



**Universidad
Zaragoza**

Trabajo Fin de Grado

Evaluación de los estados de oxidación de Ag y Ce en materiales nanoestructurados y muestras que hayan sido expuestas a los mismos. ¿Toxicidad o inocuidad?

Autor/es

Alejandro López Andrés

Director/es

Gemma Cepriá Pamplona

Facultad de Ciencias / Departamento de Química Analítica /
Laboratorios del Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores

2015

Índice.

I.	Resumen.....	1
II.	Objetivos.....	2
III.	Introducción y antecedentes.....	3-7
IV.	Parte experimental.....	8-13
	i. Técnica electroanalítica. Electroodos usados.....	8-9
	ii. Electrodo sin modificar.....	10-11
	iii. Electrodo modificado con L-cisteína.....	11-12
	iv. Electrodo modificado con Poly (8- Mercaptoquinolina).....	12-13
V.	Resultados y discusión.....	14-19
	i. Nanopartículas de 40 nanómetros.....	14-15
	a) Electrodo sin modificar.....	14
	b) Electrodo modificado con L-cisteína.....	14-15
	ii. Nanopartículas de 10 nanómetros.....	15-19
	a) Electrodo modificado con L-cisteína.....	15-18
	b) Electrodo modificado con Poly (8- Mercaptoquinolina).....	18-19
VI.	Conclusiones.....	20-24
	i. Nanopartículas de 40 nanómetros.....	20
	a) Electrodo sin modificar.....	20
	b) Electrodo modificado con L-cisteína.....	20
	ii. Nanopartículas de 10 nanómetros.....	20-24
	a) Electrodo modificado con L-cisteína.....	20-22
	b) Electrodo modificado con Poly (8- Mercaptoquinolina).....	22-24
VII.	Bibliografía.....	25-26

Aclarar que el trabajo se ha centrado exclusivamente en los estados de oxidación correspondientes a la Ag y no a los de Ce debido a sus múltiples usos en la vida cotidiana y a la incertidumbre en cuanto a su toxicidad. Se ha preferido ahondar en un mayor número de métodos posibles para su captación y caracterización así como realizar pruebas con nanopartículas de dos tamaños diferentes.

Resumen.

Versión en español

En la actualidad, las nanopartículas de plata son ampliamente utilizadas ya que exponen propiedades antibacterianas excepcionales que dan lugar a muchos usos potencialmente beneficiosos. Sin embargo, su abuso como bactericidas puede causar también la exposición no intencionada a organismos superiores, incluyendo a los seres humanos. Esto es preocupante ya que las nanopartículas, al contrario que sus homólogos macroscópicos, liberan iones Ag(I) más rápidamente por lo que pueden resultar mucho más tóxicas.

De este modo, se está fomentando la preocupación por su uso excesivo y el desarrollo de nuevos métodos para su detección y caracterización. Para tal fin, en este trabajo se ha optado por tres tipos de voltametría: lineal, cíclica y de pulso diferencial, empleando electrodos de grafito recubiertos con diferentes polímeros afines a la plata como son la L- cisteína y la Poly (8-Mercaptoquinolina). Quedarán reflejados tanto sus correspondientes procesos de polimerización como sus protocolos de trabajo así como diferentes pruebas realizados sobre los mismos como por ejemplo: si presentan afinidad únicamente a las nanopartículas y no a los iones Ag(I) y viceversa o una mayor afinidad por unas lo que convertiría a las otras en una problemática interferencia.

Versión en inglés

At present, nanoparticles of silver are widely used on account of they expose antibacterial exceptional properties that give room to many potentially beneficial uses. Nevertheless, his abuse as bactericidal can also cause the not meaningful exhibition to superior organisms, including the human beings. This is worrying because nanoparticles, unlike his macroscopic analogous, liberate ions Ag (I) more quickly so that they can turn out to be much more toxic.

In this way, the concern by his excessive use and the development of new methods for his detection and characterization are promoted. To that end, in this work three types of voltammetry have been chosen: linear, cyclical and of differential pulse, using graphite electrodes covered by different silver related polymers such as L-cysteine and Poly (8-Mercaptoquinoline). Their corresponding polymerization processes and working protocols will be reflected, as well as different tests performed on them as for example: if they show affinity only for the nanoparticles and not for the Ag(I) ions and vice versa or a higher affinity for some of them what would turn the others into a problematic interference.

Objetivos generales

1- Desarrollar las habilidades necesarias para desenvolverse en un trabajo experimental que requiera la necesidad de utilizar varios equipamientos poniendo en práctica los conocimientos adquiridos a lo largo de los estudios de grado y colaborar con los miembros de un equipo.

2- Llegar a ser consciente de las repercusiones medioambientales derivadas del uso de las tecnologías actuales en la vida cotidiana.

Estos objetivos genéricos se alcanzan persiguiendo los siguientes objetivos específicos

Objetivos específicos

1- Estudio bibliográfico para completar y ampliar en la medida de lo necesario los conocimientos adquiridos durante los estudios de grado que van a ser necesarios para comprender los resultados que se obtengan.

2- Seguir con sentido crítico un procedimiento sencillo para la detección de Ag(I) y Ag^0 .

4- Saber deducir conclusiones con toda la información recogida, con el estudio de los datos experimentales y de la bibliografía recogida.

Introducción y antecedentes.

La nanotecnología está muy presente en la mayor parte de los ámbitos de nuestra vida diaria. Uno de sus principales desarrollos se encuentra en el sector de la agricultura, necesitando involucrar casi todas las disciplinas tanto de las ciencias básicas y de la salud, como de las ingenierías asociadas. Se han llevado a cabo numerosos estudios, en los que se desarrollan herramientas para mejorar la capacidad de los cultivos en la absorción de los nutrientes del suelo, resistencia a las inclemencias del tiempo o las plagas, etc., permitiendo aumentar considerablemente las cosechas^[10]. Otra posibilidad en el avance de la agricultura es la creación de un nanoplaguicida, el cual impediría la germinación de la semillas de las plantas no deseadas las cuales serían atacadas por el pesticida creado a partir de nanopartículas^[11]. Hay una técnica novedosa que requiere de mención como es el Sistema de Transporte Coloidal (STC), que mediante la *globulización* del producto logra aumentar la eficiencia a la penetración en las plantas y un mayor recubrimiento del área donde se deben aplicar los diferentes tratamientos. De modo que se reducen las cantidades de residuos químicos en las cosechas, tales como fertilizantes, herbicidas, insecticidas, fungicidas hasta en un 40%, y por tanto también se disminuyen los gastos en la producción^[12].

Por otro lado, son cuantiosos los avances y estudios en la industria alimentaria que hacen referencia a la nanotecnología. Un estupendo ejemplo es la empresa FrieslandCampina con sede en Amersfoort (Países Bajos) que está estudiando fabricar productos con bajo contenido en grasa sin variar el gusto y la textura de los mismos^[13]. Otras empresas están intentando extraer moléculas activas de la leche con las que se podría fabricar fármacos para combatir la osteoporosis, o que permitan crear una leche mejor adaptada al metabolismo de los niños, mediante el aislamiento de la caseína. Incluso un grupo de científicos polacos ha conseguido extraer del calostro ovino, unas moléculas que son capaces de estabilizar la salud de los enfermos de Alzheimer^[10].

Ya hay proyectos que trabajan en la aplicación de nanopartículas que mediante fotocatalisis, permitan purificar las aguas, eliminando virus, bacterias y protozoos presentes en la misma, para el consumo humano y agrícola^[14]. Contra todo pronóstico, existen aplicaciones para ayudar a resolver problemas de nutrición en países en vía de desarrollo; un ejemplo de ello se llevó a cabo en Marruecos, en el que se agregó vitamina A, yodo y hierro a la sal común sin alterar sus propiedades alimenticias. Esto permitió que se redujese significativamente la anemia y el bocio en niños de edad escolar^[10].

Son muchas las áreas donde se han conseguido avances y en las que se está investigando. De entre todas ellas podemos destacar^[15] :

- Sensores capaces de detectar contaminación por bacterias.
- Prolongación del tiempo de almacenamiento de los alimentos.
- Mejora de la textura de los productos con pequeños cristales de tamaño nanométrico. Potenciación del sabor.
- Modificación de nanopartículas para desarrollar nuevos materiales de empaque.
- Nanoestructuración de productos funcionales, ingredientes y nutraceuticos: nanoemulsiones y nanoencapsulación.

- Nanosensores, nanobiosensores, nanochips de ADN (para medidas en proceso, producto o envase).

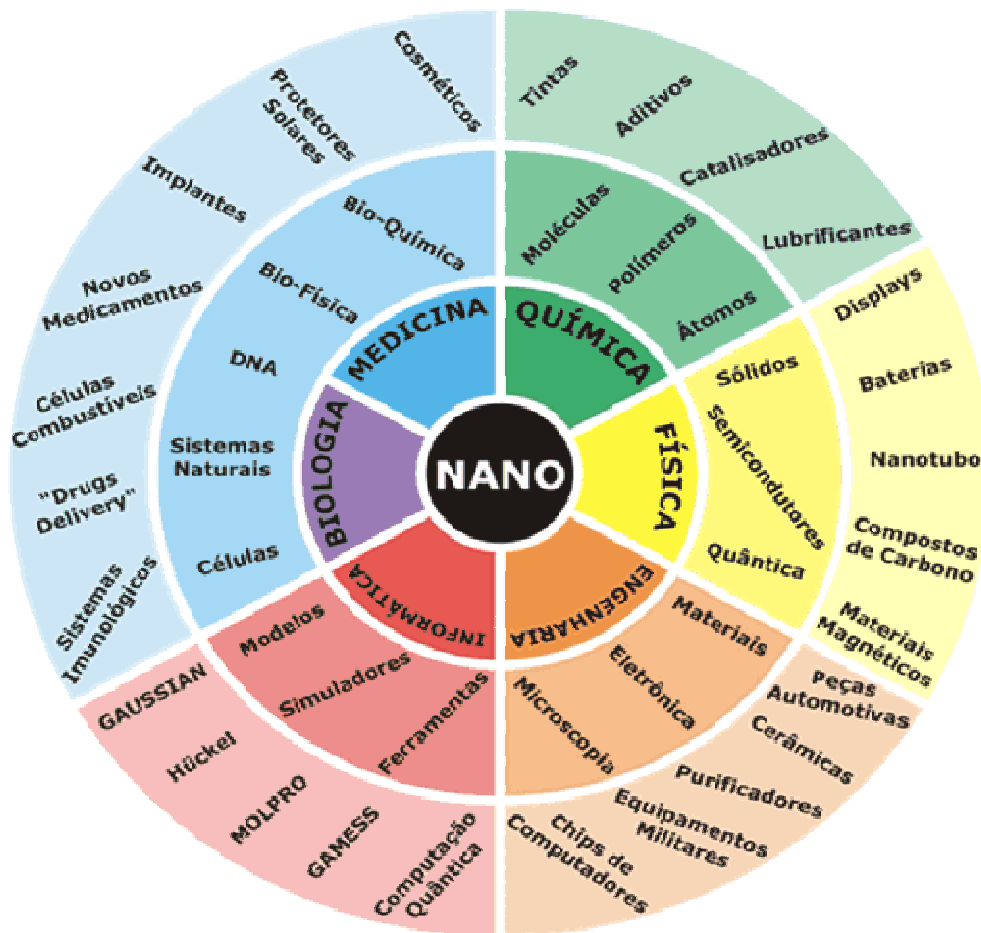


Figura 1: Posibles aplicaciones de la nanotecnología. Fuente: (<http://intcarlos.blogspot.com.es/2011/09/nanotecnologia.html>)

No obstante existe todavía un vacío legal que dificulta la investigación, así como una incertidumbre a nivel de toxicidad de las diferentes nanopartículas. Añadir que se precisa de una mayor información sobre la bioacumulación y los posibles efectos tóxicos de la inhalación o ingestión de nanopartículas manipuladas y sus repercusiones a largo plazo en la salud pública. En estado micro las partículas de plata tienen una reactividad diferente, en general más acusada, favoreciendo las reacciones químicas y con un potencial redox diferente.

Los nanomateriales de plata exponen propiedades antibacterianas excepcionales que dan lugar a muchos usos potencialmente beneficiosos. Sin embargo, el abuso de nanopartículas de plata como bactericidas puede causar también la exposición no intencionada a organismos superiores, incluyendo a los seres humanos. Esto es preocupante ya que las nanopartículas de plata parecen tener efectos tóxicos en organismos superiores. Mientras que las células eucariotas y procariotas son diferentes en muchos sentidos, la comprensión de los

mecanismos fundamentales que rigen la toxicidad de las nanopartículas de plata en células bacterianas podría esclarecer los efectos potenciales de éstas sobre orgánulos importantes como las mitocondrias^[9].

La membrana interior de una mitocondria y la membrana de una célula procariota son estructuralmente muy similares. La respiración tiene lugar en las células bacterianas de igual modo como en las mitocondrias de las eucariotas, incluyendo el transporte de electrones, ATP la síntesis, etc.. De la misma manera el ADN mitocondrial y el bacteriano son análogos, y la división de las mitocondrias es similar a la mitosis de las procariotas. En base a estas semejanzas, es supuesto que las nanopartículas de plata podrían afectar a las mitocondrias en organismos superiores por medio de mecanismos similares a los de las células bacterianas - asumiendo que puedan ser asimiladas por la célula^[9].

Se han reportado una gran cantidad de factores que poseen una cierta influencia en la toxicidad de las nanopartículas de plata como: el tamaño de partícula, la forma, la cristalinidad y la química superficial entre otros, además de factores exógenos como el pH, la fuerza iónica, la presencia de ligandos, cationes divalentes y macromoléculas^[9].

Por otro lado, uno de los mecanismos claves en los nanomateriales de plata para ejercer la actividad antibacteriana consiste en la liberación de iones de plata(I). Como el índice de liberación del ión, en general, es proporcional a la superficie de la partícula, las nanopartículas podrán liberar iones más rápidamente que otras más grandes y materiales macroscópicos^[9].

En un estudio realizado por el CSIC sobre los efectos de las nanopartículas de plata en las algas *Chlamydomonas reinhardtii*, se describe cómo con concentraciones suficientemente elevadas de plata iónica se conseguía inhibir por completo la actividad fotosintética de dichas algas. Esta inhibición parece ser el resultado del incremento del estrés oxidativo provocado por los iones de plata en las algas, y que afecta, por ejemplo, a la síntesis de proteínas, ADN o ARN^[16].

De este modo, debido a la toxicidad generada por la liberación por parte de las nanopartículas de grandes cantidades de iones plata, se está fomentando la preocupación por su uso excesivo y el desarrollo de nuevos métodos para su detección y caracterización. A este respecto, actualmente, existen 2 estrategias para dicho fin:

1. Separación del medio donde se encuentran ya sea natural o biológico para su posterior caracterización.

Los métodos para separar las nanopartículas del medio en que se encuentran suspendidas se basan en la filtración, la cromatografía de exclusión, la diálisis, ultracentrifugación, el fraccionamiento en campos de flujo y la movilidad electroforética. En la tabla 1 se presenta un resumen de dichos métodos:

Método	Mecanismo	Rango de tamaño	Técnica complementaria
Filtración	Fraccionamiento por tamaño	> 1 Kda	-
Micro- filtración	Membrana de exclusión por tamaño	100 nm - 1 μ m	SEM
Nano- filtración	Membrana de exclusión por tamaño	0,5 - 1 nm	TEM , AFM
Ultrafiltración de flujo cruzado (CFUC)	Membrana de exclusión por tamaño	1nm - 1 μ m	TEM, ICP-MS
Diálisis	Membrana de exclusión por tamaño	0,5 - 100 nm	TEM, SEM
Cromatografía de exclusión por tamaños (SEC)	Packed porous beads como fase estacionaria	0,5 - 10 nm	ICP-MS, ICP-OES
Ultracentrifugación (UC)	Aceleración por encima de 10E6 g	100 Da - 10 GDa	SET, TEM, EDS, XRF, ICP-MS, ICP-OES
Fraccionamiento de campo de flujo (FFF)	Separación física en un tubo abierto basada en la aplicación de un campo	1 nm - 1 μ m	ICP-MS, ICP-OES
Movilidad electroforética (EM)	Distribución de tamaño- carga a lo largo de un gradiente	3 nm - 1 μ m	ICP-MS, ICP-OES

Tabla 1: Distintas formas de separar las nanopartículas del medio en que se encuentran atendiendo a las diferencias de tamaños. extraída de la referencia ^[5]

También hay que destacar el uso de otras técnicas de separación como la extracción líquido-líquido o en fase sólida y la electroforesis capilar^[6].

2. Caracterización de las nanopartículas directamente en el medio en el que se encuentran.

Presenta dos ventajas frente a la anterior: ahorro del paso de la separación y la posibilidad de observar las nanopartículas directamente en el medio en el que se encuentran pudiéndose ver de este modo la interacción entre ambos. A continuación se exponen algunas de las técnicas más empleadas dentro de este apartado:

- **Single particle ICP- MS=** La ionización se producirá en el ICP y la detección en el espectrómetro de masas. Es una técnica muy útil con nanopartículas ya que las señales de Ag^0 y Ag^+ están perfectamente diferenciadas. Añadir que la señal de las nanopartículas dependerá del tamaño de las mismas[8].

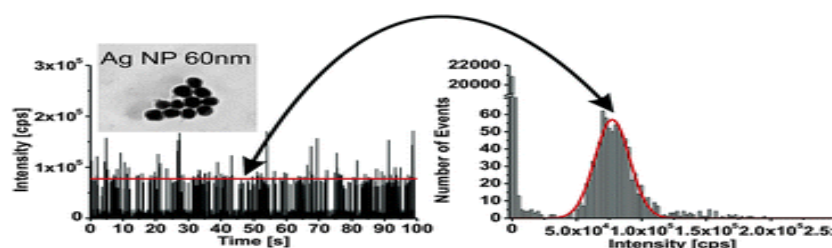


Figura 2: Ejemplo de voltagrama empleando la técnica single particle ICP-MS extraído de la referencia ^[17].

- **Nanoparticle Collision:** Posee un requisito y es que el electrodo debe ser cien veces mayor que las nanopartículas que se van a detectar. El proceso está basado en que de forma eventual una nanopartícula chocará con la superficie del electrodo mantenido a un potencial adecuado frente a un electrodo de referencia, oxidándose y produciendo un aumento brusco de la intensidad de la corriente (aparición de un pico). La señal obtenida dependerá del tamaño de la nanopartícula y el número de picos de la cantidad de nanopartículas^[7]. En este caso también se puede distinguir entre la Ag^0 y Ag(I) ya que sólo Ag^0 produciría señal.

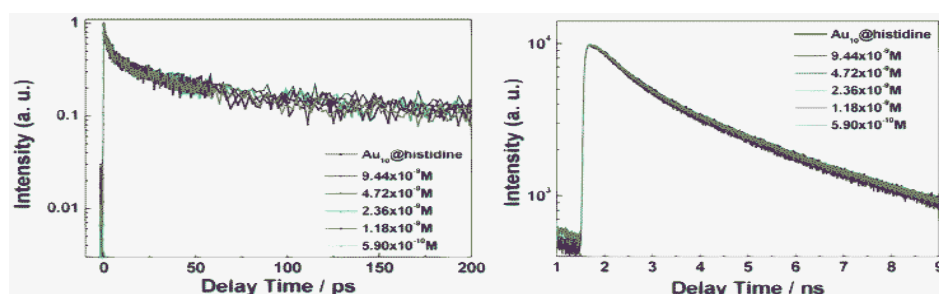


Figura 3: Ejemplo de voltograma empleando la técnica de Nanoparticle Collision. Fuente:

<https://www.google.es/search?q=nanoparticle+collision+technique>

- **Sticky electrodes :** Se trata de electrodos de grafito recubiertos con diferentes polímeros que muestran cierta afinidad por las nanopartículas de forma selectiva frente a Ag(I) , permitiendo la diferenciación de ambas especies. Este va a ser el método utilizado para el trabajo fin de grado y se ha optado por dos polímeros: la L-cisteína^[1] y la Poly (8-Mercaptoquinolina), cada uno con sus diferentes sensibilidades, procesos de polimerización y protocolos de trabajo los cuales serán explicados con más detalle más adelante.

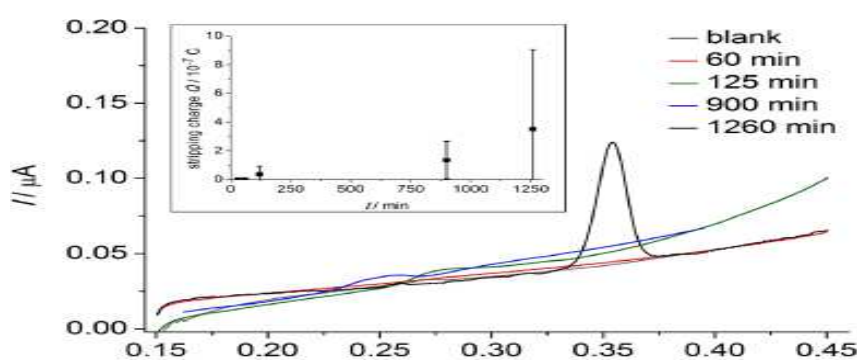


Figura 4: Ejemplo de voltograma empleando los Sticky electrodes extraído de la referencia ^[1].

Como añadido decir que, en la actualidad, se han desarrollado otras dos técnicas muy novedosas basadas en la dispersión de la luz como son: Dynamic Light Scattering y el Nanoparticle Tracking Analysis.

Parte experimental.

Técnica electroanalítica. Electroodos usados y mantenimiento de los mismos.

La técnica empleada fundamentalmente va a ser la voltamperometría. Ofrece varias ventajas por encima del resto de los métodos analíticos. Pocas interferencias, puede ser selectiva, no requiere el uso de reactivos peligrosos, es robusta, la instrumentación es sencilla y de fácil manejo, es rápida y económica. Por ello, en los últimos tiempos estas técnicas se postulan como una opción de gran interés frente a otras técnicas más costosas y que requieren un nivel de formación muy alto como la microscopía electrónica. En cualquier caso esto no supone una sustitución, sino un plus que permita resolver los problemas de forma más rápida y sencilla, obteniéndose más información.

Las técnicas voltamperométricas tienen la posibilidad única de distinguir los diversos estados de oxidación que pueden afectar a la reactividad y la toxicología de una sustancia. Fundamentalmente, el método se basa en la disposición de tres electrodos, uno de referencia con un potencial conocido y constante con el tiempo que en nuestro caso va a ser Ag/AgCl/NaCl 3 M, un auxiliar o también llamado contraelectrodo de Platino, y uno de trabajo, en el caso del presente trabajo, de grafito vitrificado de 2,7 mm de diámetro. Éstos al trabajar en conjunto pueden realizar una medida ajustada del potencial de una celda con respecto a un valor de referencia. Las medidas se han llevado a cabo en un potenciostato marca Autolab (Metrohm Autolab B.V., Holanda) con ayuda de una jaula de Faraday para evitar las interferencias electromagnéticas.

El electrodo de trabajo antes de su uso debe someterse a un protocolo de limpieza que debe seguirse siempre de la misma manera:

- Lavado previo con agua MilliQ.
- Sobre una base se verterán 2-3 gotas de una disolución de Albúmina y sin forzar demasiado se frota el electrodo sobre la misma describiendo un movimiento en sentido horario y antihorario.
- Lavado posterior con agua MilliQ para eliminar los restos de la disolución de Albúmina.
- El electrodo se coloca en un vaso junto con una pequeña cantidad de agua MilliQ y se lleva al sonicador durante aproximadamente unos 3 minutos.

La sonicación consiste en que una corriente eléctrica transmite su energía a un sistema mecánico que la convertirá en vibraciones de alta intensidad que generan ondas de ultrasonido. Los ultrasonidos generan, a su vez, vibraciones en el material objetivo. Si contiene líquidos, se generarán millones de burbujas microscópicas, las cuales sufren rapidísimos procesos de expansión y colapso que pueden transmitir su energía a otros materiales. Añadir que esta técnica también se utiliza de modo habitual para dispersar uniformemente las nanopartículas en los líquidos.

El electrodo de referencia se guarda en una disolución de NaCl 3M, que es el mismo electrolito con el que está relleno. Antes de introducirse en la celda electroquímica se lava con agua MilliQ y se seca suavemente con un papel de laboratorio. Por su parte, el electrodo auxiliar, se lava con agua MilliQ antes de ser usado y se guarda limpio y seco.

En el laboratorio se dispone de dos electrodos de grafito diferentes por lo que el primer paso va a ser la elección del mismo para lo cual, se realizará una comparativa empleando una disolución patrón de hexacianoferrato Fe(III) . Se elegirá aquel electrodo que ofrezca el voltagrama más cercano a una situación ideal, es decir, que el potencial sea próximo al potencial redox estándar y el proceso de intercambio de carga sea por tanto rápido. Una superficie irregular o dañada, daría lugar a un voltagrama alejado de esta situación. Tanto el procedimiento como los resultados de la prueba se encuentran en el Anexo 1.

Para realizar las distintas medidas a lo largo del trabajo se irán escribiendo los métodos correspondientes en el programa de ordenador NOVA. Para este caso del hexacianoferrato se empleará la técnica de **voltametría cíclica**. Éste tipo en concreto, consiste en variar de una manera cíclica el potencial de un electrodo estacionario inmerso en una solución en reposo y medir la corriente resultante. La señal de excitación es un barrido de potencial lineal con una onda de forma triangular. Las velocidades de barrido simétricas triangulares pueden variar desde unos cuantos milivoltios por segundo hasta cientos de voltios por segundo. Esta señal de excitación triangular de potencial barre el potencial del electrodo de trabajo en dirección de ida y vuelta entre dos valores designados. El triángulo regresa a la misma velocidad y permite la visualización de un voltamperograma completo con las formas de las ondas anódicas (oxidación) y catódicas (reducción), una sobre la otra como se muestra en la figura 5. La corriente en el electrodo de trabajo se mide en condiciones de difusión controlada y de transferencia de masa.

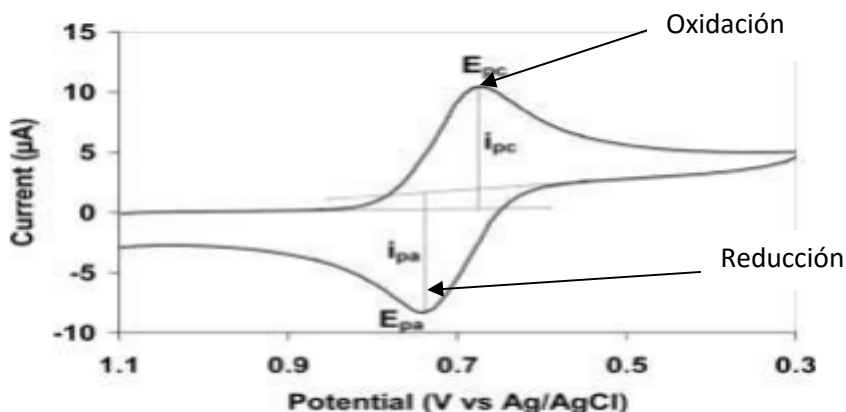


Figura 5: Ejemplo típico empleando la técnica de la voltametría cíclica. Quedan reflejados los picos de oxidación y reducción.

Como bien se ha mencionado en la introducción, se va a trabajar con dos polímeros: el de L-cisteína y el MQ los cuales, van a requerir de un proceso de polimerización totalmente diferenciado. No obstante, para la demostración de la afinidad de los sticky electrodes por las nanopartículas de plata y así poder comparar los resultados obtenidos, se realizó un estudio adicional con el electrodo de grafito sin modificar.

Electrodo sin modificar

Todas las medidas se llevaron a cabo empleando la técnica de la **voltametría de barrido lineal**. En este tipo en concreto, se aplica al electrodo de trabajo una función potencial que varía linealmente con el tiempo según la siguiente ecuación:

$$E = E_i + vt$$

Donde :

E_i = potencial inicial; v = Velocidad de barrido del potencial.

La función potencial aplicada al electrodo de trabajo es en forma de rampa fig.6a), la cual cambia relativamente rápido (> 10 mV/s), midiéndose la corriente resultante como una función del potencial aplicado fig.6b). El sistema es estático, siendo el transporte de masa resultado de un proceso difusional.

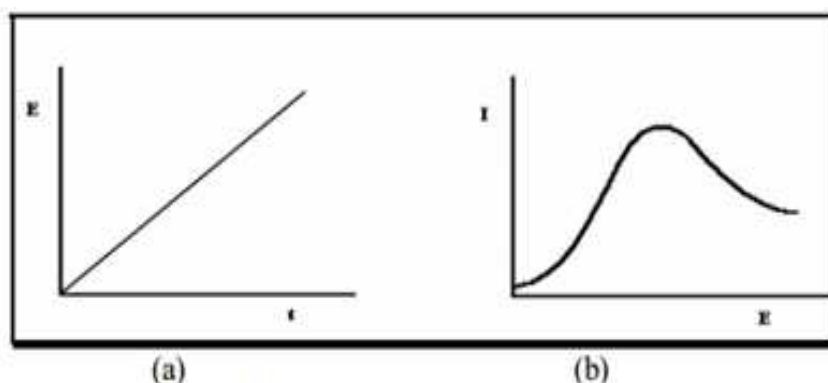


Figura. 6. - a) Función de Onda Aplicada. b) Respuesta a la perturbación.

El protocolo a seguir para realizar las mediciones será el siguiente:

- Lavar el electrodo con una gran cantidad de agua MiliQ.
- Sumergirlo en la disolución de medida durante 15 minutos haciéndole pasar una corriente de nitrógeno para agitar la disolución y evitar el contacto de las nanopartículas de plata con el oxígeno durante la experiencia.
- Lavado nuevamente del electrodo de trabajo con abundante agua MiliQ. El secado se realizará por los bordes evitando tocar la parte superior.
- Introducción del electrodo en la celda electroquímica (llena con una disolución de perclorato 0,1 M) y posterior medida. Se eligió perclorato ya que este ión no interacciona con las especies de plata y es el recomendado en la bibliografía^[1]

El programa empleado para este apartado se muestra en la tabla 2.

Tipo	Voltametría lineal
Nombre	Alex
Set potential (V)	0,15
Set cell	On
Wait time (s)	0
Optimize current range	5
LSV staircase	[0.150, 0.450, 0.020]
Start potential (V)	0,15
Stop potential (V)	0,45
Step potential (V)	0,00244
Scan rate (V/S)	0,02

Tabla 2: Programa Alex. Diversos parámetros introducidos en el NOVA para su correcto desempeño.

Electrodo modificado con L-cisteína

El proceso de polimerización del electrodo se encuentra recogido en el Anexo 2. Todas las medidas con el polímero de L-cisteína encaminadas a la detección de las nanopartículas de plata se realizarán con la técnica de la **voltametría de barrido lineal**. Hay dos programas principales empleados para este ámbito: el primero " Alex Cisteína" orientado para las disoluciones con nanopartículas de plata y el " Alex Cisteína CP" empleado para las disoluciones con Ag(I). La diferencia principal entre ambos es que este último incluye un proceso de pretratamiento de 90 segundos donde se produce una reducción de la Ag(I) para luego ser oxidada y observar de esta forma el pico o señal de oxidación en el voltagrama. En la tabla 3 se presentan las características más destacadas de ambos :

Tipo	Voltametría lineal	Tipo	Voltametría lineal
Nombre	Alex cisteína	Nombre	Alex cisteína CP
Set potential (V)	0,1	Set potential (V)	-0,1
Set cell	On	Set cell	On
Wait time (s)	0	Wait time (s)	90
Optimize current range	5	Optimize current range	5
LSV staircase	[0.100, 0.600, 0.020]	LSV staircase	[-0.100, 0.600, 0.020]
Start potential (V)	0,1	Start potential (V)	-0,1
Stop potential (V)	0,6	Stop potential (V)	0,6
Step potential (V)	0,00244	Step potential (V)	0,00244
Scan rate (V/S)	0,02	Scan rate (V/S)	0,02

Tabla 3: Programas Alex cisteína a la izquierda y Alex cisteína CP a la derecha. Diversos parámetros introducidos en el NOVA para su correcto desempeño.

El protocolo a seguir para realizar las mediciones será el mismo que para el electrodo sin modificar poniendo una mayor atención en la etapa de secado del electrodo para no afectar de esta forma al polímero.

Electrodo modificado con Poly (8- Mercaptoquinolina)

El proceso de polimerización del electrodo así como una prueba de eficacia del mismo se encuentran recogidos en el Anexo 3. Como en el caso del polímero de L-cisteína, el electrodo se sumerge en la disolución que contiene la plata durante 15 minutos, se lava y se lleva a la celda electroquímica. En esta ocasión, el electrolito soporte es una disolución de ácido nítrico 0,10 M, que además de facilitar la conducción eléctrica favorece la formación de complejos y pares iónicos con Ag(I) y por tanto ayuda a la oxidación de Ag(0) \rightarrow Ag(I) en la etapa de redisolución^[19].

Todas las medidas con este tipo de polímero se realizarán empleando la técnica de la **voltametría de pulso diferencial** según la cual, conforme variamos el potencial, el electrodo se va rodeando de cargas ya sean positivas o negativas independientemente de si estamos oxidando o reduciendo. Como ya se sabe, cuando se ponen en contacto dos capas cargadas de signo opuesto se crea un condensador, el cual permitirá el paso de la corriente cuando se carga completamente. Por su parte, la intensidad será la suma del condensador formado junto con la del analito:

$$i = i_{ccc} + i_{analito}$$

Cuando no hay analito $\rightarrow i_{analito} = 0$, la $i = i_{ccc}$ dependerá exclusivamente del condensador. Normalmente este valor será elevado por lo que el límite de detección también lo será. Habitualmente solemos trabajar con muy poca cantidad de nanopartículas de plata lo que implica que $i_{ccc} \gg i_{analito}$ indicando que no podríamos medirlas y su señal no aparecerá ya que su intensidad es función de la concentración. Una posible solución sería trabajar a un tiempo en el que la i_{ccc} fuese muy pequeña y de esta forma poder desecharla quedándonos finalmente $i = i_{analito}$. Como resultado, el límite de detección disminuiría hasta el punto de poder medir los picos de las nanopartículas. Ésto se conseguirá con la voltametría de pulso diferencial. En esta técnica, la forma de la onda en la señal de excitación, consiste en una serie de pulsos a manera de escalera, donde el potencial de base aumenta gradualmente en pequeños intervalos entre 10 y 100 mV. La corriente resultante del proceso electroquímico se mide justo antes de la aplicación del pulso y al final de la aplicación del mismo. Ese será el momento explicado anteriormente donde se cumple que $i = i_{analito}$ y como resultado se logra una alta sensibilidad y límites de detección entre $1 \cdot 10^{-7}$ y 10^{-8} M.

Para un mejor entendimiento, se presenta un ejemplo de este tipo de voltametría en la figura 7.

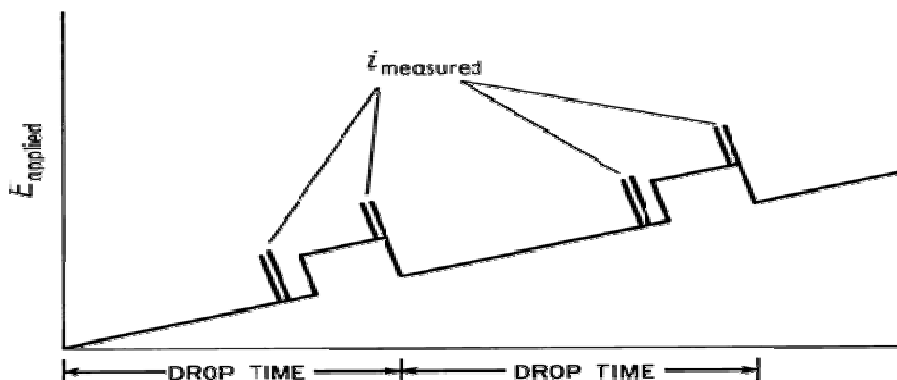


Figura 7: Ejemplo de voltagrama utilizando la voltametría de pulso diferencial en el cual se muestran los momentos exactos para la medición de la corriente resultante del proceso electródico.

Para la realización de esta parte, se emplearon dos programas los cuales se diferencian principalmente en la incorporación de una etapa de deposición de 120 segundos para el caso de la Ag(I). Los parámetros utilizados en ambos dos se muestran en la tabla 4.

Tipo	Pulso diferencial	Tipo	Pulso diferencial
Nombre	PD Ag+	Nombre	PD nAg
Conditional potential (V)	-0,55	Conditional potential (V)	0
Set cell	On	Set cell	On
Conditioning time (s)	120	Conditioning time (s)	0
Equilibration time	0	Equilibration time	0
Optimize current range	5	Optimize current range	5
Initial Potential (V)	-0,1	Initial Potential (V)	-0,25
End potential (V)	0,3	End potential (V)	0,3
Step potential (V)	0,001	Step potential (V)	0,001
Modulation amplitude (V)	0,05	Modulation amplitude (V)	0,05
Modulation time (s)	0,05	Modulation time (s)	0,05
Interval time (s)	0,1	Interval time (s)	0,1
Estimated number of points	410	Estimated number of points	560
Scan rate (V/s)	0,01	Scan rate (V/s)	0,01

Tabla 4: Programas PD Ag+ a la izquierda y PD nAg a la derecha. Diversos parámetros introducidos en el NOVA para su correcto desempeño.

Resultados y discusión.

A lo largo del trabajo se han empleado nanopartículas de dos tamaños diferentes : 40 y 10 nanómetros.

1. Nanopartículas de 40 nanómetros.

Electrodo sin modificar

Se preparó una disolución utilizando nanopartículas de 40 nanómetros a una concentración de 0,5 mg/L enrasando a 25 ml con perclorato 0,1 M. Para su medida fue utilizado el programa Alex (Tabla 2). En el caso de las dos primeras medidas se siguió el protocolo establecido en la parte instrumental sin embargo, para la última, se prefirió por dejar el electrodo sumergido en la disolución de medida el doble de tiempo (30 minutos). No se obtiene señal (voltageogramas recogidos en Anexo 4.a). Debido a esto, se optó por la preparación de otra disolución de nanopartículas de 40 nanómetros pero esta vez más concentrada --> 1 mg/L enrasando a 25 ml con perclorato 0,1 M y empleando el mismo programa Alex (Tabla 2). De nuevo, no se obtiene señal (voltageogramas recogidos en Anexo 4.b).

Electrodo con polímero de cisteína

Para solventar los malos resultados obtenidos anteriormente, se escoge la cisteína para la modificación electroquímica del electrodo GC debido a su alta afinidad a la $Ag^{[18]}$. Se repite el mismo experimento con la disolución de NPs en una concentración de 1 mg/L enrasando a 25 ml con perclorato 0,1 M. Para su medida fue utilizado el programa Alex Cisteína (Tabla 3). No se obtiene señal (voltageogramas recogidos en Anexo 4.c). En este caso, a diferencia de los anteriores, los resultados no coinciden con los de la bibliografía^[1]. A pesar de estar empleando la cisteína para la captación de las nanopartículas no se observa ningún pico de oxidación. Sí que es verdad que en el apartado bibliográfico^[1] los tiempos de inmersión en la disolución de medida son más largos hasta 900 minutos, sin embargo con 30 minutos ya se puede observar señal lo que nos lleva a pensar de que está teniendo lugar otro proceso.

Una de las opciones que podrían esclarecer lo que realmente está pasando es que los iones de $Ag(I)$ están ocupando los centros activos de la cisteína por lo que para asegurarse, se prepara una nueva disolución de medida de 1 mg/L de $Ag(I)$ (se parte de una disolución patrón de $Ag(I)$ de 1000 mg/L) enrasando a 25 ml con perclorato. El protocolo de trabajo será el mismo salvo que se empleará el programa Alex cisteína CP (Tabla 3). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5. Consultar Anexo 4.d para voltageograma.

Disolución de Ag^+ (Barrido Lineal)

Concentración de 1 mg/L

1º polímero

Tiempo	Posición (Voltios)	Altura (Amperios)	Área (Culombios)
15 min	0,247	8,96E-07	3,56E-08

Tabla 5: Valores de posición, altura y área relativos a una disolución de $Ag(I)$ en una concentración de 1 mg/L empleando el programa Alex cisteína CP.

El electrodo se vuelve a polimerizar con cisteína y se repite la misma experiencia con la disolución de nanopartículas de Ag de 1 mg/L en 25 ml de perclorato pero esta vez empleando el programa Alex cisteína CP (Tabla 3) para comprobar si con la etapa de pretratamiento se

observa señal. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6. Consultar Anexo 4.e para el voltagrama.

Nanopartículas de 40 nm (Barrido Lineal)

Concentración de 1 mg/L

2º polímero

Tiempo	Posición (Voltios)	Altura (Amperios)	Área (Culombios)
15 min	0,20279	2,47E-07	1,92E-08

Tabla 6: Valores de posición, altura y área relativos a nanopartículas de 40 nm en una concentración de 1 mg/L empleando el programa Alex cisteína CP.

De esta forma aparece el pico de oxidación. En los días posteriores se continuó con el estudio, sin embargo, con ninguno de los programas correspondientes a la Tabla 3 se observó ninguna señal lo que nos llevó a pensar de que las nanopartículas de 40 nm se encontraban dañadas por lo que se optó por la utilización de las de 10 nm para el resto del trabajo.

2. Nanopartículas de 10 nanómetros

Electrodo con polímero de cisteína

Con las nuevas nanopartículas de 10 nm se volvió a repetir la misma experiencia que con las de 40 nm para una disolución de 1 mg/L en 25 ml de perclorato empleando el programa Alex cisteína (Tabla 3). No se obtiene señal (voltagramas recogidos en Anexo 5.a). Debido a esto, se opta por preparar una nueva disolución de Ag NPs de 1 mg/L pero esta vez, el electrodo se mantuvo inmerso en la disolución por 5 y 24 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7. Remarcar que para todos ellos se ha empleado el programa Alex cisteína CP (Tabla 3).

Nanopartículas de 10 nm (Barrido Lineal)

Concentración de 1 mg/L

3º Polímero

Tiempo	Posición (Voltios)	Altura (Amperios)	Área (Culombios)
5 horas	0,215	5,17E-08	3,13E-09
24 horas	0,2174	8,20E-08	5,08E-09

Tabla 7: Valores de posición, altura y área relativos a una disolución de Ag NPs con una concentración de 1 mg/L empleando el programa Alex cisteína CP.

En la figura 8 se muestran los voltagramas relativos a las medidas de 5 y 24 horas junto con el correspondiente al de las Ag NPs de 40 nm (Tabla 6) y así poder realizar su comparación.

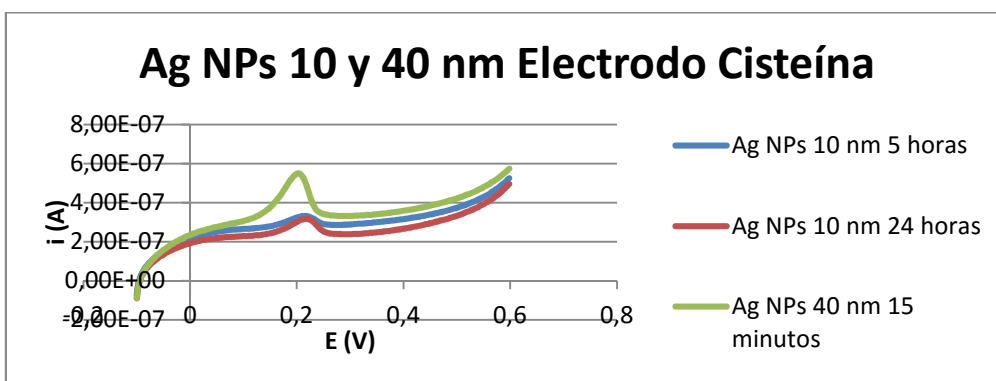


Figura 8: Voltagramas correspondientes a disoluciones de Ag NPs de 10 y 40 nm con una concentración de 1 mg/L para tiempos de 5 horas, 24 horas y 15 minutos empleando el programa Alex Cisteína CP con el electrodo B modificado con cisteína.

Siguiendo con todo lo anterior, se va a realizar un estudio con un nuevo polímero para ver de qué forma afectan concentraciones crecientes de nanopartículas de 1, 2, 3, 4 mg/L en disoluciones competitivas junto con una concentración fija de Ag (I) 1 mg/L y también concentraciones crecientes de Ag (I) 2, 3 y 4 mg/L con una fija de nAg 2 mg/L, para lo cual primeramente se prepara una disolución de Ag(I) 1 mg/L que nos servirá de referencia (Voltagramas recogidos en el Anexo 5.b). A continuación se van a preparar las disoluciones competitivas de Ag(I) y Ag NPs. Las medidas se realizará por triplicado cada una de ellas por un tiempo de 15 minutos. Señalar que partir de ahora se va a optar por elaborar las disoluciones de medida con tampon $H_2PO_4^- / H_2PO_4^{2-}$ A pH 7. De esta forma, nos aseguraremos de que el PH siempre va a ser 7. Lo que ocurre con el perclorato es que su PH 7 podría no estarse manteniendo ya que cuando viene la Ag(0) a reaccionar con los azufres de la cisteína se liberan iones H^+ los cuales pueden adificar el medio en la zona cercana al electrodo lo que influiría en la señal medida. Se van a ir reflejando cada una de las medidas obtenidas para sus correspondientes disoluciones y al final se elaborará una gráfica con todas ellas para su mejor visualización y comparación. En la tabla 8 únicamente se muestran los resultados obtenidos con el programa Alex Cisteína CP (Tabla 3) ya que con el Alex Cisteína no se consiguió ninguno.

		Posición (V)	Altura (A)	Área (C)
Disolución de Ag+ Concentración de 1 mg/L	Media	2,15E-01	1,33E-06	1,17E-07
	Desvest	8,43E-03	2,15E-08	7,38E-09
	RSD	3,92E-02	1,61E-02	6,29E-02
	CV (%)	3,92E+00	1,61E+00	6,29E+00
	Varianza	7,11E-05	4,60E-16	5,45E-17
NPs de 10 nm y Disolución de Ag+ Concentración 1 mg/L Ag+ y 1 mg/L nAg	Media	2,02E-01	9,91E-07	9,51E-08
	Desvest	1,36E-03	4,64E-08	1,11E-08
	RSD	6,72E-03	4,69E-02	1,16E-01
	CV (%)	6,72E-01	4,69E+00	1,16E+01
	Varianza	1,84E-06	2,15E-15	1,23E-16
NPs de 10 nm y Disolución de Ag+ Concentración 1 mg/L Ag+ y 2 mg/L nAg	Media	2,26E-01	1,02E-06	7,23E-08
	Desvest	9,86E-03	1,12E-07	2,39E-09
	RSD	4,31E-02	1,10E-01	3,30E-02
	CV (%)	4,31E+00	1,10E+01	3,30E+00
	Varianza	9,72E-05	1,25E-14	5,69E-18
NPs de 10 nm y Disolución de Ag+ Concentración 1 mg/L Ag+ y 3 mg/L nAg	Media	2,30E-01	1,21E-06	9,97E-08
	Desvest	3,72E-03	8,37E-08	1,23E-08
	RSD	1,61E-02	6,89E-02	1,23E-01
	CV (%)	1,61E+00	6,89E+00	1,23E+01
	Varianza	1,38E-05	7,00E-15	1,51E-16
NPs de 10 nm y Disolución de Ag+ Concentración 1 mg/L Ag+ y 4 mg/L nAg	Media	1,65E-01	2,14E-06	2,70E-07
	Desvest	7,46E-03	1,30E-07	1,25E-08
	RSD	4,51E-02	6,09E-02	4,62E-02
	CV (%)	4,51E+00	6,09E+00	4,62E+00
	Varianza	5,57E-05	1,70E-14	1,55E-16

Tabla 8: Valores de posición, altura y área relativos a disoluciones competitivas con concentraciones crecientes de Ag NPs y una fija de Ag(I) usando el programa Alex cisteína CP.

Los voltagramas correspondientes a las medidas se muestran en la figura 9.

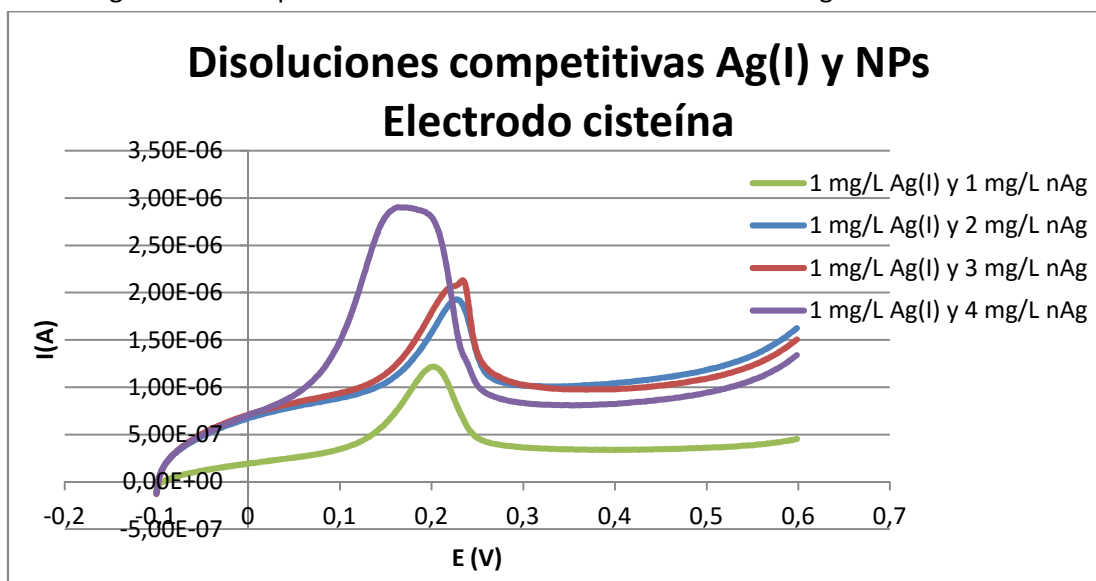


Figura 9: Voltagramas correspondientes a disoluciones competitivas con concentraciones crecientes de Ag NPs y una fija de Ag(I) empleando el programa Alex cisteína CP durante 15 minutos con el electrodo B modificado con cisteína.

Hasta aquí todos los datos referidos a un aumento de la concentración de nanopartículas con una fija de Ag(I). A continuación, los correspondientes a la situación contraria, aumento de la concentración de Ag(I) con un valor fijo de nanopartículas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 9.

		Posición (V)	Altura (A)	Área (C)
NPs de 10 nm y Disolución de Ag+ Concentración 2 mg/L Ag+ y 2 mg/L nAg	Media	1,70E-01	2,24E-06	2,69E-07
	Desvest	2,82E-03	7,56E-08	2,30E-08
	RSD	1,66E-02	3,38E-02	8,54E-02
	CV (%)	1,66E+00	3,38E+00	8,54E+00
	Varianza	7,95E-06	5,72E-15	5,29E-16
NPs de 10 nm y Disolución de Ag+ Concentración 3 mg/L Ag+ y 2 mg/L nAg	Media	1,69E-01	2,23E-06	2,71E-07
	Desvest	1,72E-03	4,31E-08	1,37E-08
	RSD	1,02E-02	1,95E-02	5,06E-02
	CV (%)	1,02E+00	1,95E+00	5,06E+00
	Varianza	2,96E-06	1,86E-15	1,88E-16
NPs de 10 nm y Disolución de Ag+ Concentración 4 mg/L Ag+ y 2 mg/L nAg	Media	1,71E-01	2,25E-06	2,72E-07
	Desvest	2,07E-03	1,07E-07	1,10E-08
	RSD	1,21E-02	4,75E-02	4,03E-02
	CV (%)	1,21E+00	4,75E+00	4,03E+00
	Varianza	4,27E-06	1,15E-14	1,20E-16

Tabla 9 : Valores de posición, altura y área relativos a disoluciones competitivas con concentraciones crecientes de Ag(I) y una fija de Ag NPs empleando el programa Alex cisteína CP.

Los voltagramas correspondientes a las medidas se muestran en la figura 10.

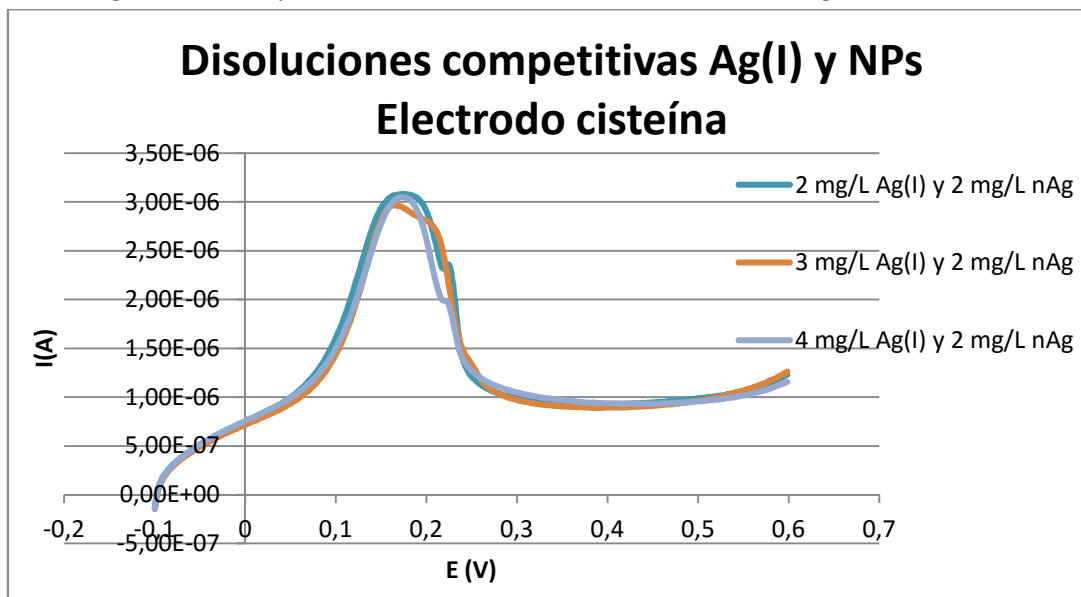


Figura 10: Voltagramas correspondientes a disoluciones competitivas con concentraciones crecientes de Ag(I) y una fija de Ag NPs empleando el programa Alex cisteína CP durante 15 minutos con el electrodo B modificado con cisteína.

Aquí termina el capítulo de la cisteína. A continuación, se pasará a abordar el correspondiente al del Poly (8- Mercaptoquinolina).

Electrodo con polímero Poly (8- Mercaptoquinolina)

Estudios anteriores han revelado que, los electrodos de grafito vitrificado modificados con el Poly (8- Mercaptoquinolina), resultan una herramienta eficaz a la hora de la preconcentración de la plata en forma de iones Ag(I), para luego ser analizada a través de voltametría de redisolución anódica de pulso diferencial con una alta sensibilidad y selectividad^[19]. Lo mismo sucede para el caso de análisis de flujo en los cuales, de las 44 potenciales interferencias, únicamente presentó problemas el Au(III)^[19].

Debido a como se ha demostrado anteriormente de que la cisteína presenta una alta sensibilidad hacia la Ag(I), concepto del cual muchos de los artículos consultados no mencionaban, se ha optado por probar si este tipo de polímero también presenta una cierta afinidad hacia las nanopartículas. Para lo cual, se va a empezar con la medición de una disolución de 4 mg/L de nanopartículas en perclorato empleando el programa PD nAg (Tabla 4). No se obtiene señal (voltagramas recogidos en Anexo 5.c). A pesar de ser una disolución concentrada en nanopartículas y utilizar una técnica muy sensible, no se observa ninguna señal. De todas formas, vamos a asegurarnos de que el electrodo funciona correctamente probándolo esta vez con una disolución de Ag(I) 1 mg/L en perclorato utilizando el programa PD Ag(I) (Tabla 4). De nuevo no se obtiene señal (voltagramas recogidos en Anexo 5.d). Antes de limpiar el electrodo y volverlo a polimerizar por si ha habido algún tipo de error ya sea: accidental, sistemático u aleatorio, se va a optar por probar una tercera vez pero en esta ocasión, con una disolución de Ag(I) más concentrada de 2 mg/L en perclorato (programa PD Ag(I) Tabla 4).

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 10. Voltagramas recogidos en Anexo 5.e.

Disolución de Ag⁺ (Pulso diferencial)

Concentración de 2 mg/L

2º Polímero

Tiempo	Posición (Voltios)	Altura (Amperios)	Área (Culombios)
15 min	0,2266	2,30E-07	1,29E-08
	0,2074	8,25E-08	3,81E-09
	0,2010	1,17E-07	4,89E-09
Media	2,12E-01	1,43E-07	7,20E-09
Desviación Estándar	1,33E-02	7,73E-08	4,97E-09
RSD	6,30E-02	5,40E-01	6,90E-01
CV (%)	6,30E+00	5,40E+01	6,90E+01
Varianza	1,78E-04	5,98E-15	2,47E-17

Tabla 10: Valores de posición, altura y área relativos a una disolución de Ag(I) con una concentración de 2 mg/L empleando el programa PD Ag(I).

Para intentar mejorar los resultados obtenidos con este método según consta en la bibliografía^[19], se va a optar por preparar las disoluciones de medida con ácido acético PH: 4,57 en vez de con perclorato PH: 7. No se obtiene señal ni con la disolución de NPs 4 mg/L ni con la de Ag(I) 2 mg/L (voltaграмas recogidos en Anexo 5.f y 5.g)

Los resultados en esta ocasión tampoco son los esperados. Antes de volver a empezar con un nuevo polímero se va a proceder a un intento final nuevamente con disolución de Ag(I) 2 mg/L pero esta vez preparada con perclorato (programa PD Ag(I) Tabla 4). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 11 (voltaграмas recogidos en Anexo 5.h).

Disolución de Ag⁺ (Pulso diferencial)

Concentración de 2 mg/L

2º Polímero

Tiempo	Posición (Voltios)	Altura (Amperios)	Área (Culombios)
15 min	0,2002	1,58E-07	3,89E-09
	0,2119	8,33E-08	1,86E-09
	0,2034	8,75E-08	1,44E-05
Media	2,05E-01	1,10E-07	4,81E-06
Desviación Estándar	6,07E-03	4,18E-08	8,33E-06
RSD	2,96E-02	3,82E-01	1,73E+00
CV (%)	2,96E+00	3,82E+01	1,73E+02
Varianza	3,68E-05	1,75E-15	6,94E-11

Tabla 11: Valores de posición, altura y área relativos a una disolución de Ag(I) con una concentración de 2 mg/L empleando el programa PD Ag(I).

Conclusiones.

1. Nanopartículas de 40 nanómetros.

Electrodo sin modificar

El hecho de que ningún pico de oxidación fuera observado para tiempos de inmersión por debajo de una hora, indica la baja afinidad de las Ag NPs con los electrodos glassy carbon (GC) sin modificar en condiciones de circuito abierto^[1]. Este resultado está de acuerdo con estudios que usan electrodos de microcarbono, donde las señales de las Ag NPs sólo se mostraron cuando se aplicó un potencial preferentemente negativo al electrodo^[2].

Como consecuencia de la escasa afinidad de las Ag NPs a los GC con superficies sin modificar bajo condiciones de circuito abierto, no puede obtenerse ninguna relación fiable entre el tiempo de espera necesario para que se adhieran, la carga de la redisolución y la cantidad de Ag NPs presentes en la disolución, no haciendo posible su cuantificación en una muestra líquida dada. Una forma sencilla de superar este problema es mediante la modificación de la superficie del electrodo de tal manera que la energía de unión hacia la nanopartícula de interés y por lo tanto la tasa de adhesión se incrementa^[1].

Electrodo con polímero de cisteína

Cuando nosotros ponemos una disolución de Ag(I), se requiere de un proceso previo de reducción a Ag(0) para luego producirse el proceso de oxidación y de esta forma observarse la señal de pico correspondiente. De esta forma, se generan microdepósitos de Ag(0) in situ vía reacción electroquímica, mientras que de la otra forma, partimos directamente de una suspensión de Ag(0) cuyas NPs se unen por puentes disulfuro a los azufres de la cisteína dando lugar a sulfuro de plata(I) lo que ocasiona que no se observe ninguna señal ya que la superficie de la nanopartícula ya se habrá oxidado químicamente^[18].

Comparando las tablas 5 y 6 se observa una intensidad de pico de $8,96 \cdot 10^{-7} \text{ A}$ para la Ag(I) y de $2,4 \cdot 10^{-7} \text{ A}$ para la suspensión de AgNP, lo que indica que la suspensión de NP tiene Ag(I) en disolución ya que el programa utilizado sólo permite detectar Ag(I). No obstante, los autores de la bibliografía consultada no comentan nada de la afinidad de la cisteína por los iones Ag(I) y de cómo su presencia produce una gran interferencia a la hora de captar las nanopartículas.

2. Nanopartículas de 10 nanómetros.

Electrodo con polímero de cisteína

Una de las explicaciones al hecho de no obtener ninguna señal en los voltagramas recogidos en el Anexo 5.a es que el comportamiento químico de las nanopartículas cambia en función del tamaño de las mismas^[3], necesitando un mayor tiempo o distintos potenciales, lo que implica que no se van a adherir al electrodo de igual modo.

En los voltagramas correspondientes a la Figura 8 se puede comprobar la gran diferencia de alturas (Amperios) en las señales entre las nanopartículas de diferentes tamaños. En ambas disoluciones se tiene una concentración de 1mg/L de NPs de Ag pero en un caso son de 10 nm y en el otro de 40 nm lo que quiere decir que, cuando se usen las primeras, habrá más cantidad de NPs y por lo tanto un mayor número de las mismas podrá unirse al electrodo. Sin embargo, ¿por qué se observa una altura superior para el caso de las NPs de 40 nm?. La

respuesta se encuentra en que se ha fijado un mayor número de átomos de Ag ya que las NPs de 40 nm poseen un volumen 64 veces mayor que las de 10nm , indicando de esta forma que por cada NP de 40 nm que se fija, se fijarán 64 veces más átomos.

Para el caso de las disoluciones que contienen Ag(I) y AgNP, a la hora de analizar los resultados de la Tabla 8, se van a tener en cuenta varios factores:

- Potencial (Voltios): se observa que conforme se va aumentando la concentración de nanopartículas, la señal de pico se va desplazando hacia mayores potenciales exceptuando en la última de ellas, en la cual sucede lo contrario. Estos resultados de posición de pico no coinciden con los correspondientes a la de referencia (Anexo 5.b), una disolución de Ag(I), por lo que se puede deducir que tanto las nAg como la Ag(I) dan señales diferentes. Como los potenciales de pico son distintos en unos y otros, es posible una detección selectiva de ambos componentes, siempre que la diferencia sea grande, lo que sucede para AgNP de radios pequeños (10 nm).
- Intensidad (Amperios): en este caso sí que se observa una tendencia clara en las cuatro experiencias. Cuanto más concentrada en nanopartículas está la disolución, mayor será la altura de pico. No obstante, estos resultados son inferiores a los obtenidos para la disolución de referencia, lo que no se corresponde con lo esperado de que al tener la misma concentración de Ag(I) de 1 mg/L y cantidades crecientes de nAg en cada una de las disoluciones, se tendrían que obtener, como mínimo, alturas iguales si no hay interferencia e inferiores si la hay. Esto quiere decir que las nanopartículas realmente se están uniendo a los azufres de la cisteína, ocupando de esta forma parte de los centros activos a los que se iba a unir la Ag (I), disminuyendo así la intensidad de pico. De esto se deduce que tanto las nanopartículas como la Ag (I) son competitivas, es decir , ambas dos se fijan en los mismos centros activos de la cisteína y por lo tanto, se producirán interferencias en sus correspondientes señales. En el caso de la disolución de Ag(I) que contiene 4 mg/L de AgNP se observa un aumento de la señal a valores iniciales y un desplazamiento del pico a menores valores, debido al exceso de NP.
- Área (Culombios): conforme mayor es la cantidad de nanopartículas más grande resulta el área de pico. Reseñar que todas son menores a la correspondiente de la disolución de referencia de Ag(I) 1 mg/L salvo la más concentrada.

Al igual que en el caso anterior, para el análisis de los resultados de la Tabla 9 se van a tener en cuenta varios parámetros para su análisis:

- Posición (Voltios): para las tres disoluciones se observan posiciones muy similares. Inferiores en comparación con los correspondientes a la Figura 9 y a los de la Tabla 8. Al tener todas ellas el mismo potencial , no será posible la detección selectiva de nanopartículas y Ag(I).

- Intensidad (Amperios): este parámetro, como el anterior, también permanece constante. Sí que se puede apreciar un aumento del doble de señal en comparación con los correspondientes a la disolución de 1 mg/L de Ag(I) y 2 mg/L de NPs reflejados en la Tabla 8 lo que tiene sentido ya que la concentración de Ag(I) se ha doblado y una mayor cantidad de este elemento podrá quedar adherida al electrodo. No obstante, aunque se continúe aumentando la cantidad de Ag(I) en disolución, el valor de la intensidad de pico no varía, lo que quiere decir que el electrodo podría encontrarse saturado y no aceptar más cantidad de iones plata. Observando los resultados podemos llegar a la conclusión de que pequeñas variaciones en la concentración de nanopartículas van a afectar mucho más a la intensidad de pico que si lo que variamos es la concentración de Ag(I) en donde permanece constante como ya se ha visto. De esto se puede deducir que la sensibilidad por parte de la cisteína, va a ser mayor para las nanopartículas que para la Ag(I).
- Área (Culombios): este parámetro también permanece invariable. Destacar un aumento del doble de su valor con respecto a los de la referencia mostrados en la Tabla 8.

Electrodo con polímero Poly (8- Mercaptoquinolina)

Analizando los voltagramas referentes al Anexo 5.d se puede observar entorno al potencial de 0,13 V, lo que podría ser una leve señal sin embargo no significativa ya que no se ha podido medir tanto de forma automática como manual. A pesar de ser un polímero especialmente sensible a los iones Ag(I)^[19], no es capaz de producir señal para una concentración de 1 mg/L lo que no ocurría con la cisteína [Tabla 8]. Es más, aún usando la técnica del pulso diferencial, en principio mejor por disminuir el límite de detección del analito a medir, no se observa nada.

A pesar de no aportar señal para el caso anterior, con los resultados de la Tabla 10 se puede determinar en principio que el electrodo funciona correctamente al ser capaz de mostrar las señales de pico para una disolución de Ag(I) más concentrada. Esta prueba también nos puede servir para la comparación con los datos obtenidos en la Tabla 8 correspondientes a una disolución de Ag(I) 1 mg/L y así poder determinar cuál es mejor método para la determinación de la Ag(I). **M.A.**= Cisteína + Voltametría de barrido lineal ; **M.B.**= Poly (8- Mercaptoquinolina) + Voltametría de pulso diferencial. A continuación, se van a valorar una serie de parámetros estadísticos para tal fin:

- Sesgo:
 - a. Error Accidental: se realiza la prueba de Q_{dixon} para localizar posibles resultados anómalos. Para 3 mediciones la $Q_{dixon} = 0,970$ con un nivel de confianza del 95%, por lo que todas las que superen este valor, se desecharán. En el caso del **M.A.** encontramos dos resultados que se van a eliminar. La tabla 8 queda modificada de la siguiente manera:

Disolución de Ag⁺ (Barrido Lineal)

Concentración de 1 mg/L

Policisteína

Tiempo	Posición (Voltios)	Altura (Amperios)	Área (Culombios)
15 min	0,2101	1,340E-06	1,21E-07
			1,09E-07
	0,2101	1,344E-06	1,23E-07
Media	2,10E-01	1,34E-06	1,17E-07
Desviación Estándar	0,00E+00	2,83E-09	7,38E-09
RSD	0,00E+00	2,11E-03	6,29E-02
CV (%)	0,00E+00	2,11E-01	6,29E+00
Varianza	0,00E+00	8,00E-18	5,45E-17

Tabla 8 (modificada): Valores de posición, altura y área relativos a una disolución de Ag(I) con una concentración de 1 mg/L empleando el programa Alex cisteína

- b. Error aleatorio: según la teoría, para: CV%= 1% --> error pequeño.
 CV%= 1-3% --> aceptable, tolerable.
 CV%> 3% --> grande, inaceptable.

En el **M.A.** se tiene: un error aceptable para la altura y un error grande para el área.

En el **M.B.** se tienen tres errores grandes en los tres parámetros medidos.

- Limite de detección: será menor para el **M.A.**, ya que es capaz de aportar una señal instrumental significativamente diferente de la señal de muestra del blanco o la señal de fondo para una concentración de analito menor, presentando de esta forma, una mayor sensibilidad.
- Precisión: el **M.A.** será más preciso al tener valores menores de los parámetros estadísticos.

Tras los resultados negativos obtenidos empleando el ácido acético (Anexo 5.f y 5.g) se llega a la conclusión de que el perclorato de potasio resulta más adecuado para esta determinación. En la última medida se han obtenido mejores resultados que los reflejados en la tabla 10 ya que tras aplicar la prueba de la Q_{dixon} y eliminar los valores anómalos nos queda lo siguiente:

Disolución de Ag⁺ (Pulso diferencial)

Concentración de 2 mg/L

Polimercaptoquinoleína

Tiempo	Posición (Voltios)	Altura (Amperios)	Área (Culombios)
15 min	0,2002		3,89E-09
	0,2119	8,33E-08	1,86E-09
	0,2034	8,75E-08	
Media	2,05E-01	8,54E-08	2,87E-09
Desviación Estándar	6,07E-03	2,99E-09	1,44E-09
RSD	2,96E-02	3,50E-02	5,00E-01
CV (%)	2,96E+00	3,50E+00	5,00E+01
Varianza	3,68E-05	8,92E-18	2,07E-18

Tabla 11 (modificada): Valores de posición, altura y área relativos a una disolución de Ag(I) con una concentración de 2 mg/L empleando el programa PD Ag(I).

Ahora se tiene un error aleatorio aceptable para la posición, y dos errores aleatorios grandes para la altura y el área aunque muy inferiores en comparación con los de la Tabla 10. A pesar de notarse una gran mejoría, este método sigue siendo menos preciso, menos selectivo (en esta ocasión se han obtenido resultados de altura aún menores) y con una mayor cantidad de errores para la determinación de Ag(I) siendo a su vez, incapaz de la determinación de nanopartículas de plata por lo menos bajo las condiciones propuestas.

Bibliografía:

1. Kristina Tschulik, Robert G Palgrave, Christopher Batchelor- McAuley, Richard G Compton, Sticky electrodes for the detection of silver nanoparticles, *Nanotechnology*, **2013**, 24- 295502.
2. Yi-Ge Zhou, Neil V. Rees, Richard G. Compton, Electrode- nanoparticle collisions: The measurement of sticking coefficient of silver nanoparticles on a glassy carbon electrode, *Chemical Physics Letters*, **2011**, 514, 291-293.
3. Olga S. Ivanova, Francis P. Zamborini, Size-Dependent Electrochemical Oxidation of Silver Nanoparticles, *J. AM. Chem. Soc.* **2009**, 132, 70-72.
4. Marcella Giovanni, Martin Pumera, Size Dependant Electrochemical Behavior of Silver Nanoparticles with Sizes of 10, 20, 40, 80 and 107 nm. *Electroanalysis*, **2011**, 24, No. 3, 615-617.
5. Bianca Ferreira da Silva, Sandra Pérez, Piero Gardinalli, R.K. Singhal, Antonio A. Mozeto, Damià Barceló, Analytical Chemistry of metallic nanoparticles in natural environments, *Trends in Analytical Chemistry*, **2011**, Vol. 30, No.3.
6. Howard Weinberg, Anne Glyean, Michael Leopold, Evaluating engineered nanoparticles in natural waters, *Trends in Analytical Chemistry*, **2011**, Vol. 30, No.1.
7. Xiaoyin Xiao, Fu-Ren F. FAN, Jiping Zhou, Allen J. Bard, Current transients in Single Nanoparticle Collision Events, *American Chemical Society*, **2008**, 130, 16669-16677.
8. Francisco Laborda, Javier Jiménez- Lamana, Eduardo Bolea, Juan R. Castillo, Critical considerations for the determination of nanoparticle number concentrations, size and number size distributions by single particle ICP-MS, *Royal Society of Chemistry*, **2013**.
9. Catalina Marambio- Jones, Eric M. V. Hoek, A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment, *J. Nanopart Res*, **2010**, 12,1531-1551.
10. Santiago Lamas Calzada, Nanotecnología en agricultura y alimentación, Creamos el futuro, Nanotecnología y medio ambiente, **2010**.
11. Designing and Studying mode of action and biosafety of nanopesticides.
<https://sites.google.com/site/isinanoicarnaip/>
12. Dr. German Moreno Moya, Nanotecnología aplicada a la agricultura, **2009**.
<http://agrosolar.org/index.php?controlador=locales&local=1&articulo=10>.
13. [Http://www.frieslandcampina.com/english/innovation.aspx](http://www.frieslandcampina.com/english/innovation.aspx).

14. Michael Mehring, Metasestable β - Bi_2O_3 Nanoparticles with potential for Photocatalytic Water Purification Using Visible Light Irradiation, DOI:10.1002/open.201300032, **2013**.
15. ELIKA: Fundación vasca para la seguridad agroalimentaria, La nanotecnología en la industria alimentaria, **2012**.
http://www.elika.net/datos/articulos/Archivo993/Art%C3%ADculo_nanotecnolog%C3%ADa%20alimentaria.pdf
16. Thomson Reuters, Enrique Navarro, Investigadores del CSIC estudian la toxicidad de las nanopartículas de plata en algas, **2010**.
<http://www.dicyt.com/noticias/investigadores-del-csic-estudian-la-toxicidad-de-las-nanoparticulas-de-plata-en-algas>
17. Bastian Franze, Ingo Streng, Carsten Engelhard, Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: evaluation of three different pneumatic and piezo-based sample introduction systems for the characterization of silver nanoparticles, DOI:10.1039/C2JA00003B, **2012**.
18. Ralph T R, Hitchman ML, Millington J P, Walsh F C, The electrochemistry of L- cistine and L-cysteine: part 1: thermodynamic and kinetic studies J. Electroanal. Chem. **1994**, 375, 1-15.
19. S.X. Guo, S.B. Khoo, Highly selective and sensitive determination of silver(I) at a poly(8-mercaptoquinoline) film modified glassy carbon electrode, Electroanalysis, **1999**, 11, 891–898.