada (Botasini, 2021).

Análisis electroquímico. Se realizaron medidas de voltamperometría cíclica usando un potenciostato μStat 400 de la firma Metrohm-Dropsens®. Las medidas se hicieron con electrodos serigrafiados C110 (Metrohm-DropSens®, España) consistentes en un electrodo de trabajo y un contraelectrodo de carbono grafito y un electrodo de cuasi-referencia de plata (QRE). Todos los potenciales en el texto están referidos a este potencial. Sobre el electrodo de trabajo se depositaron 10 μL de las soluciones coloidales de AgNPs, y se dejó secar a temperatura ambiente durante la noche. Se hicieron 3 barridos cíclicos de potencial entre + 0.55 V y -0.55 V, a 50 mV/s. Previo a su uso los electrodos C110 son lavados con agua ultrapura.

Análisis de color. Los parámetros CIE $L^*a^*b^*$ se midieron con el software WinAspect PLUS v.4.2.0.0 a partir del espectro visible registrado en el rango 380 – 780 nm, para un observador con un campo de visión de 2°, y un iluminante D65. Los datos fueron

graficados como diagramas de cromaticidad o espacio CIELAB, empleando la aplicación “Chromaticity Diagram” v. 1.52 implementado en el paquete Origin® 2022.

4.3. Resultados y discusión

Como ya se mencionó, ante la falta de materiales de referencia certificados, solo se dispone de materiales de referencia certificados no rastreables para verificar los procedimientos experimentales. Por lo tanto, se analizaron los espectros electrónicos de los materiales adquiridos de la firma nanoComposix®, de manera de cumplir con varios objetivos que nos hemos planteado:

- verificar los modelos matemáticos que relacionan las propiedades medibles de las nanopartículas
- establecer cuál(es) propiedad(es) puede(n) ser usada(s) como propiedad(es) aditiva(s).

Una vez cumplidos estos objetivos, se analizaron las muestras comerciales con los procedimientos analíticos empleados con los estándares.

4.3.1. Material de referencia certificado (no trazable)

Los estándares de AgNPs-citrato permiten evaluar exclusivamente el efecto del tamaño. Todos los estándares considerados tienen una concentración nominal de 0.020 mg Ag/mL. Las características principales aportadas por la firma nanoComposix® se resumen en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Características de los estándares de AgNPs-citrato de nanoComposix® para soluciones de concentración nominal 0.020 mg/mL.

Tamaño nominal (nm)	Tamaño TEM (nm)	Tamaño DLS (nm)	[Ag] ^a (mg/mL)	[AgNP] ^a (partículas/mL)	factor de corrección f^b	λ_{LSRP} (nm)
5	4.5 ± 1.1	no reportado	0.019	3.8 × 10 ¹³	0.95	400
10	9.0 ± 1.7	15.1	0.021	5.1 × 10 ¹²	1.05	391
20	20.6 ± 3.6	26.2	0.022	4.5 × 10 ¹¹	1.10	393
30	32.7 ± 4.8	35.6	0.021	1.1 × 10 ¹¹	1.05	404
50	48.6 ± 5.3	54.0	0.021	3.3 × 10 ¹⁰	1.05	417
80	79.3 ± 79.3	79.3	0.022	8.0 × 10 ⁹	1.10	455

^a Concentraciones reales declaradas por nanoComposix®

^b Definido como $f = [\text{concentración}]_{\text{real}} / [\text{concentración}]_{\text{nominal}}$. Ver discusión en Sección 4.3.3

En general, el tamaño de las AgNPs en los productos comerciales está por debajo de los 50 nm. Por ese motivo, los estudios más detallados se hicieron con las AgNPs de hasta un tamaño nominal de 30 nm; sólo en aquellos casos en que fue necesario extender los análisis para AgNPs más grandes (*e.g.* comprobación de modelos), se usaron esos datos, que se encuentran tabulados como Anexos IV y V.

4.3.2. Relación entre las propiedades mensurables

Muchas de las propiedades mensurables se encuentran relacionadas entre sí como parte de teorías y leyes que describen fenómenos fisicoquímicos. Para esos casos, se han establecido estas relaciones como argumentos para validar o no las teorías relacionadas con las nanopartículas y sus propiedades fisicoquímicas. En particular, hemos destacado la relación entre las propiedades ópticas de las AgNPs con sus características físicas, y las propiedades electroquímicas y los modelos de oxidación.

Propiedades ópticas y características físicas. La localización de la banda de absorción del plasmón superficial (λ_{LSRP}) depende del tamaño de las AgNPs para los diferentes agentes de protección. En el caso de AgNPs-citrato, hay tablas completas que relacionan estos parámetros, que se pueden emplear para verificar los valores obtenidos experimentalmente (Tabla 4.3). En todos los casos, hemos tomado los valores de longitud de onda máxima para una concentración de Ag total correspondiente a una concentración nominal de 0.0025 mg/mL, que asegura ubicarnos en el rango lineal de respuesta.

Tabla 4.3. Localización de las bandas λ_{LSRP} obtenidas experimentalmente para las AgNPs-citrato de nanoComposix® y las reportadas en la bibliografía.

Fuente	λ_{LSRP} (nm)			
	5 nm ^a	10 nm ^a	20 nm ^a	30 nm ^a
experimental	401	391	395	405
certificado nanoComposix®	400	391	393	404
Ref ^b	fuera de rango	392	401	407

^a Los valores de tamaño indicados refiere a los valores nominales.

^b Modelo propuesto por (Paramelle et al., 2014)

Existe una razonable coincidencia (± 2 nm máximo) entre los valores medidos experimentalmente y los indicados en los certificados de la empresa nanoComposix®. Cuando los valores experimentales se comparan con los modelos publicados, las diferencias se hacen más notorias, en particular para las AgNP-citrato de tamaño nominal 20 nm, pero en términos generales pueden decirse que la coincidencia en los valores es razonable.

Propiedades electroquímicas. Los electrodos serigrafiados DropSens® contienen un electrodo de trabajo de carbono grafito sobre el que se depositaron las AgNPs y un electrodo de referencia de plata que funciona como electrodos de cuasi-referencia (QRE). Cabe la posibilidad que el electrodo de cuasi-referencia de plata esté contaminado con iones cloruro (un anión ubicuo) formando AgCl, lo que cambiaría su valor de potencial. Por ello se confirmó que esto no estaba sucediendo, sumergiendo el sistema electródico en una solución de NaNO_3 0.1 M, se dejó secar al aire, y se estudió la composición química de los electrodos serigrafiados por EDS en el ambiente del microscopio SEM (Figura 4.3). Estos espectros revelan que los QRE están, de hecho, constituidos únicamente por plata, y no aparecen evidencias de la presencia del elemento cloro.

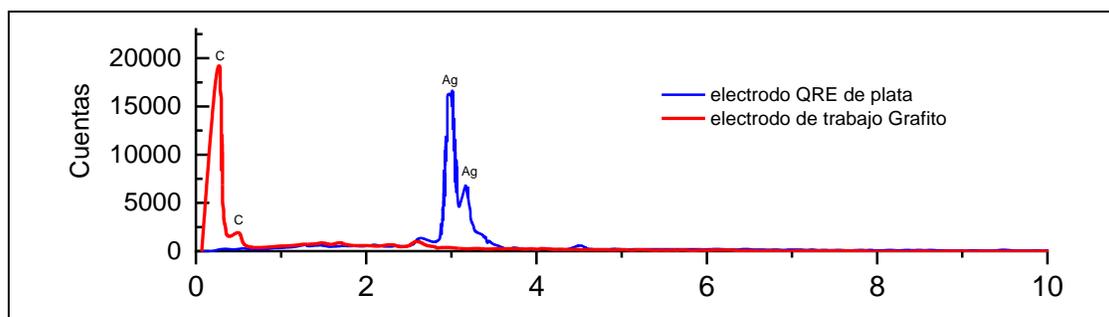


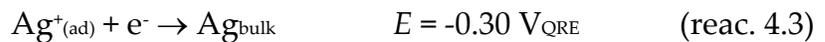
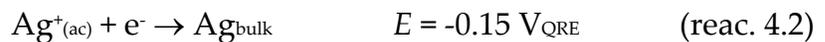
Figura 4.3. Espectro EPS obtenido en la cámara del microscopio SEM para el electrodo de referencia de plata y el electrodo de trabajo correspondiente a los electrodos C110 de la firma DropSens®. Los electrodos fueron previamente sumergidos en la solución de electrolito soporte (NaNO_3 0.1 M) empleado en los experimentos.

Por lo tanto, el comportamiento voltamperométrico medido sobre este sistema electródico mostrará las reacciones faradaicas relacionadas con las AgNPs en torno al potencial 0 V_{QRE}, siendo las diferencias atribuibles a efectos nano o efectos superficiales. Por otra parte, hay que tener en cuenta que, sobre el electrodo, pudo haber quedado sales de iones Ag⁺ que cristalicen durante la evaporación de la gota, y que se reduzca en el entorno de 0 V_{QRE}.

Para comprender mejor el sistema electroquímico en estudio (AgNPs adsorbidas sobre el electrodo de trabajo), se llevaron a cabo barridos de potencial comenzando en 0 V_{QRE} en el sentido positivo y en el sentido negativo. En el barrido en el sentido positivo de potenciales (Figura 4 A) se observa un pico anódico centrado en 0.19 V_{QRE} atribuible a la oxidación de las AgNPs depositadas.



La corriente faradaica que se observa a $E > 0.3 \text{ V}_{\text{QRE}}$ puede atribuirse a la oxidación de los componentes orgánicos (agente protector) del sistema en estudio. El segundo barrido de potencial no muestra corrientes faradaicas en el segundo ciclo, lo que indica que los iones Ag⁺ formados no son reducidos en el rango de potencial analizado. Cuando se inicia el barrido en el sentido de potenciales negativos (Figura 4 B), se observa un pico de reducción a -0.30 V_{QRE} y un hombro a -0.15 V_{QRE} que se atribuyen a la reducción de los iones Ag⁺ cristalizados como sales durante la evaporación de la gota (Ag^{+(ad)}) y en solución (Ag^{+(ac)}):



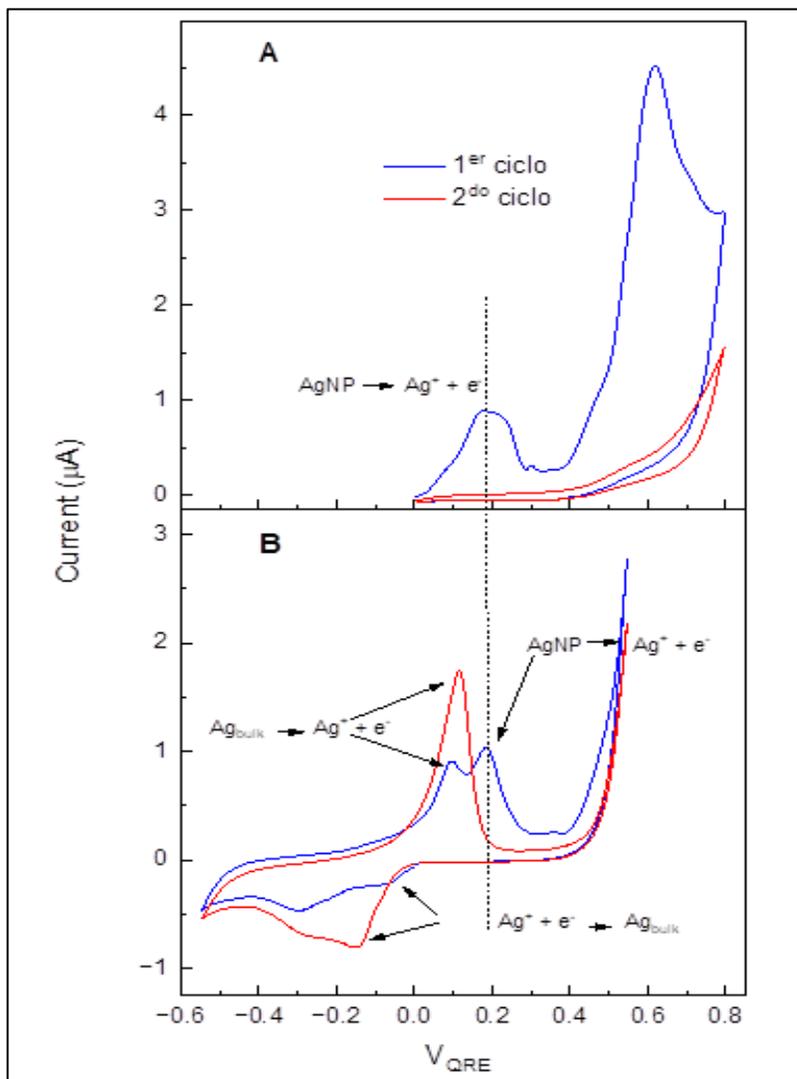
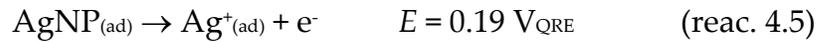
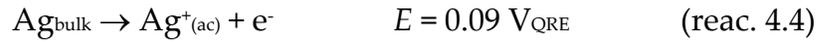


Figura 4.4. Voltamperometría cíclica de AgNPs-citrato depositadas sobre un electrodo serigrafiado de C grafito (C110) de la firma DropSens®. (A) Ciclos de oxidación para potenciales. (B) Ciclos de reducción y oxidación para barridos comenzando en sentido negativo de potencial. Electrolito soporte: NaNO_3 0.1 M, velocidad de barrido: 50 mV/s.

El siguiente barrido anódico luego de este proceso muestra dos picos anódicos: uno centrado en $0.09 V_{\text{QRE}}$ y otro centrado en $0.19 V_{\text{QRE}}$, este último en coincidencia con el pico

observado en el barrido exclusivamente en potenciales positivos. Por lo tanto, estas corrientes faradaicas son atribuidas a las siguientes reacciones:



el desbalance de cargas involucrado para la formación de Ag_{bulk} a partir de $\text{Ag}^{+}_{(\text{ac})}$ ha sido observado recientemente (Aoki et al., 2019). Nótese que la naturaleza física de estos depósitos es diferente, ya que el último mencionado implica una nanoestructura, por lo que se espera que sus potenciales de oxidación difieran ligeramente. Al final de este barrido, el sistema electroquímico está formado por iones Ag^{+} provenientes de la Ag depositada en el barrido anterior, y de las AgNPs depositadas originalmente.

El siguiente barrido en sentido negativo se vuelven a repetir los picos de reducción a $-0.30 \text{ V}_{\text{QRE}}$ y $-0.15 \text{ V}_{\text{QRE}}$, pero con una notoria mayor preponderancia de la reducción a partir de $\text{Ag}^{+}_{(\text{ac})}$ (reac. 4.2), para formar Ag_{bulk} . La comprobación de que estas interpretaciones son correctas viene en el último barrido anódico, en el que se espera que la única reacción electroquímica relacionada con la plata sea la oxidación de la Ag_{bulk} a Ag^{+} en solución. Efectivamente, se observa un único pico de oxidación centrado en $0.09 \text{ V}_{\text{QRE}}$.

Los valores experimentales obtenidos para los potenciales de pico de oxidación de las AgNPs ($E_{\text{p,AgNP}}$) certificadas muestran que los mismos dependen tanto del tamaño como de la concentración de las AgNPs (Tabla 4.4). Las tendencias generales son: disminución

del $E_{p,AgNP}$ con la $[Ag]$ para tamaños por encima de 10 nm, y disminución del $E_{p,AgNP}$ con el tamaño para una concentración dada.

Tabla 4.4. Potencial de oxidación para los estándares de AgNPs-citrato de nanoComposix®.

Potencial de oxidación (V)						
Dilución*	5nm	10nm	20nm	30nm	50 nm	80 nm
0	0.200 ± 0.003	0.200 ± 0.003	0.169 ± 0.002	0.15 ± 0.04	0.17 ± 0.01	0.154 ± 0.005
1	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.147 ± 0.007	0.13 ± 0.02	0.149 ± 0.006
2	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.138 ± 0.004	0.128 ± 0.003	0.11 ± 0.01	0.110 ± 0.009
3	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.117 ± 0.006	0.112 ± 0.007	0.100 ± 0.02	0.10 ± 0.01

Modelos de oxidación. Los modelos de oxidación de las nanopartículas se deben principalmente a los aportes realizados por los grupos de Brainina (Universidad Estatal de los Urales, Rusia), Compton (Universidad de Oxford, Inglaterra) y Zamborini (Universidad de Louisville, EE.UU.), todos basados en el trabajo seminal de Plieth (Plieth, 1982).

Plieth llevó a cabo el primer estudio de la relación entre el tamaño de las nanopartículas metálicas y el pico de oxidación, con base en la estabilidad de las mismas explicada a través de la energía de Gibbs superficial. Considerando la reacción



estableció que el potencial de pico de oxidación para las AgNPs, $E_{p,AgNP}$ es:

$$E_{p,AgNP} = E_{p,Agbulk} - \frac{4\gamma V_m}{zF} \frac{1}{d} \quad (\text{ec. 4.1})$$

donde d es el diámetro de la AgNP en nm, y los valores para los distintos parámetros sugeridos por Plieth (en unidades SI) son: energía superficial $\gamma = 1.59 \text{ J/m}^2$, volumen molar $V_m = 10.28 \times 10^{-6} \text{ m}^3/\text{mol}$, número de electrones intercambiados $z = 1$, y constante de Faraday $F = 96485 \text{ C/mol}$. Con estos valores la ecuación de Plieth se resume a:

$$E_{p,AgNP} = E_{p,Agbulk} - 0.678 \frac{1}{d} \quad (\text{ec. 4.2})$$

que predice que $E_{p,AgNP}$ aumenta con el tamaño, y que $E_{p,AgNP} < E_{p,Agbulk}$. El valor para el factor γ es el más discutible, y para *nanoclusters* de plata puede variar entre 0.86 J/m^2 (Molleman & Hiemstra, 2018) y el sugerido por Plieth. El efecto “nano” es prácticamente despreciable para diámetros mayores de 80 nm (ver Anexo V), pero dependiendo del valor de γ considerado, la predicción del valor de $E_{p,AgNP}$ por debajo de 10 nm puede variar hasta en 50 mV . El efecto del tamaño de las AgNPs sobre el valor de E_p fue experimentalmente demostrado por los grupos de Compton (Ward Jones et al., 2008), Brainina (Brainina, Galperin, Kiryuhina, et al., 2012) y Zamborini (Ivanova & Zamborini, 2010) y posteriormente por otros autores (Giovanni & Pumera, 2012).

Nuestros resultados no siguen el modelo general de oxidación (Figura 4.5 A), y la razón para esto puede estar en que, además del tamaño, algunos aspectos experimentales también pueden determinar el comportamiento electroquímico. Por ejemplo, la interacción

de las AgNPs con la superficie electródica puede dar lugar a un efecto opuesto al predicho por la teoría (Brainina, Galperin, & Vikulova, 2012)

Para los diferentes tamaños, se espera que el potencial de pico varíe con el logaritmo neperiano de la concentración de acuerdo con la ley de Nernst (Duan et al., 2021) para la reacción $\text{AgNP} \rightarrow \text{Ag}^+ + \text{e}^-$:

$$E_{p,\text{AgNP}} = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln [\text{Ag}^+] \quad (\text{ec. 4.3})$$

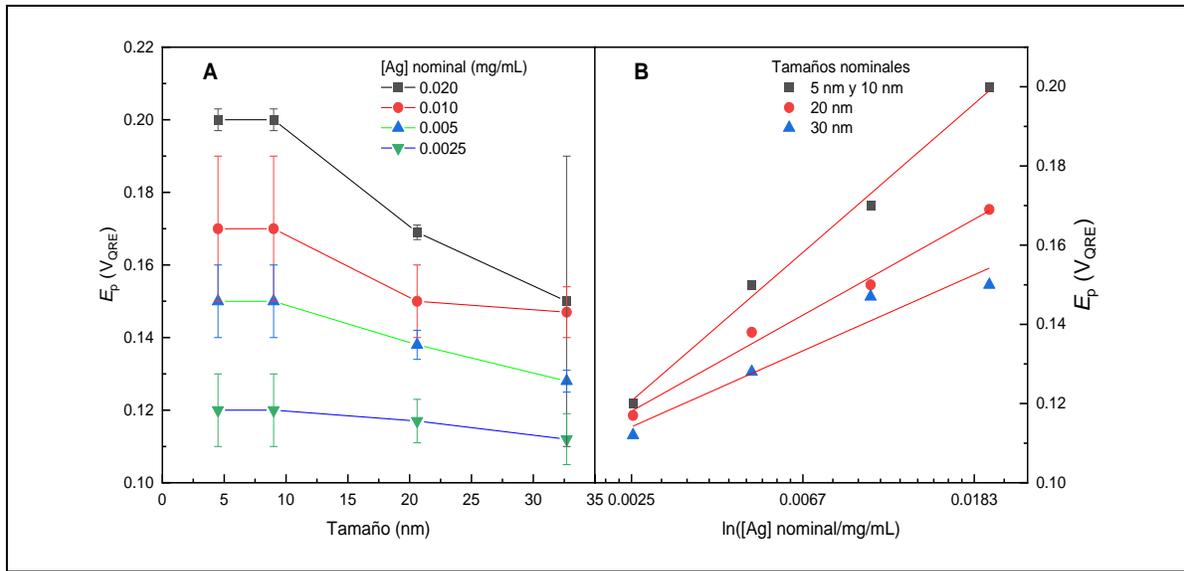


Figura 4.5. (A) Variación del potencial de pico de oxidación de las AgNPs ($E_{p,\text{AgNP}}$) con el tamaño de las nanopartículas, para diferentes concentraciones nominales expresadas como [Ag] en mg/mL. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes. (B) Variación del potencial de pico de oxidación de las AgNPs ($E_{p,\text{AgNP}}$) con el logaritmo natural de la concentración de las nanopartículas expresadas como [Ag] en mg/mL, para los diferentes tamaños analizados.

Con una pendiente teórica a 25 °C de 0.0256 V. Los resultados experimentales ajustan a una recta para cada tamaño, con pendientes 0.038 ± 0.002 V para AgNPs de 5 y 10 nm, 0.024 ± 0.002 V para AgNPs de 20 nm y 0.019 ± 0.004 V para AgNPs de 30 nm (tamaños nominales); para estos dos últimos valores, no existe una diferencia significativa con el valor teórico ($P < 0.05$). En suma, los resultados experimentales parecen estar más influenciados por la cantidad de plata depositada que por las propiedades físicas de las AgNPs predichas por la teoría de Plieth y por las interacciones con la superficie, de acuerdo con la teoría de Braininia.

Establecida esta relación entre el potencial de pico de oxidación y la cantidad de plata depositada, es previsible que se cumpla la relación predicha por Compton con base en la ley de Faraday:

$$E_p = C + \frac{RT}{nF} \ln(Q_{ox}) \quad (\text{ec. 4.4})$$

donde C es una constante para una dada velocidad de barrido y Q_{ox} es la carga asociada a la oxidación de las AgNPs, cuyos valores experimentales serán analizados en detalle en la Sección 4.3.4 (Figura 4.6).

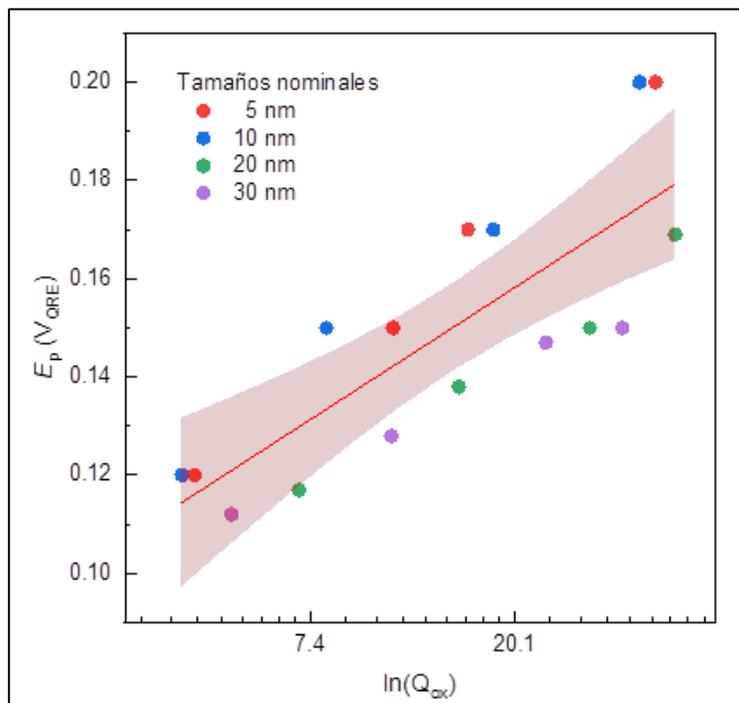


Figura 4.6. Verificación del modelo propuesto por Brainina (Brainina, Galperin, Kiryuhina, et al., 2012) y del grupo de Compton (Ward Jones et al., 2008) para el límite reversible de la oxidación de las AgNPs. La banda corresponde al intervalo de confianza para el 95 %.

El valor teórico de la pendiente es 0.026 V, y el valor obtenido experimentalmente para todos los tamaños analizados fue 0.027 ± 0.005 V. Cabe notar la gran dispersión observada para los puntos experimentales. Esto se debe a que los depósitos de AgNPs no siempre producen una monocapa, y pueden formarse acúmulos sobre la superficie del electrodo. Estos acúmulos producen picos de oxidación deformados que, si bien se espera no afecten los valores de Q_{ox} , sí afectan los valores de E_p (Chen et al., 2019; Cloake et al., 2015).

Un aspecto interesante de este análisis es que se puede plantear un método que discrimine entre iones Ag^+ y AgNPs en un determinado producto comercial: la aplicación racional de barridos de potencial constituye la base del mismo.

4.3.3. Expresión de la concentración en soluciones coloidales de AgNPs

Las soluciones de nanoComposix® tienen una concentración nominal de 0.020 mg/mL. Los certificados de los distintos lotes tienen concentraciones que pueden diferir ligeramente de la concentración nominal (± 0.002 mg/mL), como se indica en la Tabla 4.2. En esta tesis manejaremos como concentración nominal la que refiere a 0.020 mg/mL, y para los cálculos exactos emplearemos un factor de corrección f , para dar cuenta de la concentración real:

$$[\text{Concentración}]_{\text{real}} = f \times [\text{Concentración}]_{\text{nominal}} = 0.020 \times f \quad (\text{ec. 4.5})$$

Los valores de f calculados se resumen en la Tabla 4.2, y las concentraciones reales empleadas se detallan en las Tablas correspondientes (Tablas 4.5 y 4.6). Sea C_0 la concentración real de la solución madre de los estándares comerciales de AgNPs de nanoComposix®. A partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas al medio (v/v), de manera que la concentración C_i para la dilución i se calcula como:

$$C_i = C_0 \left(\frac{1}{2}\right)^i \quad (\text{ec. 4.6})$$

Las concentraciones expresadas en mg/mL de Ag, y corregidas por el factor f , se resumen en la 4.5 para cada uno de los tamaños de AgNPs empleados. En la misma tabla, se incluye también la expresión en base mol/L, que se calculó como:

$$[\text{Ag}] \left(\frac{\text{mol}}{\text{L}}\right) = [\text{Ag}] \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) \frac{1}{(\text{PA})_{\text{Ag}}} \quad (\text{ec. 4.7})$$

donde $(PA)_{Ag} = 107.8682$ g/mol es el peso atómico de la Ag.

Tabla 4.5. Concentraciones reales en mg/mL y mol/L para las diluciones de las soluciones de AgNPs de nanoComposix®: base [Ag].

Dilución/ Tamaño*	[Ag] mg/mL			
	5 nm*	10 nm	20 nm	30 nm
0	1.90×10^{-2}	2.10×10^{-2}	2.20×10^{-2}	2.10×10^{-2}
1	9.50×10^{-3}	1.05×10^{-2}	1.10×10^{-2}	1.05×10^{-2}
2	4.75×10^{-3}	5.25×10^{-3}	5.50×10^{-3}	5.25×10^{-3}
3	2.38×10^{-3}	2.63×10^{-3}	2.75×10^{-3}	2.63×10^{-3}
4	1.19×10^{-3}	1.31×10^{-3}	1.38×10^{-3}	1.31×10^{-3}
5	5.94×10^{-4}	6.56×10^{-4}	6.88×10^{-4}	6.56×10^{-4}
	[Ag] mol/L			
0	1.76×10^{-4}	1.95×10^{-4}	2.04×10^{-4}	1.95×10^{-4}
1	8.81×10^{-5}	9.73×10^{-5}	1.02×10^{-5}	9.73×10^{-5}
2	4.40×10^{-5}	4.87×10^{-5}	5.10×10^{-5}	4.87×10^{-5}
3	2.20×10^{-5}	2.43×10^{-5}	2.55×10^{-5}	2.43×10^{-5}
4	1.10×10^{-5}	1.22×10^{-5}	1.27×10^{-5}	1.22×10^{-5}
5	5.50×10^{-6}	6.08×10^{-6}	6.37×10^{-6}	6.08×10^{-6}

* El tamaño indicado refiere al tamaño nominal

Para obtener los valores equivalentes de concentración, pero para nanopartículas, es necesario considerar el tamaño de las mismas (D). El número total de átomos de Ag en cada AgNP es:

$$N_T = \frac{\pi D^3 \rho N}{6(PA)_{Ag}} \quad (\text{ec. 4.8})$$

donde D está en cm, $\rho = 10.49 \text{ g/cm}^3$ es la densidad de la Ag y $N = 6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ es el número de Avogadro.

Para una solución de nanopartículas de concentración $[Ag]$, la concentración molar para las nanopartículas, $[AgNPs]$ se calcula como:

$$[AgNPs] = \frac{[Ag]}{N_T} \quad (\text{ec. 4.9})$$

donde todas las concentraciones indicadas tienen las mismas unidades.

Finalmente, la $[AgNPs]$ expresada como número de nanopartículas/mL se calcula como:

$$[AgNP] \left(\frac{\text{part}}{\text{mL}}\right) = [AgNPs] \left(\frac{\text{mol}}{\text{L}}\right) \frac{N}{1000} \quad (\text{ec. 4.10})$$

donde 1000 (mL/L) es un factor de corrección de unidades de volumen. Las concentraciones en base AgNPs así calculadas se resumen en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6. Concentraciones reales en mol/L y partículas/mL para las diluciones de las soluciones de AgNPs de nanoComposix®: base AgNPs.

Dilución/ Tamaño*	[AgNPs] mol/L			
	5 nm*	10 nm	20 nm	30 nm
0	6.30×10^{-8}	8.71×10^{-9}	7.61×10^{-10}	1.82×10^{-10}
1	3.15×10^{-8}	4.35×10^{-9}	3.80×10^{-10}	9.08×10^{-11}
2	1.58×10^{-8}	2.18×10^{-9}	1.90×10^{-10}	4.54×10^{-11}
3	7.88×10^{-9}	1.09×10^{-9}	9.51×10^{-11}	2.27×10^{-11}
4	3.94×10^{-9}	5.44×10^{-10}	4.76×10^{-11}	1.13×10^{-11}
5	1.97×10^{-9}	2.72×10^{-10}	2.38×10^{-11}	5.67×10^{-12}
	[AgNPs] partículas/mL			
0	3.80×10^{13}	5.24×10^{12}	4.58×10^{11}	1.09×10^{11}
1	1.90×10^{13}	2.62×10^{12}	2.29×10^{11}	5.47×10^{10}
2	9.49×10^{12}	1.31×10^{12}	1.15×10^{11}	2.73×10^{10}
3	4.75×10^{12}	6.56×10^{11}	5.73×10^{10}	1.37×10^{10}
4	2.37×10^{12}	3.28×10^{11}	2.86×10^{10}	6.83×10^9
5	1.19×10^{12}	1.64×10^{11}	1.43×10^{10}	3.42×10^9

* El tamaño indicado refiere al tamaño nominal

4.3.4. Aditividad de las propiedades mensurables en AgNPs-citrato

La *aditividad* de una propiedad física o química establece una relación directa entre el valor de dicha propiedad y la concentración de la sustancia de interés. En general se observa una desviación de las propiedades a altas concentraciones, debido a motivos específicos

asociados con la propiedad misma, por lo que también resulta de interés la determinación del *rango lineal*, que es el rango de concentraciones para los que se verifica la linealidad de la propiedad.

Idealmente, no debe existir una ordenada en el origen para la curva lineal, por lo que es necesario determinar, por métodos estadísticos, si este valor es significativamente diferente de cero. Para ello se emplearon los paquetes estadísticos incluidos en el *software Origin*® 2022.

Las propiedades que fueron medidas sobre las soluciones coloidales de AgNPs incluyen ópticas (Absorbancia y Color) y eléctricas (Intensidad y Carga de oxidación, Potencial redox).

Absorbancia como propiedad aditiva. Los gráficos de Absorbancia como propiedad aditiva, en función de las diferentes formas de expresar la concentración de las nanopartículas, muestra algunas singularidades interesantes (Figura 4.7). Cabe señalar que, en todos los casos, el dato correspondiente a la concentración nominal más alta (0.02 mg/mL) fue omitido por desviarse de la linealidad.

Los valores para las pendientes y las ordenadas en el origen (Tabla 4.7) permiten valorar que: i) en todos los casos, las ordenadas en el origen son nulas ($P < 0.05$) salvo para las AgNPs de tamaño nominal 5 nm, aunque debe comentarse que el apartamiento del valor 0 no es importante; ii) el valor de las pendientes depende fuertemente del tamaño de las AgNPs cuando las concentraciones se expresan en base a [AgNPs], por el contrario, cuando se expresan en base a [Ag] la incidencia del tamaño se atenúa en forma importante.

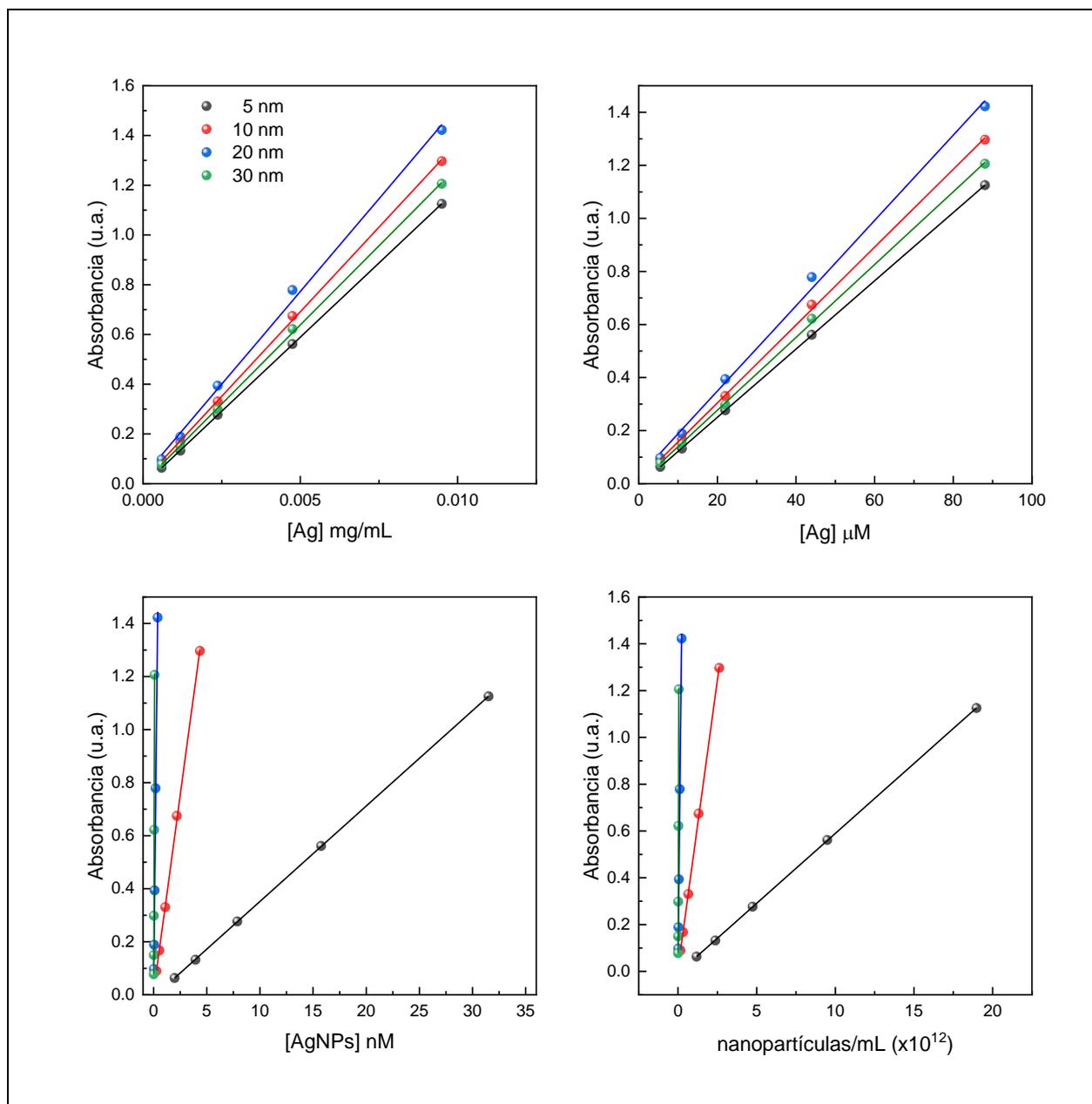


Figura 4.7. Aditividad de la propiedad “Absorbancia” en función de la forma de expresión de la concentración de los estándares de AgNPs-citrato de nanoComposix®. Los tamaños de AgNPs indicados corresponden a los valores nominales.

Tabla 4.7. “Absorbancia” como propiedad aditiva

Propiedades	Tamaño nominal (nm)			
	5	10	20	30
	[Ag] mg/mL			
Rango lineal (mg/mL)	0.0006 – 0.01			
Pendiente (mL mg ⁻¹ cm ⁻¹)	119.3 ± 0.2	136 ± 1	149 ± 4	127 ± 1
Ordenada en el origen	-0.008 ± 0.001*	0.01 ± 0.008**	0.03 ± 0.02**	-0.002 ± 0.007**
	[Ag] M			
Rango lineal (µM)	11.6 – 92.7			
Pendiente (M ⁻¹ cm ⁻¹)	12873 ± 26	14682 ± 169	16089 ± 474	13732 ± 151
Ordenada en el origen	-0.008 ± 0.001*	0.011 ± 0.008**	0.03 ± 0.02**	0.002 ± 0.007**
	[AgNPs] M			
Rango lineal (pM)	2074 – 33178	259 – 4147	21.6 – 346	5.4 – 86.5
Pendiente (M ⁻¹ cm ⁻¹)	3.60 ± 0.07	3.0 ± 0.3	3.7 ± 0.1	1.33 ± 0.01
	x10 ⁷	x10 ⁸	x10 ⁹	x10 ¹⁰
Ordenada en el origen	-0.008 ± 0.001*	0.011 ± 0.008**	0.03 ± 0.02**	0.002 ± 0.007**
	[AgNPs] partículas/mL			
Rango lineal (10 ¹² xpart./mL)	1.2 – 20	0.2 – 2.5	0.01 – 0.21	0.003 – 0.05
Pendiente (mL part. ⁻¹ cm ⁻¹)	5.97 ± 0.01	4.93 ± 0.06	6.2 ± 0.2	2.21 ± 0.02
	x10 ⁻¹⁴	x10 ⁻¹³	x10 ⁻¹²	x10 ⁻¹¹
Ordenada en el origen	-0.007 ± 0.001*	0.011 ± 0.008**	0.03 ± 0.02**	0.002 ± 0.007**

* ordenada en el origen no nula ($P < 0.05$)

** ordenada en el origen nula ($P < 0.05$)

El cumplimiento en general de la linealidad entre la Absorbancia y la concentración con ordenada en el origen nula verifica la Ley de Beer-Lambert en el rango de concentraciones considerado:

$$A = \epsilon b[X] \quad (\text{ec. 4.11})$$

donde b es el paso óptico (1 cm), y $[X]$ incluye las diferentes formas de expresión de la concentración que fueron estudiadas. En función de esto, quedarán definidas diferentes extinciones, ϵ (Tabla 4.8).

Tabla 4.8. Definiciones para las extinciones de acuerdo con la Ley de Beer-Lambert.

Expresión de la concentración	Extinción (unidades)	Denominación
[Ag] mg/mL	ϵ_{Ag} (mL mg ⁻¹ cm ⁻¹)	extinción másica
[Ag] M	ϵ_{Ag} (M ⁻¹ cm ⁻¹)	extinción molar atómica
[AgNPs] M	ϵ_{AgNP} (M ⁻¹ cm ⁻¹)	extinción molar nanopartículas
[AgNPs] part./mL	ϵ_{NP} (mL part. ⁻¹ cm ⁻¹)	extinción nanopartículas

Resulta claro que el uso de [Ag] como expresión de la concentración de las nanopartículas tiene un efecto homogeneizador, ya que, al resultar independiente del tamaño de las nanopartículas, permitiría su cuantificación frente a material coloidal de tamaño desconocido, lo que apunta a la idea de una metodología descentralizable. Por ese motivo, resulta interesante obtener un único valor para los valores de extinción molar atómica y de nanopartículas. Para eso, se analizaron los datos conjuntos (Figura 4.8) y se obtuvo una pendiente única representativa de todos los tamaños. El valor de la ordenada en el origen no difiere significativamente de cero ($P < 0.05$) por lo que los datos se ajustan al modelo de

Beer-Lambert, y la pendiente representa al coeficiente de extinción molar atómico: $\epsilon_{Ag} = 13200 \pm 300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Tabla 4.9). Este valor se compara razonablemente bien con $\epsilon_{Ag} = 15300 \pm 300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ obtenido por el grupo de Compton para AgNPs-citrato entre 9 y 47 nm (Ngamchuea et al., 2017).

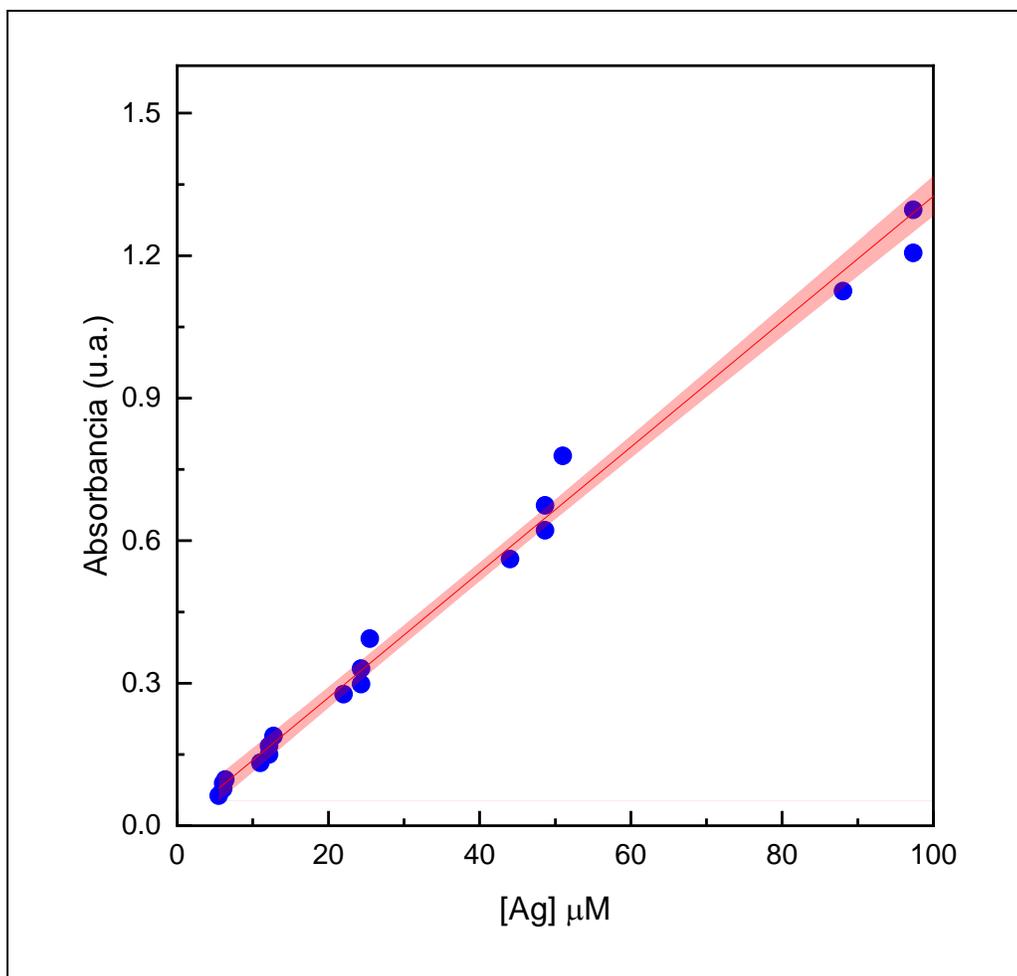


Figura 4.8. Curva de calibración para la propiedad aditiva “Absorbancia” en función de la [Ag]. El área en rojo corresponde a la banda de confianza del ajuste lineal (95 %).

Tabla 4.9. Propiedades de la recta de calibración de la Figura 4.8.

Parámetro	valor	error (sd)	IC (95 %)	
			inferior	superior
ordenada en el origen*	0.01	0.01	-0.02	0.04
pendiente	13190	283	12596	13784

* la ordenada en el origen no difiere significativamente de 0 ($P < 0.05$).

El valor para el coeficiente de extinción másico se calcula como:

$$\varepsilon_{\text{Ag}} (\text{mL mg}^{-1} \text{cm}^{-1}) = \frac{\varepsilon_{\text{Ag}} (\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})}{(\text{PA})_{\text{Ag}}} \quad (\text{ec. 4.12})$$

arrojando el valor $\varepsilon_{\text{Ag}} = 122 \pm 3 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Para expresar los resultados en ppm (mg/L), se divide este valor por 1000 mL L⁻¹.

Puede analizarse también las curvas de calibración cuando se expresa la [AgNPs] en mol/L, recordando que en este caso las mismas dependen fuertemente del tamaño de las AgNPs. El cumplimiento de la ley de Beer-Lambert permite calcular los coeficientes de extinción molar para las nanopartículas, cuyos valores se resumen en la Tabla 4.10, junto con el reportado en la bibliografía o estimado con ecuaciones paramétricas publicadas.

Los resultados experimentales son del mismo orden de los reportados en la literatura para las AgNPs-citrato (Navarro & Werts, 2013; Paramelle et al., 2014). Por lo tanto, en este trabajo se usaron los resultados experimentales para todos los cálculos que involucraron los coeficientes de extinción molar para las AgNPs-citrato.

Tabla 4.10. Coeficientes de extinción molar ($M^{-1} cm^{-1}$) experimentales obtenidos con las soluciones de AgNPs-citrato de nanoComposix®, y su comparación con otras estimaciones.

Tamaño nominal (nm)	Tamaño real (nm)	ϵ_{AgNP} experimental	ϵ_{AgNP}^a	ϵ_{AgNP}^b
5	4.5	3.417×10^7	4.31×10^7	fuera de rango
10	9.0	3.12×10^8	4.81×10^8	3.7×10^8
20	20.6	4.1×10^9	8.59×10^9	4.57×10^9
30	32.7	1.40×10^{10}	4.29×10^{10}	1.93×10^{10}

^a Calculados con la ecuación $\epsilon_{AgNP} = 2.3 \times 10^5 D^{3.48}$, donde D es el tamaño TEM de las AgNPs en nm (Navarro & Werts, 2013)

^b Calculados por interpolación a partir de los datos reportados en (Paramelle et al., 2014)

Carga e intensidad de pico de oxidación como propiedades aditivas. La medida de las propiedades electroquímicas se llevó a cabo sobre electrodos serigrafados de carbono grafito, y el sistema coloidal fue depositado sobre el electrodo de trabajo por el método *drop casting* (figura 4.9).

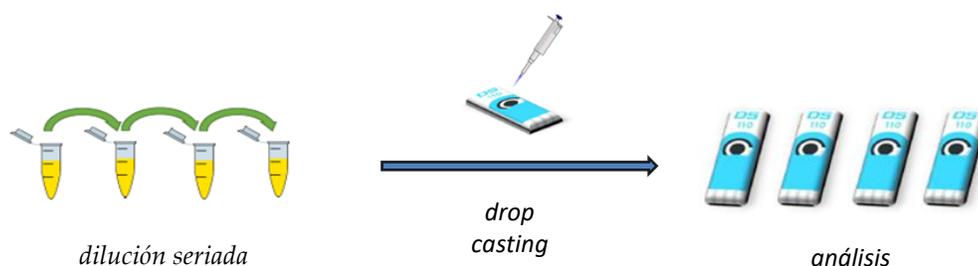


Figura 4.9. Esquema del procedimiento para las medidas electroquímicas de los sistemas coloidales de AgNPs

Este procedimiento no es muy bueno en cuanto a reproducibilidad, por lo que el procedimiento fue replicado 3 veces para cada muestra sobre electrodos independientes. En la Tabla 4.11 se resumen los resultados, donde se aprecia que el coeficiente de variación para las medidas varió entre 1 y 50 %.

Tabla 4.11. Propiedades electroquímicas mensurables para los estándares de AgNPs-citrato de nanoComposix®.

Intensidad de pico de oxidación (μA)				
Dilución*	5 nm	10 nm	20 nm	30 nm
0	18 ± 9	21 ± 3	28 ± 3	20 ± 10
1	7 ± 4	10 ± 2	19 ± 2	14.3 ± 0.8
2	5.0 ± 0.5	5 ± 1	10.5 ± 0.5	6.7 ± 0.8
3	1.8 ± 0.4	2.80 ± 0.09	4.6 ± 0.5	3.06 ± 0.08

Carga de oxidación (μC)				
Dilución*	5 nm	10 nm	20 nm	30 nm
0	40 ± 20	37 ± 5	44 ± 1	34 ± 19
1	16 ± 6	18.1 ± 0.8	29 ± 4	23.4 ± 0.8
2	11.1 ± 0.3	8 ± 2	15.3 ± 0.2	11 ± 1
3	4.2 ± 0.7	3.95 ± 0.05	7.0 ± 0.7	5.03 ± 0.07

* Para los valores de concentración en diferentes unidades correspondientes a cada dilución, consultar Tabla 4.5 y Tabla 4.6..

Para todos los tamaños se observa que el potencial máximo para la oxidación se hace menos positivo a medida que disminuye la concentración. Esto está de acuerdo con un aumento en la facilidad para la oxidación, y en la menor tendencia a la formación de multicapas, que dificultan el proceso oxidativo. Este aspecto se observa claramente en los perfiles de oxidación (Figura 4.10), donde se puede ver cómo, a medida que aumenta el tamaño de la AgNPs-citrato, todos los procesos de oxidación comienzan al mismo potencial, pero desarrollan su máximo valor de intensidad a un potencial de oxidación mayor, y culminan el proceso de oxidación a un potencial más alto.

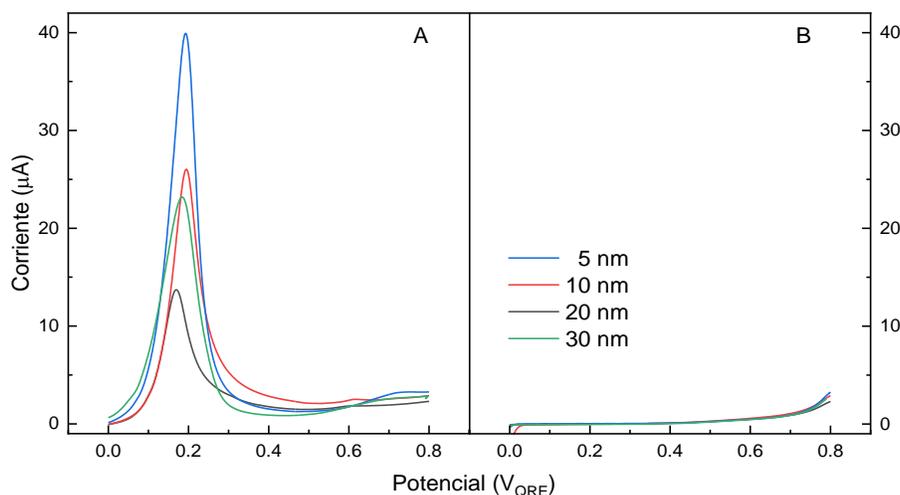


Figura 4.10. Voltamperometría cíclica (A) primer barrido positivo, (B) segundo barrido positivo, para las AgNPs depositadas por el método drop cast sobre electrodos serigrafados de Carbono. Los barridos negativos (no mostrados) se llevaron a cabo hasta un potencial de 0 V_{QRE}.

En cuanto a las propiedades aditivas, al igual que con el caso de la “Absorbancia”, se ve cómo las propiedades “intensidad de corriente de pico” y “Carga de oxidación” muestran

una relación lineal con la concentración, sólo en el caso que la misma se exprese en base a átomos de Ag totales, y no a AgNPs (Figura 4.11). Vale la pena notar la mayor dispersión en los datos de corriente comparado con los datos de carga, lo cual está de acuerdo en cómo la formación de multicapas por el procedimiento de *drop cast* afecta en mayor medida a la corriente de pico que a la carga de oxidación.

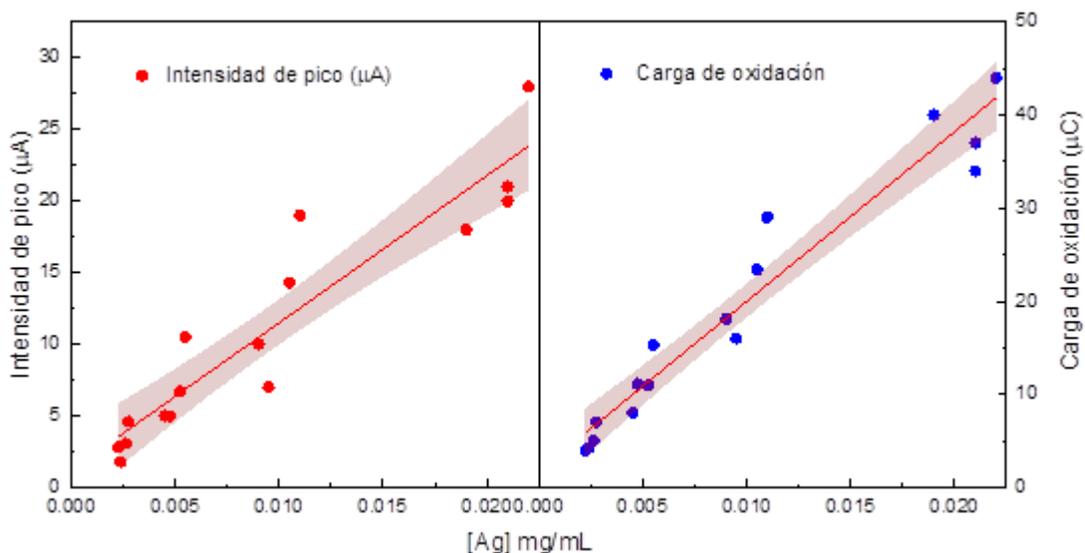


Figura 4.11. Curvas de calibración para la propiedad aditiva “Intensidad de corriente” y “Carga de oxidación” en función de la [Ag]. El área en rojo corresponde a la banda de confianza del ajuste lineal (95 %).

Para ambas propiedades la ordenada en el origen fue nula ($P < 0.05$), y las ecuaciones que representan a la intensidad de corriente de pico ($I_{\text{máx}}$) y la carga de oxidación (Q_{ox}) con la [Ag] son:

$$I_{\text{máx}} (\mu\text{A}) = (1029 \pm 104) [\text{Ag}] \quad \text{en mg/mL} \quad (\text{ec. 4.13})$$

$$Q_{\text{ox}} (\mu\text{C}) = (1823 \pm 119) [\text{Ag}] \quad \text{en mg/mL} \quad (\text{ec. 4.14})$$

$$I_{\text{máx}} (\mu\text{A}) = (9.54 \pm 0.96) [\text{Ag}] \quad \text{en mol/L} \quad (\text{ec. 4.15})$$

$$Q_{\text{ox}} (\mu\text{C}) = (16.9 \pm 1.1) [\text{Ag}] \quad \text{en mol/L} \quad (\text{ec. 4.16})$$

Saturación de color y color espectral como propiedades aditivas. Las medidas relacionadas con el color podrían resultar ser propiedades aditivas, con la ventaja de poder usar cartillas de colores predefinidos como salida analítica en un análisis descentralizado. En función de las definiciones, se estudió la relación con la concentración de los parámetros “% saturación de color” (Sat.) y “longitud de onda del color espectral” (λ_{esp}), oportunamente definidos en el Capítulo 2 (Tabla 4.12).

Tabla 4.12. % Saturación de color y longitud de onda espectral para las diluciones seriadas de AgNPs-citrato.*

Dilución	5 nm		10 nm		20 nm		30 nm	
	Sat. (%)	λ_{esp} (nm)						
1	52.9727	573	30.2201	571	33.8327	571	38.4547	571
2	31.8733	571	17.7497	571	20.5848	570	23.6335	570
3	16.9528	571	9.0860	570	11.5462	570	13.1696	570
4	8.3092	570	4.3197	570	5.9560	570	6.5444	569
5	3.8593	570	2.1200	570	2.9140	570	3.3498	569
6	1.8222	570	1.0790	570	1.4990	570	1.7278	569

* El tamaño indicado refiere al tamaño nominal

El % de saturación muestra un comportamiento lineal para todos los tamaños ensayados hasta una concentración nominal de Ag de 0.010 mg/mL, con ligeras desviaciones a partir de esta concentración (Figura 4.12).

Al igual que lo reportado para otras propiedades aditivas, se consigue un comportamiento independiente del tamaño de las AgNPs cuando se expresa la concentración en función de los átomos de Ag más que en función de las AgNPs. En el caso particular que estamos analizando, las AgNPs de tamaño nominal 5 nm quedan claramente por fuera de este comportamiento (Figura 4.12).

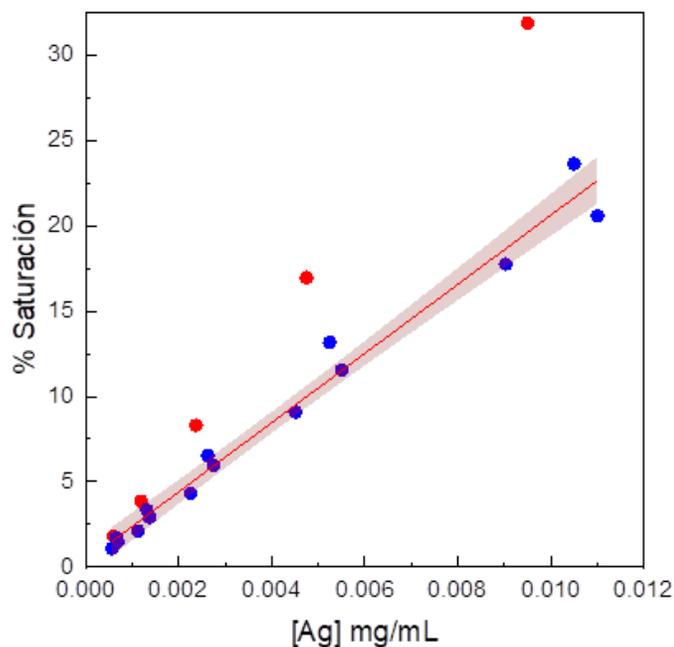


Figura 4.12. Curva de calibración para la propiedad “% Saturación de color” en función de la [Ag], incluyendo todos los tamaños analizados. El área en rojo corresponde a la banda de confianza del ajuste lineal (95 %). Los puntos en rojo corresponden a las AgNPs de tamaño nominal 5 nm, que se apartan apreciablemente del comportamiento general mostrado por las AgNPs de otros tamaños.

La ordenada en el origen es nula ($P < 0.05$), por lo que las ecuaciones de las rectas para [Ag] son:

$$\% \text{ Sat.} = (2025 \pm 81) [\text{Ag}] \quad (\text{mg/mL}) \quad (\text{ec. 4.17})$$

$$\% \text{ Sat.} = (218000 \pm 9000) [\text{Ag}] \quad (\text{mol/L}) \quad (\text{ec. 4.18})$$

La longitud de onda para el color espectral varía entre 569 y 573 nm, correspondiente a color evocado como “amarillo”. Por otra parte, la longitud de onda para el color espectral no se ve significativamente alterado ni en función del tamaño de las AgNP-citrato ni en función de su concentración, por lo que no resulta ser una propiedad aditiva. El valor medio obtenido para todos los estándares de AgNPs-citrato medidos fue de 570 nm, valor que podría tomarse como representativo del color espectral de estas nanopartículas.

4.3.5. Incidencia del agente de recubrimiento

Los estudios descritos en la Sección 4.3.4 incluían a las AgNPs recubiertas con citrato. ¿En qué medida el cambio en el agente de recubrimiento afecta la aditividad y las propiedades derivadas de la misma? Para contestar esta pregunta, se utilizaron soluciones certificadas de AgNPs de 30 nm de tamaño nominal, rodeadas con PVP y con ácido lipoico, para compararlas con las correspondientes al citrato. Todas las soluciones fueron de la firma nanoComposix®, y los datos aportados por el proveedor se resumen en la Tabla 4.13.

Tabla 4.13. Características de los estándares de AgNPs de tamaño nominal 30 nm recubiertas con diferentes ligandos, de la firma nanoComposix®.

Ligando	Tamaño TEM (nm)	Tamaño DLS (nm)	[Ag] ^a (mg/mL)	[AgNP] ^a (partículas/mL)	factor de corrección f^b	λ_{LSRP} (nm)
citrato	32.7 ± 4.8	35.6	0.021	1.1 × 10 ¹¹	1.05	404
lipoico	32.7 ± 4.8	46.1	0.021	1.1 × 10 ¹¹	1.05	411
PVP	29.1 ± 3.7	43.9	0.021	1.6 × 10 ¹¹	1.05	400

^a Concentraciones reales declaradas por nanoComposix®

^b Definido como $f = [\text{concentración}]_{\text{real}}/[\text{concentración}]_{\text{nominal}}$. La concentración nominal es de 0.020 mg/mL. Ver discusión en Sección 4.3.3.

Estudios ópticos. Los espectros UV/VIS muestran diferencias tanto en la posición de las bandas de absorción (los valores experimentales fueron idénticos a los aportados por la firma nanoComposix®) como en los valores de absorbancia máxima (Figura 4.13), indicando que los coeficientes de extinción molar son diferentes.

Una forma de saber si las ecuaciones generalizadas obtenidas con AgNP-citrato son válidas para las dispersiones de AgNPs con otros ligandos, es calculando las concentraciones a partir de estas ecuaciones. Para una concentración real de 0.0105 mg/mL, los resultados (Tabla 4.14), muestran que las ecuaciones generalizadas son útiles para el análisis de AgNP-citrato, pero no necesariamente podrán ser útiles para el análisis de otras AgNPs.

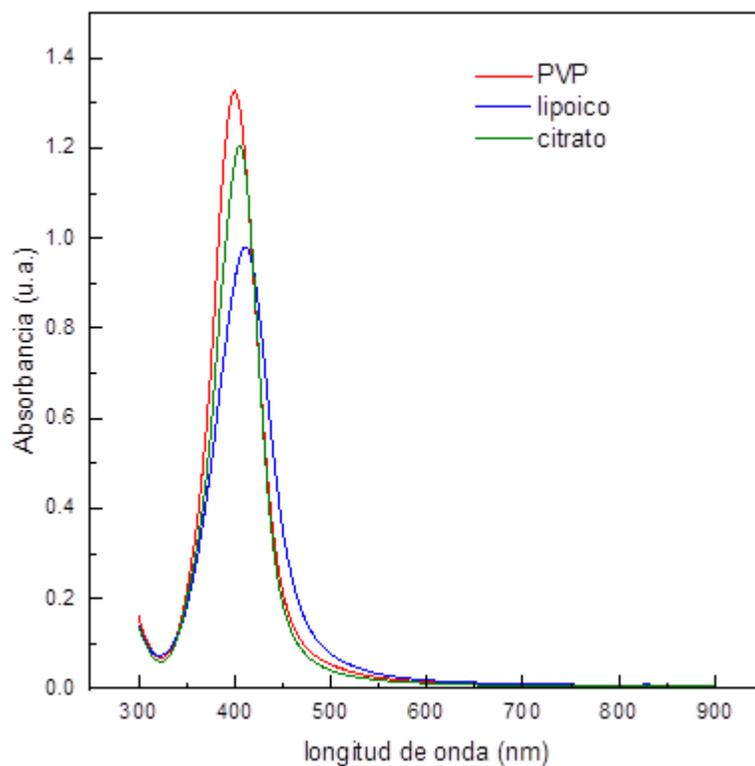


Figura 4.13. Espectros UV/VIS para las dispersiones de AgNPs de tamaño nominal 30 nm, con diferentes agentes de recubrimiento.

Tabla 4.14. Resultados analíticos para AgNPs con diferentes ligandos, empleando ecuaciones generalizadas obtenidas para AgNP-citrato. ^a

Parámetro	Ecuación	AgNP-citrato	AgNP-lipoico	AgNP-PVP
Absorbancia	4.12	0.010 (4.8 %)	0.008 (23.8 %)	0.011 (4.8 %)
% saturación	4.17	0.012 (14 %)	0.018 (71 %)	0.014 (33 %)

^a Tamaño nominal 30 nm.

Estudios electroquímicos. Los barridos hacia potenciales positivos de las dispersiones de AgNPs depositadas sobre Cgrafito (Figura 4.14) muestran un comportamiento diferente, a pesar de tratarse de AgNPs con aproximadamente el mismo tamaño y concentración. Los ensayos fueron acompañados con la medida de soluciones de Ag⁺ y agua, que sólo mostraron corrientes capacitivas.

En el caso de las AgNP-PVP, es notoria su menor carga asociada con la oxidación: comparada con AgNP-citrato y AgNP-lipoico. Este efecto de disparidad de cargas a igual tamaño del núcleo metálico fue observado por el grupo de Compton (Tanner et al., 2015), que explicaron la baja carga de oxidación observada para AgNP-polietilenglicol por la inactivación de las nanopartículas protegidas por ciertos agentes, y la necesidad de una activación previa a su oxidación, lo que torna al proceso electroquímico en ineficiente:



El hecho que el potencial de oxidación no se vea notoriamente modificado sugiere que se trata de un fenómeno puramente cinético más que termodinámico.

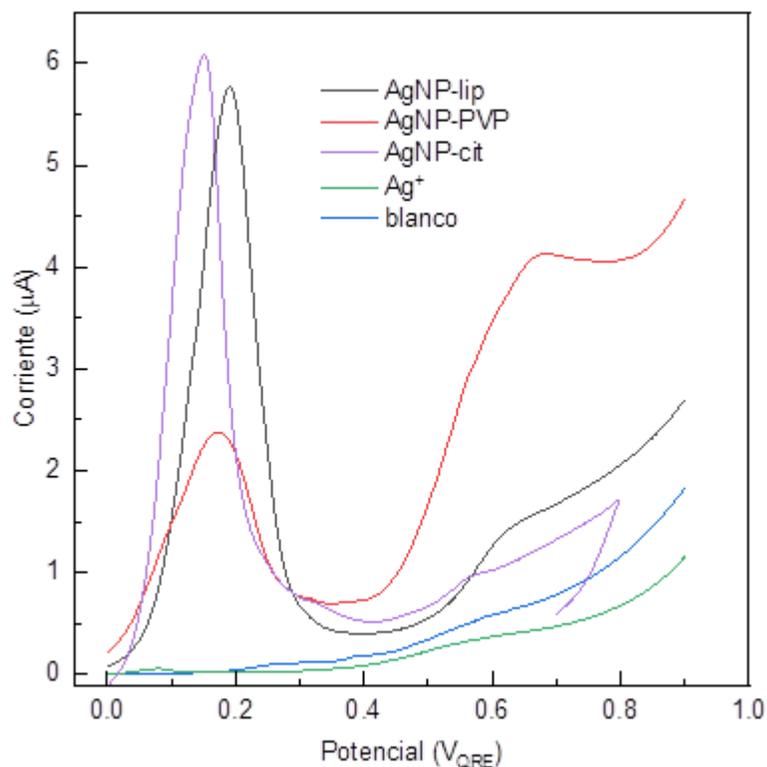


Figura 4.14. Barridos anódicos correspondientes a AgNPs con diferentes ligandos depositadas sobre el electrodo de trabajo de carbono grafito. Electrolito soporte: 0.1 M NaNO₃. Se indican como referencia el comportamiento del sistema en ausencia de AgNPs, y sólo en presencia de una solución de Ag⁺.

4.3.6. Análisis de muestras reales

En función de la evaluación de las diferentes propiedades mensurables sobre las soluciones coloidales certificadas (no trazables) de AgNPs de la firma Composix®, se llevaron a cabo las medidas sobre las muestras reales seleccionadas.

Efecto Tyndall. La observación del efecto Tyndall provee un método sencillo de observar la presencia de material particulado en una solución. El procedimiento puede llevarse a

cabo en un ambiente luminoso, empleando un puntero láser comercial (haz de luz rojo de 635 nm, 5 mW), pero con fines de registro, se empleó la cámara del equipo DLS, que permite un buen contraste (Figura 4.15).

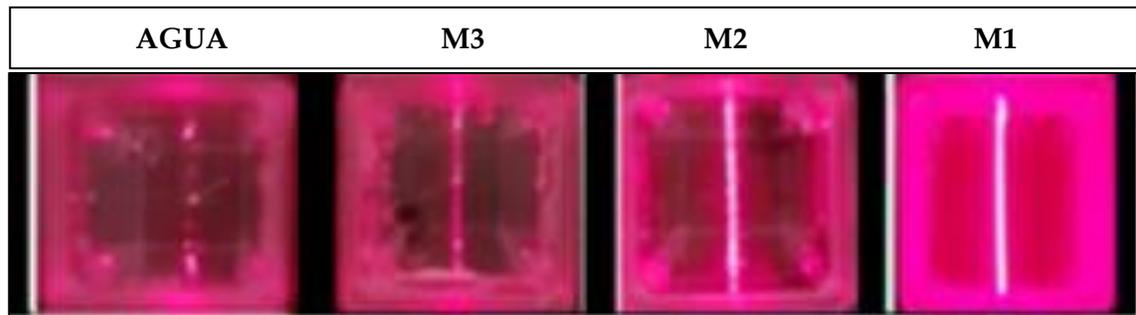


Figura 4.15. Dispersión de luz observada a 90 ° durante la irradiación de las muestras comerciales M1, M2, M3 y AGUA ultrapura, con un haz de láser de diodo de 35 mW (660 nm). Imagen obtenida de la vista superior de la cubeta de muestra en el porta muestras del equipo DLS.

La dispersión se observa como una línea delgada por donde pasa el haz de luz, cuya intensidad puede tomarse como una medida relativa de las concentraciones (Xiao et al., 2019; Yuan et al., 2022). En el caso de las soluciones verdaderas, o del blanco consistente en agua, el haz de luz atraviesa la solución sin dispersarse, por lo que no se observa. La evaluación cualitativa de la concentración de material dispersante en las soluciones comerciales, sugiere que se produce en el orden $M1 > M2 > M3$.

Microscopía TEM. Para la muestra M1 (Figura 4.16) se observan nanopartículas esféricas que no se encuentran aisladas ni agregadas, sino que se unen formando cadenas largas, pero al mismo tiempo manteniendo su identidad nanoparticulada, es decir, no se observa fusión de nanopartículas.

En las micrografías TEM de la muestra M2 (Figura 4.16) sí se observan nanopartículas esféricas aisladas, y en otros casos formando agregados donde se observa la fusión parcial de las nanopartículas.

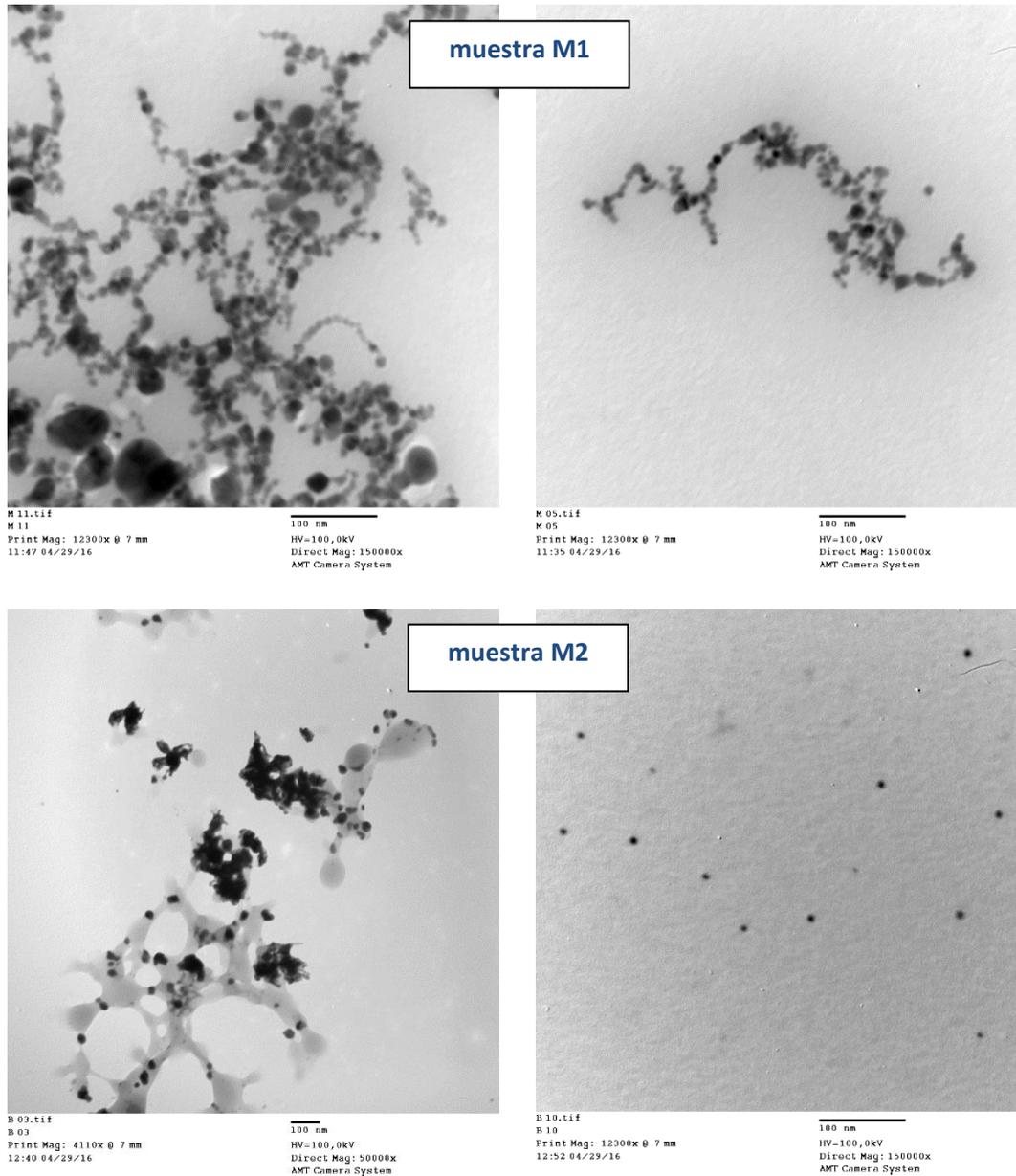


Figura 4.16. Micrografías TEM para las muestras comerciales M1 y M2.

En el caso de la muestra M3 (Figura 4.17), si bien en algún caso se observaron algunas partículas aisladas de gran tamaño (observar que la barra de escala del panel de la derecha es de 500 nm), en general lo que se observa en las diferentes micrografías son grandes acúmulos en los que no puede distinguirse material nanoparticulado.

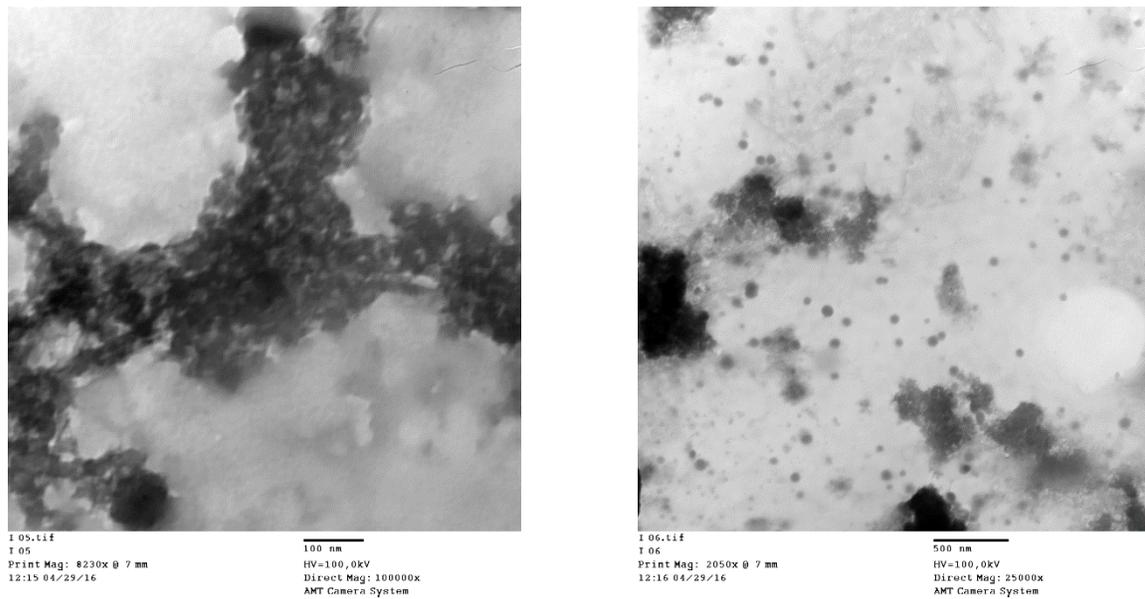


Figura 4.17. Micrografías TEM para la muestra M3

A partir de las micrografías TEM se determinó la distribución de tamaños para las diferentes muestras analizadas (Figura 4.18). En el caso de la muestra M3, la distribución no pudo ser determinada debido al bajo número de partículas detectables con que se contó.

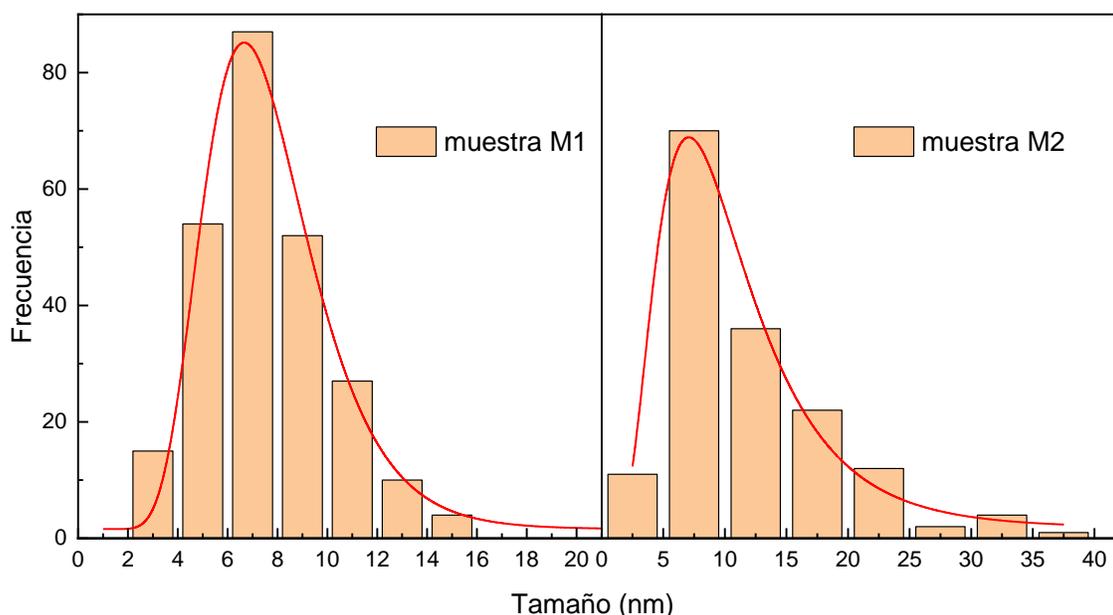


Figura 4.18. Distribución de tamaños TEM para las muestras comerciales M1 y M2.

La distribución en ambos casos fue del tipo lognormal, con la máxima frecuencia de tamaño centrada en 7.4 nm para M1 y 9.5 nm en M2. A partir de estos resultados, es posible estimar los coeficientes de extinción molar por interpolación a partir de los datos tabulados para AgNP-citrato (Paramelle et al., 2014). Los valores interpolados tendrán validez en tanto el citrato sea efectivamente el agente protector de las AgNPs de las muestras (Tabla 4.14). Los resultados sugieren que la muestra M1 está, efectivamente, formada por AgNPs-citrato, al obtenerse el valor declarado por el fabricante.

El análisis por DLS arrojó los radios hidrodinámicos para las 3 muestras (Figura 4.19), ya que el análisis pudo detectar la presencia de material particulado, tal y como se obtuvo con el efecto Tyndall. Los resultados se resumen en la Tabla 4.15.

Tabla 4.15. Características de las AgNPs de las muestras comerciales analizadas.

Muestra	tamaño TEM (nm)	tamaño DLS (nm)	λ_{LSRP} (nm)	ϵ_{AgNP} ($M^{-1} cm^{-1}$) ^a	[AgNP] calculada (M) ^b	[Ag] calculada (ppm) ^c
M1	7.4	22	392	7.24×10^7	1.50×10^{-8}	20.1
M2	9.5	22	392	4.63×10^8	4.32×10^{-11}	0.12
M3	---	50	---	---	---	---

^a Calculados por interpolación a partir de los datos reportados en (Paramelle et al., 2014).

^b Calculado a partir del valor de absorbancia de la muestra ($A = 1.084$ para M1 y $A = 0.020$ para M2), asumiendo cumplimiento de la ley de Beer-Lambert.

^c Usando la ec. 4.08.

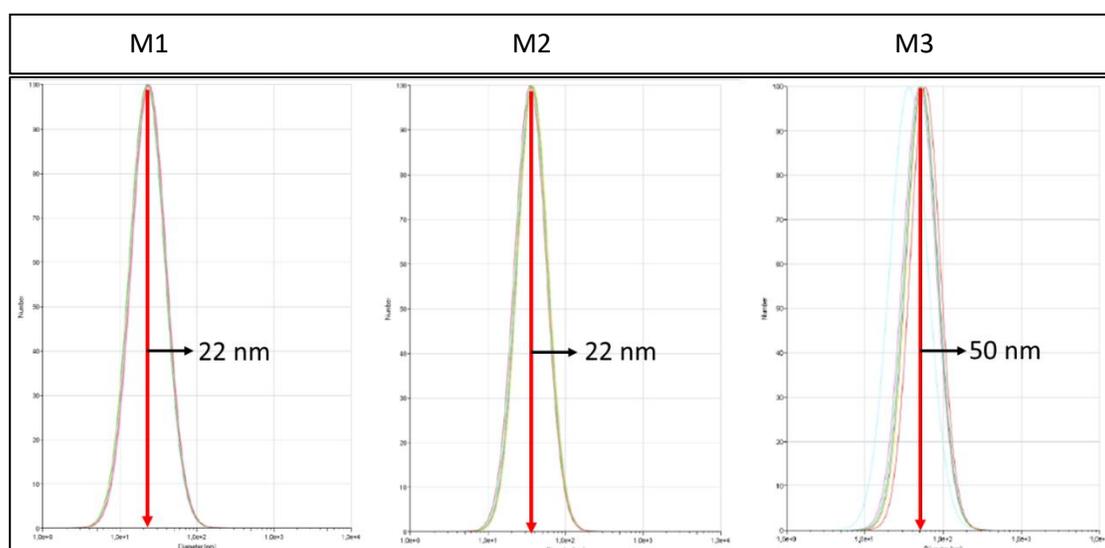


Figura 4.19. Distribución de tamaños obtenida por DLS para las muestras comerciales

Estabilidad coloidal. La estabilidad coloidal aporta indicios acerca del agente protector que recubre a las AgNPs. Para las AgNPs se cuenta con estudios detallados en el Laboratorio de Biomateriales para diferentes agentes de recubrimiento. En particular, para

agentes comunes como el citrato, se induce la agregación a concentración salina por encima de 30 mM.

La muestra M2 se muestra estable frente al aumento de la fuerza iónica (Figura 4.20), manteniéndose dentro del rango de absorbancias 0.017 – 0.025, con un valor promedio de 0.021. Conociendo que los iones citrato como agentes estabilizantes, no pueden proveer estabilidad para concentraciones de sal por encima de los 30 mM, el resultado obtenido para la muestra M2 puede tomarse como un indicio que la naturaleza química del agente protector es diferente al citrato.

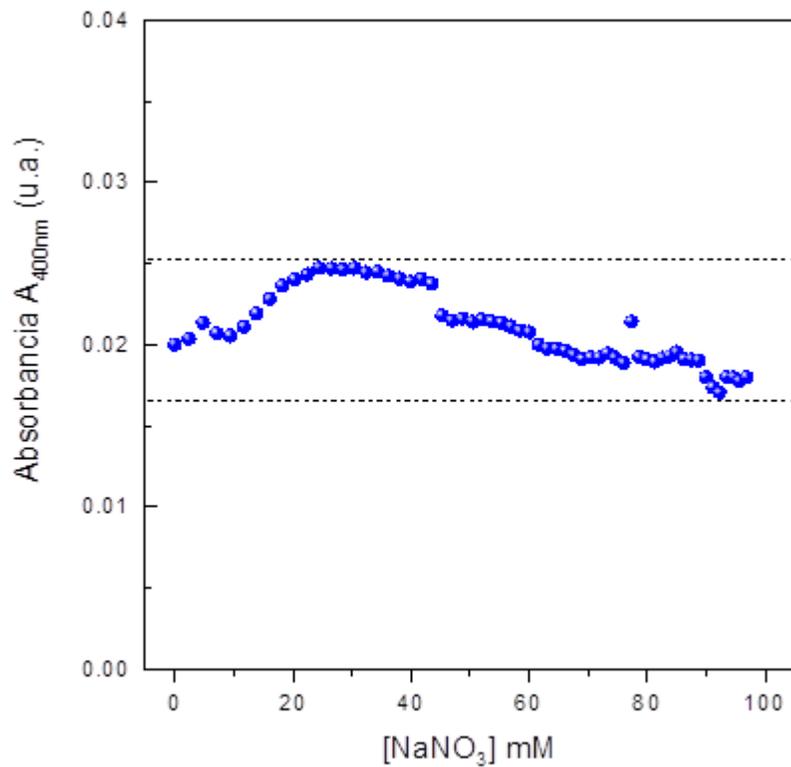


Figura 4.20. Curvas de estabilidad coloidal frente al aumento de la fuerza iónica para la muestra M2.

Espectroscopía UV/VIS. La espectroscopía UV/VIS aporta varias evidencias acerca de la naturaleza del material nanoparticulado presente en las muestras (Figura 4.21).

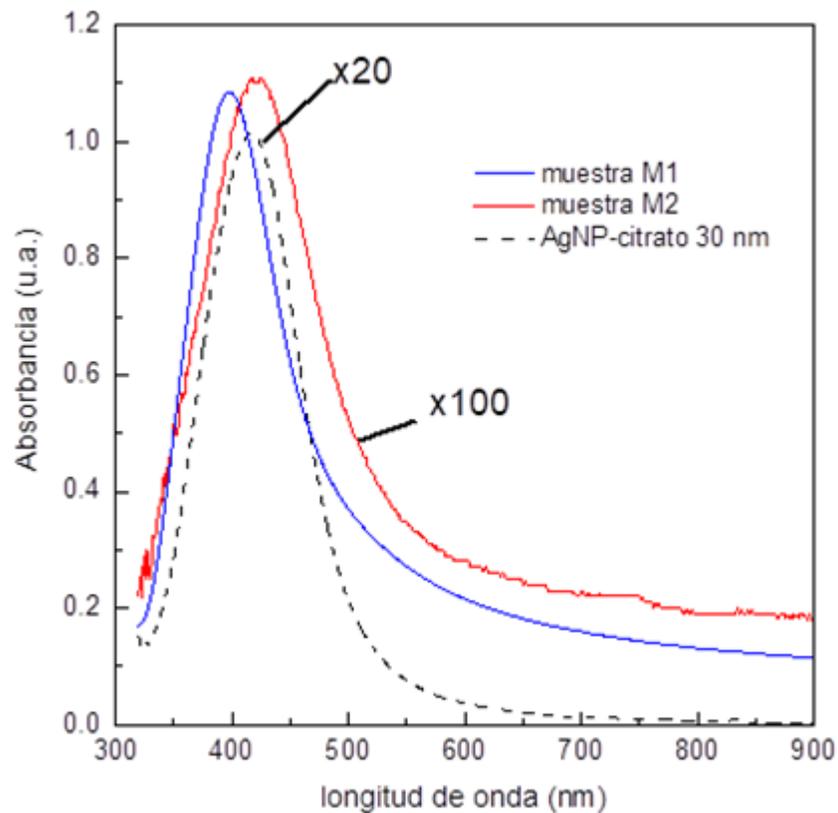


Figura 4.21. Espectros UV/VIS para las muestras comerciales. Los registros correspondientes al estándar de AgNP-citrato de 30 nm y de la muestra M2 fueron escalados a una absorbancia máxima ca. 1.

Una primera observación que debe hacerse es la presencia de material agregado que da lugar a una absorción constante por encima de los 500 nm. Obsérvese que, para el estándar, esa región prácticamente no presenta absorción de la radiación electromagnética.

En el caso de la muestra M3, se observa una absorción importante en la región UV del espectro electromagnético, mientras que la absorción esperada para el plasmón de las

AgNPs es difícil de ver, y debió analizarse mediante el registro de la derivada segunda del espectro (Figura 4.22). De la derivada segunda se deduce una posible contribución centrada a 408 nm (¿AgNPs?), y una importante contribución centrada en 281 nm, valor típico para la absorción de proteínas.

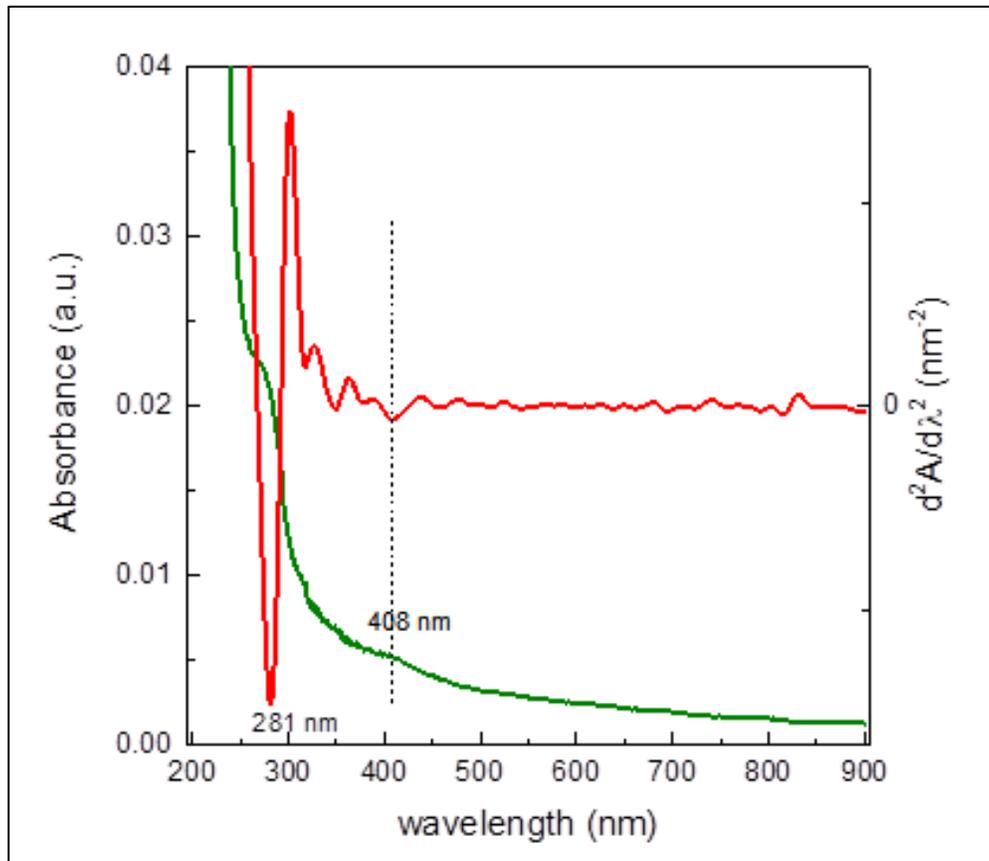


Figura 4.22. Espectro UV/VIS completo para la muestra M3 (trazo verde) y derivada segunda del espectro (trazo rojo).

Finalmente, para las dos muestras sobre las que se pudo obtener espectros UV/VIS medibles, se calculó las concentraciones estimadas de AgNP expresadas en función de la masa de Ag (Tabla 4.16).

Tabla 4.16. Valores representativos de los espectros de la Figura 4.21 y estimación de la concentración de las muestras comerciales.

Muestra	Abs _{máx} (u.a.)	[Ag] ppm calculada ^a
M1	1.085	8.9
M2	0.020	0.16
M3	---	---

^a Calculada con la ec. 4.12

Las concentraciones calculadas son menores en los dos casos. En el caso de la muestra M1, para el que los resultados sugieren que efectivamente se encuentra protegida con citrato, la diferencia puede deberse a que el coeficiente de extinción másica empleado resulta de considerar un rango amplio de tamaños (5 – 30 nm), y en el rango bajo, el error es mayor. Otros factores también pueden estar influyendo: i) menor cantidad efectiva de AgNPs aisladas debido a la presencia de agregados, ii) que las concentraciones indicadas por los proveedores no sea real (una práctica común en el caso de productos nanotecnológicos donde aún no se han establecido controles oficiales), iii) que las moléculas que actúan como agentes de estabilización sean diferentes al citrato. Este último aspecto ya fue demostrado con las curvas de estabilidad, donde vimos que las soluciones coloidales de la muestra M2

eran capaces de resistir la agregación inducida por fuerza iónica hasta una concentración salina de 100 mM.

Estudios electroquímicos. Se llevaron a cabo barridos positivos en primer lugar, de modo de detectar solamente a las AgNPs sin la interferencia de los iones Ag^+ (Figura 4.23). Para las muestras M1 y M2, aparecen corrientes faradaicas positivas centradas en $0.19 \text{ V}_{\text{QRE}}$ correspondientes a la oxidación de las AgNPs a Ag^+ (reac. 4.1).

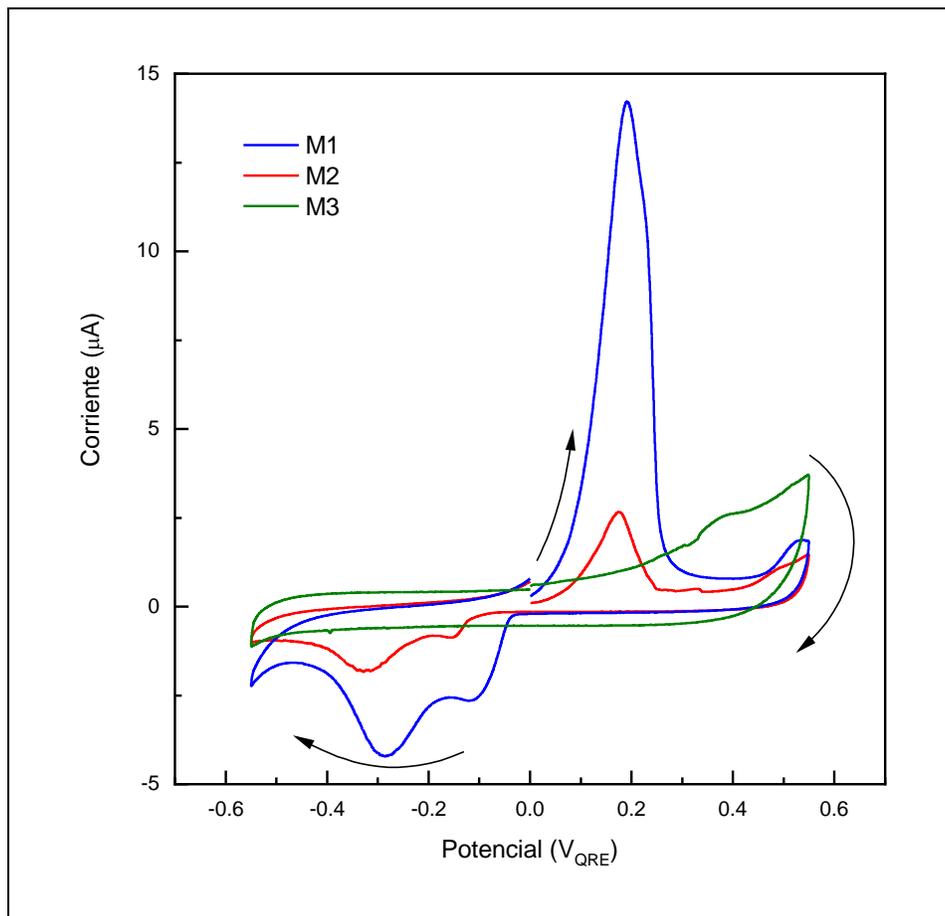


Figura 4.23. Voltamperometrías cíclicas de las AgNPs depositadas sobre electrodos serigrafados de carbono grafito (C110, DropSens®), comenzando en 0 V_{QRE} en la dirección positiva.

Para el caso de M3, esta señal está ausente, lo que indica que, a nivel de un análisis voltamperométrico, las AgNPs no son detectadas. El barrido subsiguiente en sentido negativo da lugar a dos señales faradaicas centradas en -0.11 y -0.30 V_{QRE}, correspondientes a la reducción de los iones Ag⁺ a Ag_{ad} (reac. 4.2) y Ag_{bulk} (reac. 4.3), respectivamente.

Los resultados obtenidos (Tabla 4.17) se encuentran más próximos a los valores declarados por los fabricantes. En el caso de la oxidación de las AgNPs, es posible también la oxidación de los agregados, por lo que son esperables valores más altos que sean independientes (en algún grado) del estado de agregación del sistema.

Tabla 4.17. Valores representativos de los voltamperogramas cíclicos de la Figura 4.23 y estimación de la concentración de las muestras comerciales.

Muestra	E _p (V _{QRE})	I _p (μA)	Q _{ox} (μC)	[Ag] ppm calculada*	[Ag] ppm calculada**
M1	0.19	14.3	31.6	17.3	13.8
M2	0.18	2.67	5.9	3.2	2.6
M3	n.d	n.d	---	---	---

n.d. no detectado

* con los datos de Q_{ox}, usando la ec. 4.14

** con los datos de I_p, usando la ec. 4.13.

¿Es posible discriminar AgNPs de iones Ag⁺ voltamperométricamente? Una selección adecuada de los ciclos voltamperométricos permite estudiar si una muestra contiene AgNPs, Ag⁺ o ambas. El problema aquí es fundamental, ya que los productos comerciales que claman tener “nanosilver” son comercializados con el fin primordial de actuar como

agentes sanitizantes, propiedad que tienen los iones Ag^+ ; el hecho de introducir la etiqueta “nano” cuando el producto contiene Ag^+ en lugar de AgNP constituye un fraude. Por otra parte, un producto que contenga AgNPs va a oxidarse con el paso del tiempo a Ag^+ , por lo que una metodología que permita distinguir ambos estados simultáneamente tendrá aplicación en la detección de fraudes y en el establecimiento de la vida útil del producto.

Con base en lo discutido en la Sección 4.3.4, se hicieron los barridos de oxidación inicial y de reducción inicial de las muestras comerciales (Figura 4.24).

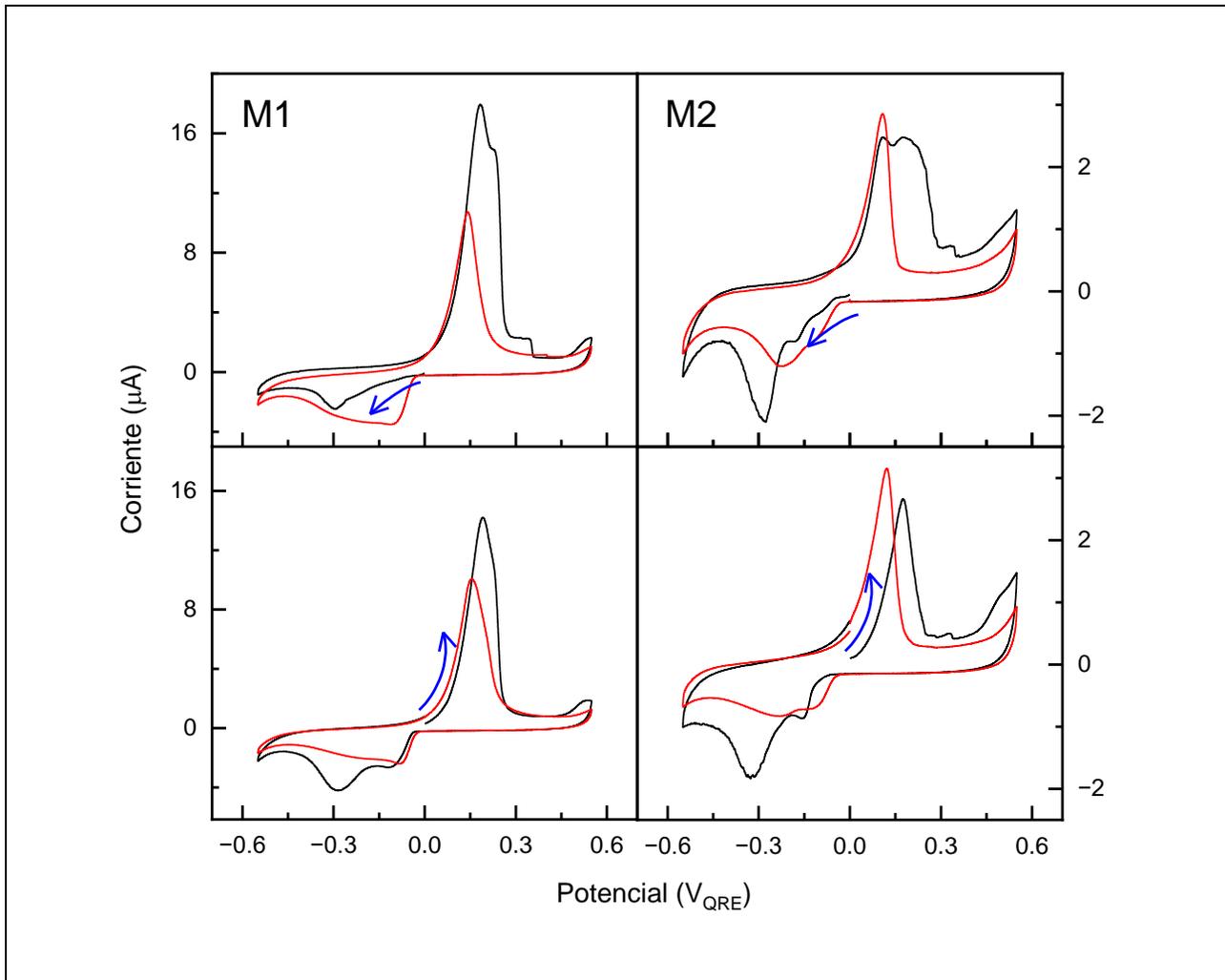


Figura 4.24. Ciclos voltamperométricos para las muestras M1 (paneles izquierdos) y M2 (paneles derechos). En los paneles superiores el ciclo inicial es en el sentido negativo de potenciales, en los paneles inferiores en el sentido positivo de potenciales. Trazos negros: primer ciclo, trazos rojos: segundo ciclo. Velocidad de barrido: 0.050 V/s.

Para ambas muestras se observan las mismas características. Cuando el barrido se inicia en el sentido positivo de potencial, se obtiene una señal faradaica anódica correspondiente a la oxidación de las AgNPs presentes en la muestra, y en el barrido negativo subsiguiente se observan las señales ya discutidas asociadas a la reducción de los iones Ag^+ provenientes

de las AgNPs (ca. $-0.10 V_{QRE}$) y a los iones Ag^+ presentes originalmente en la solución (ca. $-0.30 V_{QRE}$). En el segundo ciclo, la oxidación de la Ag_{bulk} se produce a un potencial más bajo, mientras que en el siguiente ciclo reductivo sólo se observa la señal correspondiente a la reducción de los iones Ag^+ adsorbidos. De esta manera, la señal faradaica observada a $-0.30 V_{QRE}$ corresponde a los iones Ag^+ originalmente en la solución. La presencia simultánea de los picos a $0.19 V_{QRE}$ y a $-0.30 V_{QRE}$ indicaría la presencia de ambas especies.

Cuando el barrido se hace primero en el sentido negativo, se observa principalmente la señal faradaica a $-0.30 V$, ya que no se pudo generar iones Ag^+_{ad} aún. En el barrido positivo subsiguiente, se observan ambas señales, a $0.14 V_{QRE}$ y $0.19 V_{QRE}$, con un grado de superposición dependiente de las concentraciones presentes. Finalmente, en el segundo ciclo se observan las señales correspondientes a Ag_{bulk} y Ag^+_{ad} .

Cabe señalar que de las diferencias de cargas entre los picos anódicos podría hacerse una estimación de las cantidades de plata presente en la muestra bajo ambas formas. Por ejemplo, si se compara el primer ciclo con el segundo para ambas muestras queda claro que la cantidad de Ag^+ presente originalmente en la muestra M2 es significativamente mayor que en la muestra M1, lo cual está de acuerdo con la menor recuperación obtenida para la muestra M2.

Medidas de color. Las medidas de los parámetros relacionados con el color para cada una de las muestras se emplearon para calcular las concentraciones de AgNPs en las mismas, empleando las ecuaciones derivadas oportunamente (Tabla 4.18).

Tabla 4.18. % Saturación de color y longitud de onda espectral para las soluciones comerciales analizadas.

Medida	M1		M2		M3	
	Valor	[Ag] ppm ^a	Valor	[Ag] ppm ^a	Valor	[Ag] ppm ^a
λ_{esp} (nm)	576		573		574	
Sat. (%)	40.1926	19.8	0.7422	0.36	0.1690	0.08
L*	78.1267		99.6735		99.7596	
a*	-1.8449		-0.1883		-0.0276	
b*	34.5006		0.3155		-0.3214	

^a Calculado con la ec. 4.17.

Para las 3 muestras comerciales, el color espectral estuvo próximo a los 570 nm, evocando el color amarillo. Los valores de L*a*b* aportan más información. Para las 3 muestras, el análisis del eje rojo-verde (parámetro a*) arroja valores negativos, indicando un corrimiento hacia el verde, pero de magnitud muy próxima a 0. Para el eje amarillo-azul (parámetro b*), la muestra M3 arroja un valor negativo (azul), mientras que las muestras M1 y M2 muestran valores positivos (amarillos), y en el caso de M1, un valor francamente más alto que para M2, probablemente debido a la diferencia de concentración.

Finalmente, destacamos que el empleo de la ecuación generalizada para la saturación de color arroja el valor esperado para la muestra M1 (99 % del valor declarado), pero no para M2 (7.2 % del valor declarado).

4.4. Resumen de resultados

Un resumen de los resultados obtenidos para las tres muestras comerciales (Tabla 4.19) muestra la variabilidad de valores obtenidos; aun así, no se puede dar certeza que los mismos sean correctos debido a la ausencia de estándares adecuados. Se pueden hacer algunas generalizaciones, a partir del gráfico comparativo que se muestra en la figura 4.25.

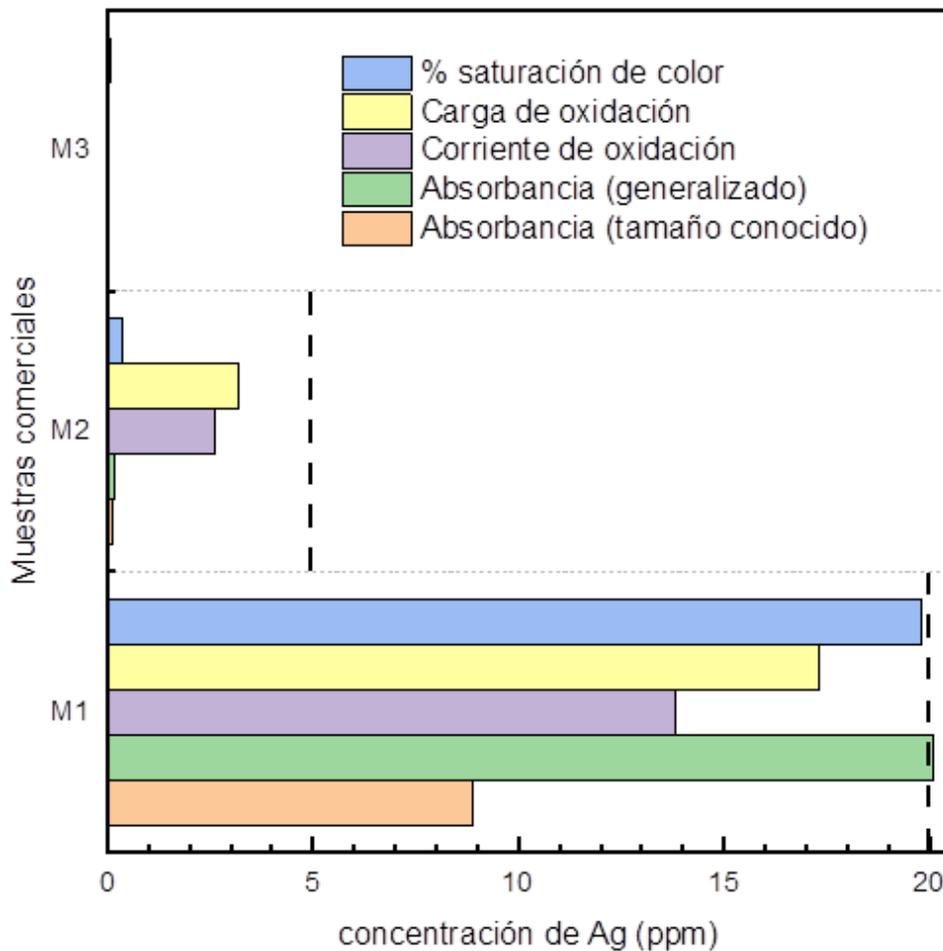


Figura 4.25. Resumen gráfico de los resultados analíticos para cada muestra comercial. En línea punteada se marca el valor indicado por el fabricante (salvo para M3).

Tabla 4.19. Valores analíticos obtenidos para las diferentes muestras comerciales, expresados como mg/L (ppm), y el porcentaje de recuperación obtenido a partir del valor indicado por el fabricante.

Método	M1		M2		M3	
	Valor	Recuperación	Valor	Recuperación	Valor	Recuperación
Color evocado	Amarillo		Amarillo		Amarillo	
Efecto Tyndall	+++		++		+	
Absorbancia tamaño conocido ^a	8.9 ppm	45 %	0.12 ppm	2.4 %	n.d.	n.c.
Absorbancia generalizada ^b	20.1 ppm	100 %	0.16 ppm	3.2 %	n.d.	n.c.
Carga de oxidación ^c	17.3 ppm	87 %	3.2 ppm	64 %	n.d.	n.c.
Corriente de oxidación ^d	13.8 ppm	69 %	2.6 ppm	52 %	n.d.	n.c.
% saturación color ^e	19.8 ppm	99 %	0.36 ppm	0.7 %	0.08	n.c.

n.c. No calculado, por no conocerse el valor declarado por el fabricante.

n.d. No detectado

^a Calculando el coeficiente de extinción molar a partir del tamaño (Paramelle et al., 2014), y luego aplicar la Ley de Beer-Lambert (ec. 4.11).

^b Calculado con la ec. 4.12.

^c Calculado con la ec. 4.14.

^d Calculado con la ec. 4.13.

^e Calculado con la ec. 4.17.

A nivel comercial (y científico) existen productos de buena calidad que pueden servir para establecer las características de algunas soluciones estándar, como es el caso de los provistos por la firma nanoComposix® empleados en este trabajo. Sin embargo, resulta virtualmente imposible contar con todos los posibles estándares, i.e. con todos los posibles agentes protectores, para poder establecer los procedimientos analíticos específicos. En el caso de la presente Tesis, se hizo un estudio profundo empleando como agente estabilizante al citrato, y sólo se constató las diferencias debidas a el cambio en el agente estabilizante. Con base en estos estudios, hemos podido observar que el agente estabilizante es clave en el comportamiento fisicoquímico de las dispersiones de AgNPs, y que es necesario contar con estándares específicos para poder conocer la concentración real en una muestra comercial.

Los resultados obtenidos para la M1 con las diferentes metodologías ensayadas son satisfactorios en su mayoría: si se toma como válido el valor indicado por el fabricante, 3 metodologías de 5 tienen recuperaciones por encima del 80 %. Los resultados globalmente sugieren que el agente estabilizante en este caso es el citrato, y por eso las metodologías desarrolladas pueden evaluar correctamente al producto.

En el caso de la muestra M2, los resultados obtenidos con las mismas metodologías son insatisfactorios, con recuperaciones en todos los casos por debajo del 80 %. Los estudios de estabilidad coloidal sugieren que el agente estabilizante es diferente al citrato, lo que podría explicar que las metodologías no resulten adecuadas para evaluar este tipo de productos.

Cabe señalar, que los análisis electroquímicos son los que arrojan resultados parejos para M1 y M2, indicando que el fundamento de la técnica, que es la oxidación del núcleo metálico, es clave en el procedimiento analítico. Sin

embargo, como ya se mencionó, diferentes agentes estabilizantes pueden afectar la cinética del proceso por inactivación electroquímica de las AgNPs.

El caso de la muestra M3 es muy interesante, debido a que los resultados experimentales parecen arrojar interpretaciones contradictorias. Por un lado, el efecto Tyndall muestra la existencia de material particulado, pero las micrografías TEM muestran estructuras complejas que no pueden asimilarse a nanopartículas. Por DLS también se confirma la presencia de material particulado de tamaño medio 50 nm, y el color evocado es amarillo. Estos resultados en conjunto indicarían la presencia de AgNPs. Sin embargo, la ausencia de señales de oxidación para las AgNPs y de bandas de absorción atribuibles a la LSRP de las AgNPs sugiere que el material particulado no corresponde a AgNPs. La extensión del registro espectral hacia la región UV mostró una banda de absorción atribuible a proteínas, por lo que, en conjunto, podría tratarse de un complejo de proteínas y plata, ampliamente usado como agente desinfectante. El fabricante lo único que indica es la presencia de “material biológico” (Tabla 4.1), que estaría de acuerdo con nuestra interpretación. Sin embargo, el análisis electroquímico no muestra ninguna señal faradaica atribuible a la reducción de iones Ag^+ , por lo que queda descartada la presencia de Ag bajo ninguna de sus formas. En este caso, estaríamos en presencia de un fraude comercial. A esto se suma el comportamiento anómalo del color, que muestra un valor de b^* negativo (hacia el azul).

4.5. Protocolo propuesto

La técnica de plasma acoplado inductivamente (ICP) (Tulve et al., 2015) y de plasma acoplado inductivamente de una sola partícula (Laborda et al., 2013), fueron sugeridos como procedimientos iniciales de detección para la evaluación de la presencia e identificación de AgNPs en productos comerciales. El objetivo

principal es la detección de plata como paso inicial para la evaluación del producto comercial. A partir de este análisis (no descentralizable, y muy costoso), se propone una batería de análisis para demostrar la existencia de material nanoparticulado y sus características.

Sin embargo, desde nuestro punto de vista el fraude más simple de realizar en productos comerciales es la sustitución de AgNPs por iones Ag^+ , ya que ambos poseen actividad bactericida. Por lo tanto, encontramos más conveniente considerar un protocolo en el que la detección del material nanoparticulado constituya la etapa inicial, y en ese sentido, la detección por efecto Tyndall con un puntero laser manual constituye una alternativa descentralizable y económica, de hecho, sin costo (Figura 4.26).

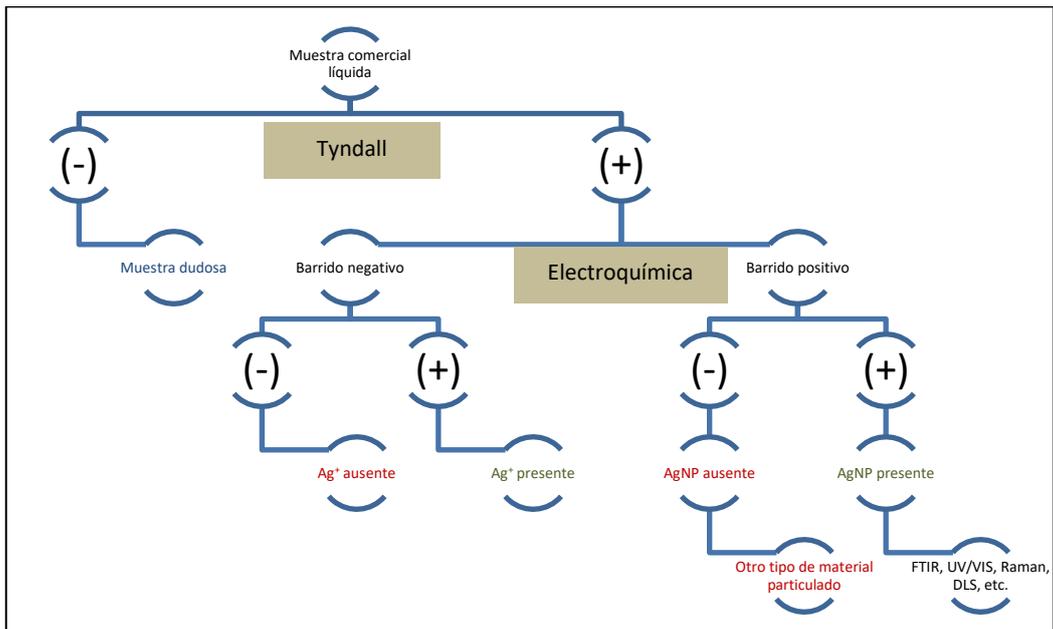


Figura 4.26. Protocolo propuesto para el análisis de muestras comerciales que indican tener AgNPs.

Para el caso de las tres muestras analizadas, la aplicación de este protocolo hubiera seguido los siguientes pasos (figuras 4.27, 4.28 y 4.29):

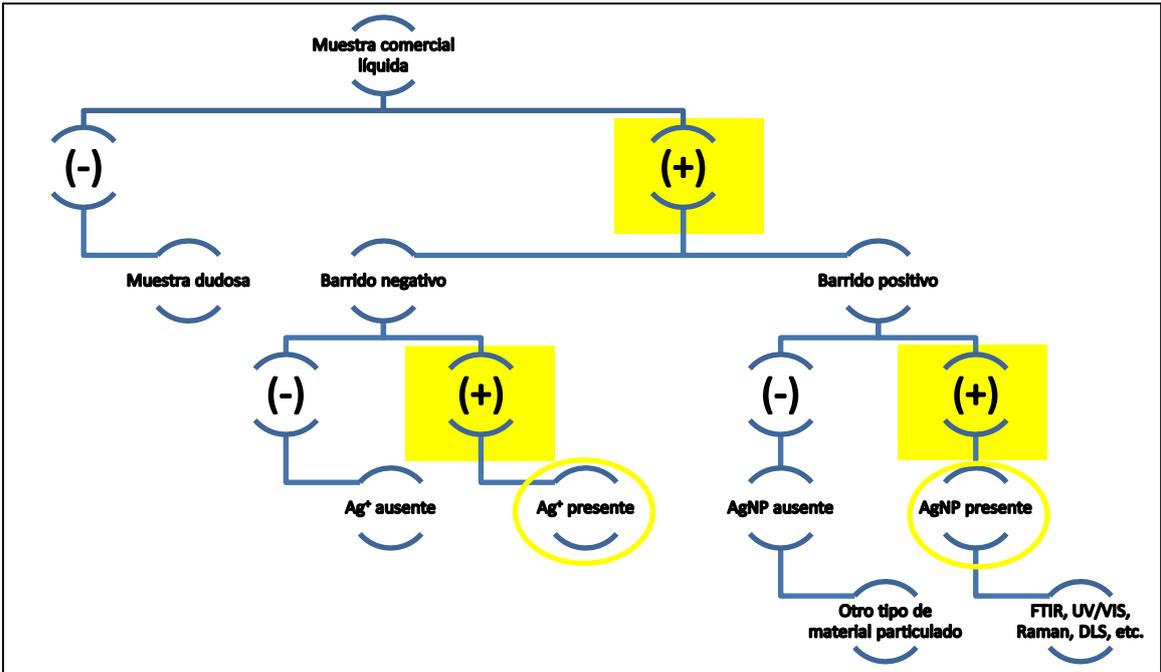


Figura 4.27. Protocolo propuesto para el análisis de la muestra comercial M1 que indica tener AgNPs.

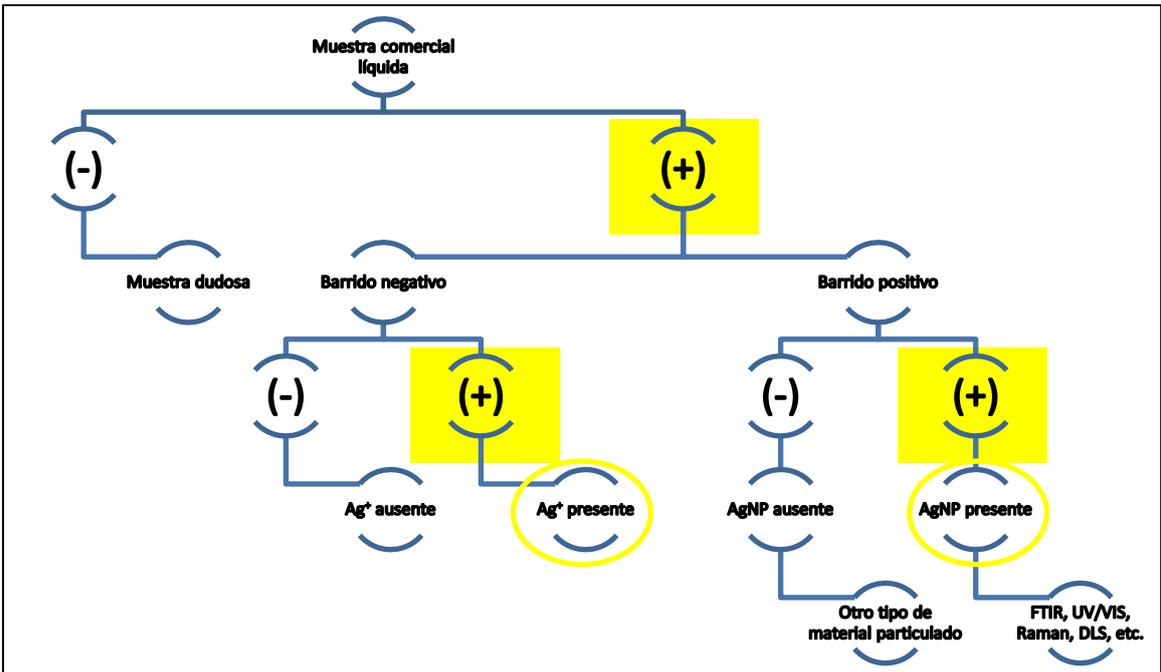


Figura 4.28. Protocolo propuesto para el análisis de la muestra comercial M2 que indica tener AgNPs.

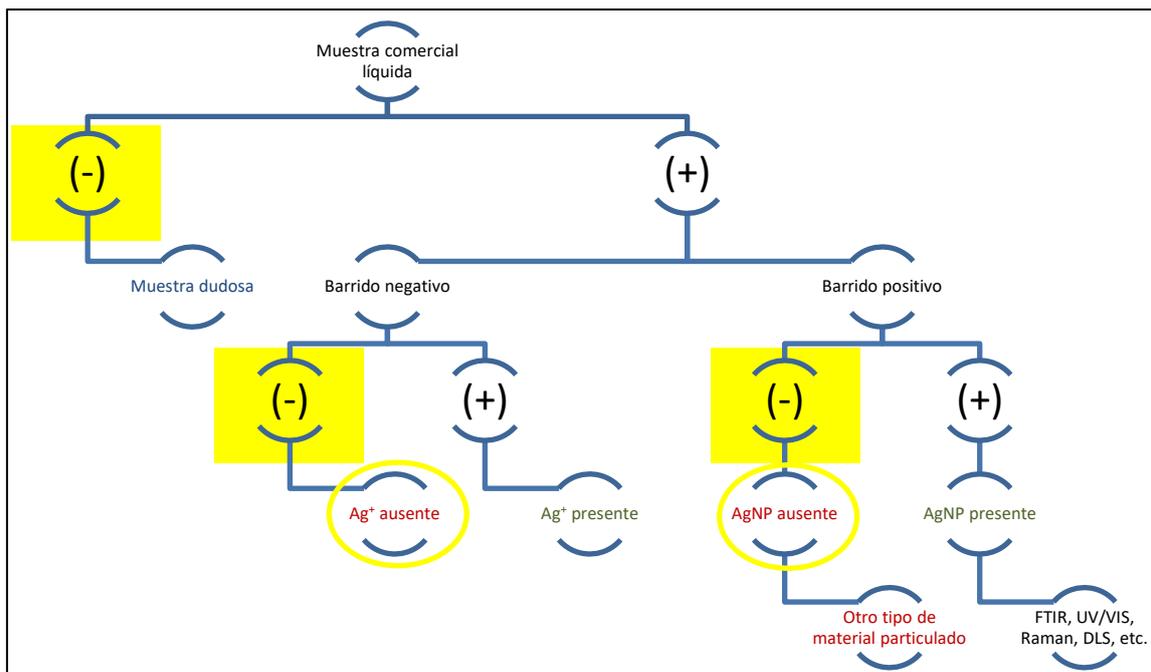


Figura 4.29. Protocolo propuesto para el análisis de la muestra comercial M3 que indica tener AgNPs.

4.6. Conclusiones

La cuantificación de AgNPs en productos comerciales constituye un desafío analítico mayor, que resulta imprescindible para el adecuado control de los productos comerciales. Los problemas que explican las dificultades existentes para este análisis son: i) gama de variables que afectan la concentración de las AgNPs y, como consecuencia directa de esto, ii) falta de estándares adecuados para la verificación de los procedimientos analíticos y/o la determinación de la recuperación a partir de diferentes matrices.

Los resultados obtenidos en esta Tesis se llevaron a cabo con los mejores materiales disponibles, y permitieron aplicar una gama de técnicas que apuntaban a diferentes propiedades, y la posibilidad que éstas resultaran aditivas con la concentración. Si bien muchas propiedades resultaron aditivas, una sola propiedad por sí sola no es suficiente para la descripción completa del

nanosistema en estudio. La propuesta de un protocolo que incluye la medida de estas propiedades nos permite concluir que la combinación del efecto Tyndall con las medidas electroquímicas aportan información importante para detectar fraudes comerciales. Ambas técnicas son descentralizables, y por lo tanto aptas para un barrido rápido de muestras, que puede hacerse *in situ*.

4.7. Bibliografía del Capítulo

- Aoki, K. J., Chen, J., & Wang, R. (2019). Stripped Charge of Ag Less than Deposited one Owing to Negative Capacitance Caused by Redox Reactions. *Electroanalysis*, 31(12), 2303–2310. <https://doi.org/10.1002/elan.201800873>
- Baalousha, M., Arkill, K. P., Romer, I., Palmer, R. E., & Lead, J. R. (2015). Transformations of citrate and Tween coated silver nanoparticles reacted with Na₂S. *Science of the Total Environment*, 502, 344–353. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.035>
- Botasini, S. (2021). Comparación del tamaño de nanopartículas de oro empleando diferentes técnicas y protocolos de medición. *Innotec*, 21, 10–24. <https://doi.org/10.26461/21.02>
- Botasini, S., Heijo, G., & Méndez, E. (2013). Toward decentralized analysis of mercury (II) in real samples. A critical review on nanotechnology-based methodologies. *Analytica Chimica Acta*, 800, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.07.067>
- Botasini, S., & Méndez, E. (2013). Silver nanoparticle aggregation not triggered by an ionic strength mechanism. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(4). <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1526-4>
- Brainina, K. Z., Galperin, L. G., Kiryuhina, T. Y., Galperin, A. L., Stozhko, N. Y., Murzakaev, A. M., & Timoshenkova, O. R. (2012). Silver nanoparticles electrooxidation: Theory and experiment. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 16(7), 2365–2372. <https://doi.org/10.1007/s10008-011-1583-5>
- Chen, W., Wang, H., Tang, H., Yang, C., & Li, Y. (2019). Unique Voltammetry of Silver Nanoparticles: From Single Particle to Aggregates. *Analytical Chemistry*, 91, 14188–14191. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03372>
- Chernousova, S., & Epple, M. (2013). Silver as antibacterial agent: Ion, nanoparticle, and metal. *Angewandte Chemie - International Edition*, 52(6), 1636–1653. <https://doi.org/10.1002/anie.201205923>
- Cloake, S. J., Toh, S., Lee, P. T., Salter, C., Johnston, C., & Compton, R. G. (2015). Anodic Stripping Voltammetry of Silver Nanoparticles: Aggregation Leads to Incomplete Stripping. *Chemistry Open*, 4, 22–26. <https://doi.org/10.1002/open.201402050>

- Duan, H., Cheng, Z., Xue, Y., Cui, Z., Yang, M., & Wang, S. (2021). Influences of nano-effect on electrochemical thermodynamics of metal nanoparticles electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 882, 115037. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.115037>
- Eckhardt, S., Brunetto, P. S., Gagnon, J., Priebe, M., Giese, B., & Fromm, K. M. (2013). Nanobio silver: Its interactions with peptides and bacteria, and its uses in medicine. *Chemical Reviews*, 113(7), 4708–4754. <https://doi.org/10.1021/cr300288v>
- Fagúndez, P., Botasini, S., Tosar, J. P., & Méndez, E. (2021). Systematic process evaluation of the conjugation of proteins to gold nanoparticles. *Heliyon*, 7(6). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07392>
- Giovanni, M., & Pumera, M. (2012). Size Dependant Electrochemical Behavior of Silver Nanoparticles with Sizes of 10, 20, 40, 80 and 107nm. *Electroanalysis*, 24(3), 615–617. <https://doi.org/10.1002/elan.201100690>
- Gmshinski, I. V., Khotimchenko, S. A., Popov, V. O., Dzantiev, B. B., Zherdev, A. V, Demin, V. F., & Buzulukov, Y. P. (2013). Nanomaterials and nanotechnologies: methods of analysis and control. *Russian Chemical Reviews*, 82(1), 48–76. <https://doi.org/10.1070/rc2013v082n01abeh004329>
- Hernández, D., Cepriá, G., Laborda, F., & Castillo, J. R. (2019). Detection and Determination of Released Ions in the Presence of Nanoparticles: Selectivity or Strategy? *Electroanalysis*, 31(2), 405–410. <https://doi.org/10.1002/elan.201800597>
- Ivanova, O. S., & Zamborini, F. P. (2010). Size-dependent electrochemical oxidation of silver nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 132(1), 70–72. <https://doi.org/10.1021/ja908780g>
- Kulthong, K., Srisung, S., Boonpavanitchakul, K., Kangwansupamonkon, W., & Maniratanachote, R. (2010). Determination of silver nanoparticle release from antibacterial fabrics into artificial sweat. *Particle and Fibre Toxicology*, 7, 2–10. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-8>
- Laborda, F. Jiménez-Lamana, J., Bolea, E. & Castillo, J.R. (2013). Critical considerations for the determination of nanoparticle number concentrations, size and number size distributions by single particle ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.*, 28, 1220-1232. <https://doi.org/10.1039/C3JA50100K>
- Miseljic, M., & Olsen, S. I. (2014). Life-cycle assessment of engineered nanomaterials: A literature review of assessment status. *Journal of Nanoparticle Research*, 16(6). <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2427-x>
- Mitrano, D. M., Motellier, S., Clavaguera, S., & Nowack, B. (2015). Review of nanomaterial aging and transformations through the life cycle of nano-enhanced products. *Environment International*, 77, 132–147. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.01.013>
- Molleman, B., & Hiemstra, T. (2018). Size and shape dependency of the surface energy of metallic nanoparticles: Unifying the atomic and thermodynamic approaches. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20(31), 20575–20587. <https://doi.org/10.1039/c8cp02346h>

- Navarro, J. R. G., & Werts, M. H. V. (2013). Resonant light scattering spectroscopy of gold, silver and gold-silver alloy nanoparticles and optical detection in microfluidic channels. *Analyst*, 138(2), 583–592. <https://doi.org/10.1039/c2an36135c>
- Ngamchuea, K., Batchelor-McAuley, C., Sokolov, S. V., & Compton, R. G. (2017). Dynamics of Silver Nanoparticles in Aqueous Solution in the Presence of Metal Ions. *Analytical Chemistry*, 89(19), 10208–10215. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01470>
- Paramelle, D., Sadovoy, A., Gorelik, S., Free, P., Hobley, J., & Fernig, D. G. (2014). A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. *Analyst*, 139(19), 4855–4861. <https://doi.org/10.1039/c4an00978a>
- Plieth, W. J. (1982). Electrochemical Properties of Small Metal Clusters and Their Role in Surface Enhanced Raman Scattering. *The Journal of Physical Chemistry*, 86(16), 3166–3170.
- Pourzahedi, L., & Eckelman, M. J. (2015). Environmental life cycle assessment of nanosilver-enabled bandages. *Environmental Science and Technology*, 49(1), 361–368. <https://doi.org/10.1021/es504655y>
- Rogers, K. R., Navratilova, J., Stefaniak, A., Bowers, L., Knepp, A. K., Al-Abed, S. R., Potter, P., Gitipour, A., Radwan, I., Nelson, C., & Bradham, K. D. (2018). Characterization of engineered nanoparticles in commercially available spray disinfectant products advertised to contain colloidal silver. *Science of the Total Environment*, 619–620, 1375–1384. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.195>
- Schindelin, J., Arganda-Carrera, I., Frise, E., Verena, K., Mark, L., Tobias, P., Stephan, P., Curtis, R., Stephan, S., Benjamin, S., Jean-Yves, T., Daniel, J. W., Volker, H., Kevin, E., Pavel, T., & Albert, C. (2012). Fiji - an Open platform for biological image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/doi:10.1038/nmeth.2019>.
- StatNano Project. (2023). *Nanotechnology Products Database*. Recuperado 13 de Octubre, 2023. <https://product.statnano.com/>
- Tanner, E. E. L., Tschulik, K., Tahany, R., Jurkschat, K., Batchelor-mcauley, C., & Compton, R. G. (2015). Nanoparticle Capping Agent Dynamics and Electron Transfer: Polymer-Gated Oxidation of Silver Nanoparticles. *The Journal of Chemical Physics C*, 119(32), 18808–18815. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b05789>
- Tulve, N. S., Stefaniak, A. B., Vance, M. E., Rogers, K., Mwilu, S., LeBouf, R. F., Schwegler-Berry, D., Willis, R., Thomas, T. A., & Marr, L. C. (2015). Characterization of silver nanoparticles in selected consumer products and its relevance for predicting children’s potential exposures. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 218(3), 345–357. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.02.002>
- Ward Jones, S. E., Campbell, F. W., Baron, R., Xiao, L., & Compton, R. G. (2008). Particle size and surface coverage effects in the stripping voltammetry of silver nanoparticles: Theory and experiment. *Journal of Physical Chemistry C*, 112(46), 17820–17827. <https://doi.org/10.1021/jp807093q>

- Xiao, W., Deng, Z., Huang, J., Huang, Z., Zhuang, M., Yuan, Y., Nie, J., & Zhang, Y. (2019). Highly Sensitive Colorimetric Detection of a Variety of Analytes via the Tyndall Effect. *Analytical Chemistry*, 91(23), 15114–15122. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03824>
- Yuan, K., Sun, Y., Liang, F., Pan, F., Hu, M., Hua, F., Yuan, Y., Nie, J., & Zhang, Y. (2022). colloidal silver nanoparticles for quantitative point- of-care detection of creatinine using a laser pointer pen and a smartphone. *RSC*, 12, 23379–23386. <https://doi.org/10.1039/d2ra03598g>

Capítulo 5. Consideraciones Finales y Perspectivas

La realidad es que en este s.XXI, no es la falta de metodologías analíticas lo que no nos permiten llegar en tiempo y forma a la detección de diferentes moléculas químicas y sus potenciales riesgos en los diferentes ecosistemas. Sin lugar a dudas, el monitoreo de sustancias peligrosas encuentra un escollo en los sistemas de alerta que disponemos. ¿Cómo podemos saber si un mamífero como una ballena o un pingüino de un ambiente prístino como puede ser la Antártida, no está amenazado por algún DE, si no tenemos un monitoreo sistemático por las aguas en las que se desplaza? ¿Cómo podemos saber si ciertas moléculas químicas que se están desarrollando cada día en el mundo, están presentes en el medio ambiente y en qué forma, si apenas podemos detectarlas en su estado natural?

En la presente Tesis, se buscó demostrar cómo a través de un conjunto de metodologías analíticas sencillas, económicas y a su vez sensibles, se puede generar un sistema analítico descentralizado. Esto incluyó algunos puntos relevantes, como la posibilidad que personas con una mínima preparación previa, pueda llevar adelante el análisis, como fue el monitoreo de plomo en los hogares mediante el método del “trapo húmedo” (*Dust Wipe Method*). Lo mismo para detectar AgNPs en productos comerciales mediante un análisis sencillo como lo es un puntero láser.

La descentralización mediante técnicas sencillas y rápidas, permite tener un mayor muestreo a un menor costo económico, lo que permite hacer un mejor seguimiento de moléculas químicas con potenciales riesgos de contaminación, permite también hacer un barrido más amplio de muestras, todo esto, claro está, teniendo a los métodos analíticos robustos como respaldo confirmatorio de aquellas muestras dudosas, pero sin la necesidad de tener un gran número de análisis, lo que no sólo impacta en lo económico, sino en los tiempos de análisis que implicarían.

Pensar en la descentralización como concepto de fortalecimiento de programas de seguimiento de diferentes tipos de contaminantes, tanto a nivel humano como medio ambiental, es una manera de pensar en ecosistemas más sustentables. Sin embargo, en esta Tesis también hemos hecho hincapié en la necesidad de contar con un estudio analítico profundo para validar estos métodos, que, por lo general, no arrojan un valor específico de la concentración del contaminante, sino que indican si el contaminante está dentro de los límites aceptables por las diferentes normas. Los dos DE estudiados en esta Tesis presentaban particularidades diferentes, pero en ambos casos estaba presente la necesidad de contar con procedimientos sencillos y económicos para poder hacer barridos muestrales amplios. En uno de los casos, las AgNPs, se presentaba un desafío nuevo: no contar con materiales de referencia para validar los estudios, lo que hace que los procedimientos desarrollados resulten complementarios para obtener una visión más completa del sistema analítico.

En suma, hemos estudiado dos ejemplos de DE emergentes, aportando metodologías descentralizables, que facilitan la inspección y relevamiento de un gran número de muestras. Entendemos que estos procedimientos pueden ser utilizados por los sistemas nacionales de control, como técnicas de barrido que conduzcan a una disminución importante de los costos de control.

Capítulo 6. Anexos

6.1. Anexo I. Publicaciones en revistas internacionales referadas y trabajos presentados en congresos y simposios.

Publicaciones.

- Ansin A., Galiotta G., Botasini S. & Méndez E. **2019**. Lead analysis in paints for high impact control in homes. *Analytical Methods*, 11, 4254-4259. <http://dx.doi.org/10.1039/c9ay01262a>

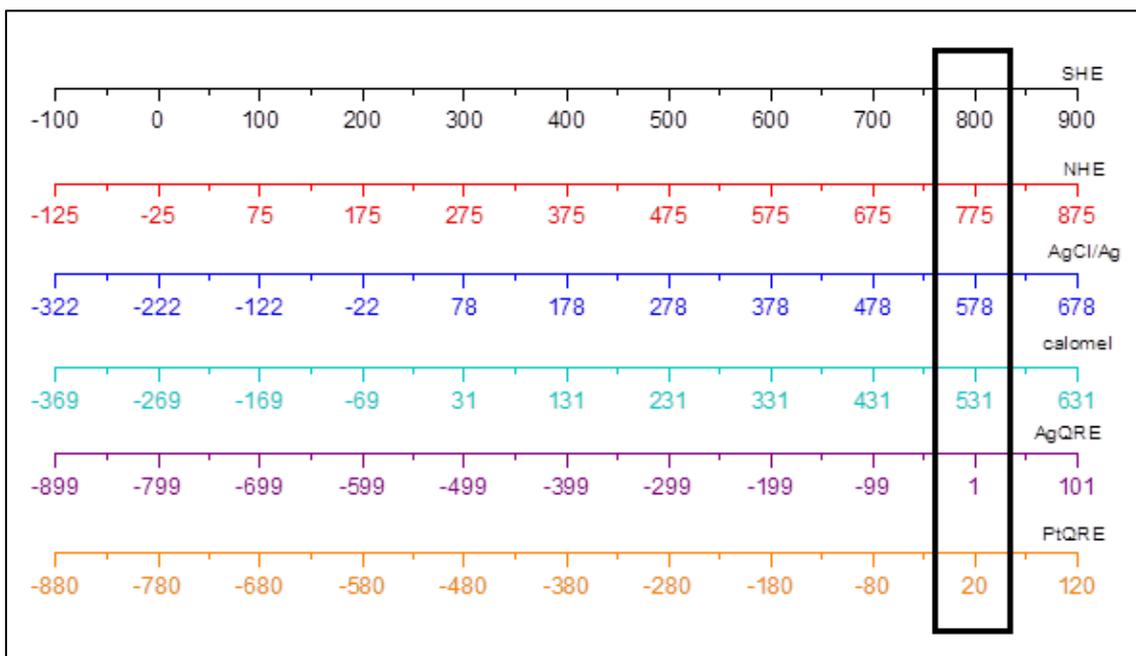
Trabajos presentados en congresos, simposios y jornadas.

- Ansin A., Galiotta G., Botasini S. & Méndez E. **2019**. Electrochemical and infrared analysis of lead in paints: a high impact control in homes. XX EuroAnalysis. Estambul, Turquía. Presentación Póster.
- Ansin A., Galiotta G., Botasini S. & Méndez E. **2019**. Preliminary insights into lead ions detection with rhodizonate-capped gold nanoparticles. XX EuroAnalysis. Estambul, Turquía. Presentación Póster.
- Ansin A., Galiotta G., Botasini S. & Méndez E. **2018**. Crecimiento anisotrópico de nanopartículas de oro triangulares inducido por iones Plomo (II). Primer Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia de Materiales. Hotel Palladium, Montevideo, Uruguay. Presentación Póster; p 36 en libro de resúmenes.
- Méndez E., Galiotta G. & Botasini S. **2018**. A general protocol to discriminate among silver ions, protein silver and silver nanoparticles in commercial products: quantitation with electrochemical techniques. Royal Society of Chemistry National Physics Laboratory Symposium, Nanoparticle concentration. Londres/Inglaterra. Presentación Póster.
- Ansin A.; Galiotta G., Botasini S. & Méndez E. **2017**. Citrate-capped gold nanoparticles for Pb(II) detection: The incidence of nanoparticle concentration. 5th Nano today Conference. Hawaii/USA. Presentación Póster
- Méndez E., Galiotta G. & Botasini S. **2017**. Voltammetric determination of silver nanoparticles in commercial liquid products. Gordon Research Conference: Environmental Nanotechnology. Stowe/USA. Presentación Póster.

- Galieta, G.; Botasini, S., Panizzolo, L. & Méndez, E. **2016**. Análisis de nanopartículas de Plata en productos comerciales. 4º Congreso de Química Analítica. Montevideo, Uruguay. Presentación Póster. Libro de Resúmenes p 154.

6.2. Anexo II. Comparación de potenciales de electrodos de referencia

Para comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los publicados en la literatura, se elaboró un esquema que permite la rápida transformación entre potenciales expresados en diferentes referencias.



6.3. Anexo III. Fotos monitoreo de plomo *in situ*, en barrios de Montevideo

Tipo de Vivienda Monitoreada



Valija con materiales para trabajo de campo



Forma de monitoro *in situ*



Inspección con XRF



6.4. Anexo IV. Propiedades ópticas de los estándares

Absorbancias						
Dilución	5nm	10nm	20nm	30nm	PVP 30	lipoico 30
0	1.8816	1.9184	1.7978	1.7468	1.5602	1.6635
1	1.1252	1.2967	1.4225	1.2059	1.3269	0.9805
2	0.5613	0.6744	0.7785	0.6218	0.7293	0.4858
3	0.2767	0.3305	0.3937	0.2981	0.3683	0.2432
4	0.1322	0.1675	0.1887	0.1498	0.183	0.1229
5	0.0634	0.0895	0.0972	0.0779	0.0976	0.0577
Lambda máxima						
Dilución	5nm	10nm	20nm	30nm	PVP 30	lipoico 30
0	404	390	393	404	396	410
1	402	392	396	405	400	412
2	402	391	395	405	400	411
3	401	391	395	405	400	411
4	400	390	394	405	400	411
5	400	390	394	405	400	411
Color espectral						
Dilución	5nm	10nm	20nm	30nm	PVP 30	lipoico 30
0	568	571	571	571	567	568
1	566	571	570	570	566	566
2	566	570	570	570	565	566
3	565	570	570	569	565	565
4	565	570	570	569	565	565
5	570	570	570	569	564	565
Saturación de color %						
Dilución	5nm	10nm	20nm	30nm	PVP 30	lipoico 30
0	55.4417	30.2201	33.8327	38.4547	43.8957	56.0038
1	34.122	17.7497	20.5848	23.6335	27.8094	37.1677
2	18.4916	9.086	11.5462	13.1696	15.913	21.435
3	9.1914	4.3197	5.956	6.5444	8.588	11.3185
4	4.3028	2.12	2.914	3.3498	4.531	5.9243
5	1.8222	1.079	1.499	1.7278	2.3878	2.9025

6.5. Anexo V. Propiedades electroquímicas de los estándares

Potencial de oxidación (V)		
Dilución*	50 nm	80 nm
0	0.17 ± 0.01	0.154 ± 0.005
1	0.13 ± 0.02	0.149 ± 0.006
2	0.11 ± 0.01	0.110 ± 0.009
3	0.100 ± 0.02	0.10 ± 0.01
Intensidad de pico de oxidación (µA)		
Dilución*	50 nm	80 nm
0	20 ± 4	13 ± 2
1	10 ± 4	9.2 ± 0.9
2	3.6 ± 1.3	2.9 ± 0.5
3	1.7 ± 0.2	1.6 ± 0.9
Carga de oxidación (µC)		
Dilución*	50 nm	80 nm
0	34 ± 4	28 ± 2
1	15 ± 8	17 ± 2
2	5 ± 1	6 ± 1
3	3.6 ± 0.3	3 ± 2

* Para los valores de concentración en diferentes unidades correspondientes a cada dilución, consultar Tabla 4.4.