

DETERMINACIÓN DE PLATA MEDIANTE EAA CON LLAMA EN MATERIAL BIOLÓGICO. INFLUENCIA DEL TIPO DE MUESTRA Y LA PUESTA EN DISOLUCIÓN DE LA MISMA SOBRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

**DETERMINATION OF SILVER BY EAA WITH FLAME IN BIOLOGIC
MATERIAL**

Trabajo académicamente dirigido por: José María Mir Marín

Autora: Lucía Berdejo Embid

Trabajo realizado en el departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza,
laboratorio de Espectrometría Atómica

Curso académico: 2019/2020

A. RESUMEN

En el siguiente trabajo se desarrolla un método espectrométrico para la determinación de plata en material biológico. Se realiza con un espectrómetro de absorción atómica por llama. Esta técnica se emplea para determinar el contenido de plata en distintas muestras de celulosa en las que se modifican determinadas variables, como el tiempo de duración de las distintas lixiviaciones, disolvente o temperatura, para lograr optimizar el procedimiento.

Tras la optimización de las variables comentadas, que afectan a la disolución de la muestra, se establecen los parámetros analíticos tales como rango lineal, sensibilidad, límite de detección y de cuantificación.

El trabajo está dividido en una parte experimental, donde se obtienen los parámetros nombrados en el párrafo anterior y resultados de lixiviación en agua. También contiene una parte bibliográfica donde se explican distintos procedimientos convencionales para preparar las muestras biológicas en las que posteriormente se analiza el analito, mediante digestiones ácidas.

Se compararán distintos procedimientos de disolución de celulosa, concluyendo con información bibliográfica cual sería el más adecuado (lixiviación con HNO_3). Estas afirmaciones teóricas, si la situación lo hubiera permitido, habrían sido comprobadas experimentalmente.

Por último, se explica la forma de cuantificar la plata que se encuentra iónicamente y nanoparticulada, a partir de averiguar inicialmente la plata total que contiene la muestra de celulosa.

B. ABSTRACT

In the following work, a spectrometric method for silver's determination in biological material is developed. It is performed with a flame atomic absorption spectrometer. This technique is used to determine the silver content in different cellulose samples in which certain variables, such as reaction time, solvent or temperature, are modified to optimize the method.

After optimization of the commented variables, which affect the dissolution of the sample, the analytical parameters such as linear range, sensitivity, limit of detection and quantification are established.

The work is divided into an experimental part, where the parameters named in the previous paragraph and leaching results in water are obtained. It also contains a bibliographic part where different conventional procedures are explained to prepare the biological samples in which the analyte is subsequently analyzed, using acid digestions.

Different cellulose dissolution procedures will be compared, concluding with bibliographic information which would be the most appropriate (leaching with HNO_3). These theoretical claims, had the situation allowed, would have been experimentally verified.

Finally, the way to quantify the silver that is ionically and nanoparticulated is explained, starting from finding out initially the total silver that the cellulose sample contains.

ÍNDICE	Página
1. INTRODUCCIÓN/ANTECEDENTES.....	5
a) Usos y formas de la plata	
b) Celulosa	
c) Nanoparticulas de Ag en celulosa	
d) Métodos analíticos para la determinación de Ag	
i. Método analítico	
ii. Muestras: Celulosa	
iii. Métodos de disolución	
iv. Técnica EAA por llama	
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO.....	11
3. MATERIALES Y REACTIVOS.....	11
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	12
a) Puesta a punto del método analítico	
b) Disoluciones patrón de Ag	
c) Rango lineal	
d) Mejora de la precisión	
e) Puesta en disolución de las muestras de celulosa	
f) Determinación de Ag liberada en agua	
g) Métodos de digestión de la materia orgánica	
5. RESULTADOS DE LOS MÉTODOS DE LIXIVIACIÓN.....	20
a) Parte experimental	
b) Parte bibliográfica	
6. ESTUDIO DEL EFECTO MATRIZ Y RECUPERACIÓN.....	22
a) Estudio del efecto matriz	
b) Errores proporcionales	
c) Interferencias	
d) Estudio de la recuperación	
7. CONCLUSIÓN.....	26
8. BIBLIOGRAFÍA.....	27

1. INTRODUCCIÓN / ANTECEDENTES

- Usos y formas de la plata

La plata (Ag) se ha empleado desde la antigüedad y tiene aplicaciones muy variadas, como son la fotografía, joyería, medicina, electrónica, etc. En la actualidad, la plata ha adquirido mucho interés debido a su estabilidad química, conductividad, actividad catalítica y antibacteriana. Ésta última, es la principal propiedad para el desarrollo de productos con nanopartículas de plata (AgNPs)¹.

De hecho, se estima que las nanopartículas de plata tienen mayor grado de comercialización si se compara con el resto de nanomateriales utilizados en productos de consumo. Uno de los factores claves en la aplicación y el diseño de nanomateriales es el control sobre el contenido en plata del sustrato elegido¹.

Se usan en bactericidas, biofungicidas, industria médico-farmacéutica y aplicaciones biomédicas. Éste amplio grado de comercialización hace necesario que las aplicaciones de los productos que contienen AgNPs sean seguras tanto a nivel de la salud como para el medio ambiente. Debido a que su toxicidad intrínseca depende de algunas variables como son el tamaño, área superficial, solubilidad, estado de aglomeración y la carga superficial^{24,26}.

- Celulosa

La celulosa ($C_6H_{10}O_5$)_n es un polisacárido natural, donde n es el número de unidades de glucosa que la constituyen. Éstas se encuentran unidas por enlaces β (1-4) glucosídicos (se forman con la reacción del grupo alcohol hemiacetálico del carbono anomérico C1 de la β -D-glucopiranosa con el grupo alcohol del carbono 4 de otra β -D-glucopiranosa). Es un biopolímero estructural que integra la pared celular de las plantas en una proporción aproximadamente del 30-50%. Además de en las plantas, la biosíntesis de celulosa ocurre en otros organismos como hongos, algas y bacterias.

Las unidades de glucosa están constituidas por gran cantidad de grupos funcionales hidroxilo, por lo que esto significa que se forman puentes de hidrógeno, lo que proporciona rigidez y resistencia a la estructura. Las fibras elementales están formadas por 40-100 cadenas de celulosa, donde hay regiones con una estructura cristalina que confiere resistencia y otras zonas amorfas que proporcionan elasticidad. Justamente la presencia de estas zonas amorfas permite una mayor penetración de reactivos químicos, confiriéndole así reactividad.

Actualmente, es el polímero orgánico natural más abundante y se considera prácticamente una fuente inagotable de productos sostenibles con el medio ambiente. Constituye la materia prima del papel y de fibras naturales. Otros usos habituales de la celulosa son la fabricación de explosivos a partir de nitrocelulosa, seda artificial, barnices. Destaca que se puede emplear como aislamiento térmico y acústico².

- AgNPs en celulosa

La caracterización de nanopartículas metálicas en matrices biológicas supone un reto porque las medidas dependen del tamaño y naturaleza de la partícula, concentración de la muestra y características fisicoquímicas de la disolución y obviamente, de los principios que constituyen la técnica analítica.

La introducción de nanopartículas de plata en fibras naturales o sintéticas consigue potenciar la actividad iónica debido a la presencia de una mayor cantidad de iones plata liberados. Con esto se obtienen rápidos efectos antimicrobianos.

Las fibras naturales de celulosa resultan atractivas como matrices para conseguir la síntesis de nanopartículas *in situ*, debido a la porosidad de la superficie de las fibras que permite la adherencia o deposición de las nanopartículas.

Otra razón es su estructura nanoporosa, con alta densidad de oxígeno, que funciona como nanoreactor para ayudar a su estabilización. Sintetizar materiales funcionales que combinen la actividad AgNPs con las ventajas de la matriz celulósica polimérica, es un área ampliamente estudiada en la actualidad ^{3,4}.

- Métodos analíticos para la determinación de Ag:

Debido al presente interés tanto en las nanopartículas como en los iones de plata, resulta imprescindible el desarrollo de métodos que permitan detectar este elemento, incluso a bajas concentraciones.

Se pueden clasificar en técnicas clásicas, como son la volumetría (método Volhard) o la gravimetría o en técnicas instrumentales, de las que podemos destacar:

- Espectrometría de absorción atómica por llama (FAAS)
- Espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (GFAAS)
- Espectrometría de absorción molecular UV-VIS de ditizona.
- Espectroscopía de fluorescencia de rayos X (XRFS)
- Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)
- Espectrometría de emisión atómica mediante plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES)
- Voltamperometría de redisolución anódica (ASV)

Entre las técnicas nombradas en el párrafo anterior, destacan la espectrometría de emisión atómica mediante plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES) y la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), debido a la velocidad, sensibilidad, precisión y amplio rango lineal.

Además, para reducir el límite de detección se usan variedad de procesos de preconcentración antes de realizar un análisis con las tecnologías mencionadas.

- Método analítico:

La plata es un elemento muy sencillo de determinar mediante espectroscopía de absorción atómica por llama (FAAS); se atomiza con facilidad y apenas genera interferencias en llama de composición aire/acetileno, independientemente de la proporción de la llama y de la intensidad de la lámpara.

Se emplea una longitud de onda de 328,1 nm porque aporta una mayor sensibilidad, y por lo tanto, es la línea más indicada para concentraciones bajas de plata⁵.



Figura I. Espectrómetro de absorción atómica de llama (Perkin Elmer Aanalist 200).

- Muestras: Celulosa

En este trabajo se va a determinar cuantitativamente la concentración de plata en muestras de celulosa que tienen adheridas nanoparticulas de plata. Mediante distintas estrategias de disolución se puede cuantificar la concentración de plata que se encuentra en forma de catión o en nanoparticula.

La muestra tiene un color marrón, sin embargo la celulosa es blanca. Este fenómeno es debido a las nanoparticulas adheridas, ya que cuando las dimensiones de un metal se reducen (tamaño nanométrico) la luz les inunda y los electrones libres empiezan a moverse colectivamente. En metales como el oro y la plata esta oscilación es muy intensa y por eso, según el tamaño de las nanoparticulas éste movimiento se amplifica y éstas pueden presentar distintos colores. En el caso de la plata puede presentar color marrón, azul o amarillo.

- **Métodos de disolución:**

Los métodos más destacables para la digestión por vía húmeda de muestras biológicas, adaptables a sistemas de nebulización y por tanto, los más apropiados para técnicas instrumentales de espectrometría atómica, están basadas en la eliminación de la materia orgánica. El método utilizado debe evitar cualquier tipo de contaminación, quedando los analitos en la fase inorgánica y extrayendo los componentes orgánicos. Generalmente, la digestión por vía húmeda incluye calentamiento en largos períodos de las muestras en ácido.

La manera más habitual de poner en disolución Ag presente en muestras biológicas, es realizando una digestión por vía húmeda con ácido nítrico (ácido oxidante). Sin embargo, dependiendo de las muestras o incluso, del analito a determinar, se emplean diferentes mezclas de ácidos, como son: HNO_3/HCl , $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$, $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$.

- **HNO_3/HCl :** Mezcla de ácido oxidante, con otro que no lo es. Se emplea en una proporción 1:3 (agua regia) para disolver metales pesados, aleaciones y aceros; también se puede utilizar para la digestión de materia inorgánica con una alta concentración en silicatos (en este caso la medida sería 4:1). El HCl forma sales insolubles con la plata, lo cual es una reacción exotérmica, en la que se producen cloro gas y óxidos nitrosos, a causa de los potenciales de reducción.



Donde MO: materia orgánica.

- **$\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$:** Mezcla de dos ácidos muy oxidantes. Se generan gases de descomposición como en la mezcla anterior, pero en este caso, en mayor medida por lo que es de gran peligrosidad. También se forman complejos insolubles con plata en disolución, debido a la alta reactividad.
- **$\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$:** Se emplea en proporción 4:1 para digestión de muestras orgánicas con un gran contenido de materia grasa. La presencia de H_2O_2 permite reoxidar las partículas pequeñas y particularmente los defectos con gran curvatura, favoreciendo la uniformidad de las nanopartículas.



La ventaja más destacable que presenta la digestión por vía húmeda es la efectividad de disolución de metales pesados como es, en este caso, la plata. Pero también hay algunos inconvenientes, como por ejemplo el tiempo, ya que se trata de métodos lentos de disolución. También se puede destacar la posible contaminación de la muestra y pérdida de elementos volátiles presentes ¹⁹.

En ocasiones se puede realizar una digestión alcalina, usando concretamente TMAH, cuya ventaja es que mantiene las nanopartículas de Ag en su forma nanoparticulada, siendo que esta propiedad no se consigue al realizar una digestión ácida. Este reactivo es muy eficaz para la disolución de materia orgánica, produciendo la ruptura hidrolítica y la metilación de enlaces amida, éster y éter. Al ser una base fuerte provoca la precipitación de la plata. Para evitar esto, se suelen usar acomplejantes ¹⁸.

Para cada método es importante determinar las variables que pueden perjudicar la digestión y posteriormente, optimizar estos parámetros. Estos suelen ser temperatura, tiempo y disolvente.

- Técnica EAA por llama: (FAAS)

La Espectroscopía de Absorción Atómica es una técnica basada en la absorción de radiación ultravioleta-visible por parte de una población de átomos, que se encuentran en estado fundamental, neutro y gaseoso. Los átomos en el estado fundamental absorben energía a una determinada longitud de onda, pasando así al estado excitado. Midiendo la cantidad de luz absorbida se puede realizar una determinación cuantitativa del analito. La selección de la longitud de onda específica permite la determinación de elementos individuales.

La absorción atómica viene regida por leyes espectroscópicas:

- Los fotones deben tener concretamente la diferencia de energía entre los dos niveles en los que se produce el tránsito.
- La probabilidad de que se produzca el paso del nivel fundamental a un nivel excitado, depende de los niveles energéticos y las geometrías puestas en juego.

La población atómica depende de la temperatura y de la diferencia de energía entre los niveles implicados en la transición (Ley de distribución de Maxwell-Boltzmann).

Los cinco componentes principales en un instrumento de absorción atómica son:

- Fuente de radiación que emite respecto al elemento de interés (LCH).
- Atomizador, como su nombre indica, donde se produce la atomización de la muestra, y se constituye por un nebulizador y llama.
- Monocromador para la dispersión de la luz.
- Detector, el cual mide la intensidad y amplifica la señal.
- Sistema de lectura.

Otros componentes que podemos destacar son el sistema óptico, que sirve para separar la radiación y conseguir la longitud de onda de interés y el sistema de corrección de fondo, constituido por una lámpara de deuterio.

La fuente de radiación es una lámpara de cátodo hueco (LCH), donde el cátodo es un cilindro construido en parte por el metal del cual se va a producir el espectro. El cátodo y el ánodo se encuentran sellados en un cilindro lleno de argón o neón. En este caso, la lámpara contiene en el cátodo Ag con alta pureza espectral.

Al aplicar un potencial eléctrico entre el ánodo y el cátodo, el elemento analito se excita y emite radiación a la longitud de onda característica.

En el quemador de premezcla o flujo laminar tienen lugar los procesos de nebulización y atomización de la muestra. La disolución tarda muy poco tiempo en pasar por la llama, por lo que el instrumento transforma la disolución previamente en una nube de gotas de poco tamaño para favorecer el proceso. Los átomos formados tras estos dos procedimientos son irradiados con la radiación que proviene de la LCH, produciendo así la excitación de estos^{6,7}.

La selectividad de la técnica viene dada por la llama. La composición de aire/acetileno alcanza una temperatura de 2300°C aproximadamente y una velocidad de combustión de 158-266 cm/s.

El sistema de detección está formado por el monocromador, que se encarga de dispersar la luz y de dejar pasar únicamente la de longitud de onda de interés (Ag: 328 nm).

Respecto al detector, se trata generalmente de un tubo fotomultiplicador, el cual funciona como una combinación del efecto fotoeléctrico, generando una corriente eléctrica en función de la intensidad que le llega y posteriormente, amplifica este efecto. Los tubos fotomultiplicadores son sistemas rápidos, muy sensibles y de bajo ruido instrumental^{7,8}.

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

- Diseñar un método analítico para la determinación de plata mediante espectrometría de absorción atómica por llama (FAAS).
- Establecer un método de lixiviación adecuado, comparando información bibliográfica, en el cual se determine la cantidad de plata total en celulosa, independientemente de que la plata esté en forma iónica o nanoparticulada.
- Aplicar el procedimiento diseñado y optimizado de lixiviación.
- Caracterizar el método analítico para la muestra con la que se trabaja:
 - a) Evaluación de los parámetros instrumentales y analíticos que caracterizan el método diseñado.
 - b) Optimización de las condiciones y variables que puedan afectar a los resultados, como el disolvente, temperatura y tiempo de lixiviación.
- Caracterizar el procedimiento desarrollando términos de exactitud, precisión y sensibilidad.

3. MATERIALES Y REACTIVOS

- Aparatos:
 - Placa calefactora (Bibby Sterlin LDT STONE, Staffordshire)
 - Centrífuga (Multifuge XTR Thermo Scientific)
 - Micropipetas Biohit de diversos volúmenes
- Instrumentación:
 - Espectrofotómetro de absorción atómica de llama (Perkin Elmer Aanalist 3030) con lámpara de cátodo hueco (Photron, Perkin Elmer Lamp, Ag, Silver, Serial Nº 8535)
 - Balanza analítica (Mettler Toledo AG245).
- Material:
 - Variado material de plástico y vidrio
- Reactivos:
 - Patrón primario de plata (AgNO_3) (Silver Standard for IPC, $994 \pm 3 \text{ ppm}$)
 - Agua mili-Q Advantage
 - Ácido nítrico HNO_3 , 69% analysis, ACS, ISO
 - Ácido clorhídrico HCl , 36,5% Baker Instra-analyzed reagent

4. PARTE EXPERIMENTAL

- Puesta a punto del método analítico:

En primer lugar hay que establecer las condiciones de trabajo y posteriormente fijarlas en el espectrofotómetro. La plata se mide a una longitud de onda de 328,1 nm y el ancho de banda espectral es de 0,7 nm. La composición de la llama es aire/acetileno en una relación de (30/15). La intensidad de la lámpara de cátodo hueco se fija a 12 mA.

En la llama hay un perfil de temperatura y también cambios en ella dependiendo de la proporción combustible/comburente que se fije. Por lo tanto se debe optimizar, antes de realizar los análisis, la posición de observación del analito en el quemador. Es decir, se modifica la altura de posición del mechero hasta obtener la medida más óptima, en la cual la concentración de átomos de cada elemento es superior.

Se usa la ley de Lambert-Beer en las técnicas de absorción para establecer la relación entre la intensidad de radiación monocromática que entra en el medio absorbente y la que sale (concentración de la especie absorbente, probabilidad de absorción y el paso óptico). Sin embargo, una formulación más habitual de esta ley es a través de la absorbancia, ya que varía linealmente con la concentración.

Las muestras se analizaron mediante un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer Aanalist 3030, el cual nos permite hallar su concentración tras haber obtenido curvas de calibración que proporcionan la relación directa entre la absorbancia y la concentración del elemento en cuestión.

Se preparan disoluciones patrón de plata de concentración creciente para obtener la recta de calibrado, y a partir de ella, realizar el cálculo de los parámetros analíticos: rango lineal, límite de detección, límite de cuantificación y sensibilidad.

- Disoluciones patrón de Ag:

- La disolución estándar es el patrón primario (AgNO_3) cuya concentración es de $994 \pm 3 \text{ }\mu\text{g/mL}$. Ésta tiene que estar guardada en un sitio que esté privado de la luz y cubierta con papel de aluminio, para evitar la fotorreducción de cationes Ag^+ .
- Las disoluciones patrón se obtienen diluyendo los volúmenes calculados para obedecer las concentraciones crecientes, en matraces de 100 mL con HNO_3 al 5%.
- Para preparar las disoluciones patrón se ha realizado una disolución intermedia de 100 $\mu\text{g/mL}$ a partir de 10 mL de disolución estándar en un matraz de 100 mL.
- El blanco se prepara siguiendo los mismos pasos que en las disoluciones patrón anteriores, pero en este caso, sin añadir el analito que vamos a medir mediante absorción atómica.

Las disoluciones patrón, que medimos mediante espectrometría de absorción atómica para hallar la recta de calibrado, proporcionan los siguientes valores de absorbancia (Tabla 1):

C (μg/mL)	0	1	2,5	5	7,5	10	20	30	50	75
Abs	0,0000	0,0666	0,1726	0,3340	0,4806	0,6050	1,0100	1,2730	1,5080	1,6210

Tabla I. Valores medios de absorbancia para las disoluciones patrón

A continuación se muestra la correspondiente recta de calibración (Figura 1):

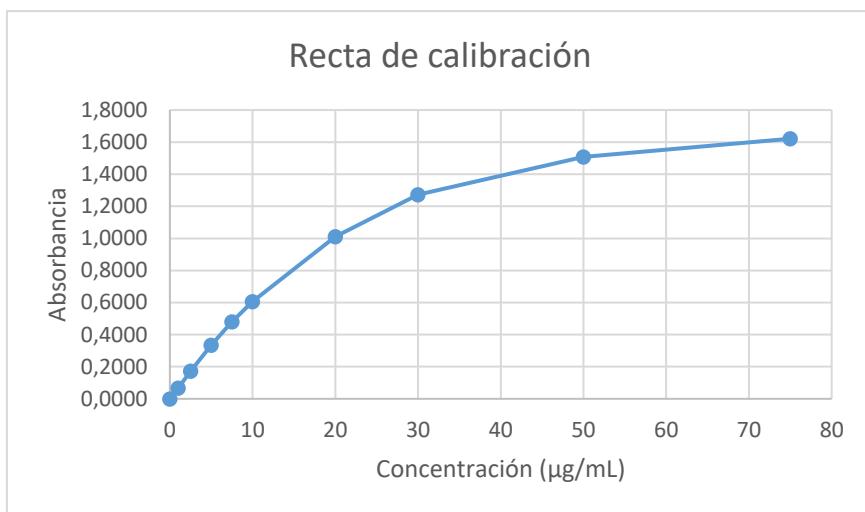


Figura I. Recta de calibración para evaluar el rango lineal.

Como se puede ver en la recta de calibración por encima de la concentración de 20 μg/mL se pierde la linealidad, los puntos superiores no se ajustan a una recta.

- Rango lineal

El primer objetivo es precisar el rango lineal, y para conseguirlo se utiliza el contraste de significación F, el cual considera la razón de dos varianzas muestrales, o sea, la razón de los cuadrados de las desviaciones estándar: s_1^2/s_2^2 . Se plantea el problema estadístico considerando una hipótesis nula (H_0) y otra alternativa (H_1), donde (H_0): ambos métodos tienen la misma precisión $\sigma_1^2 = \sigma_2^2$.

El estadístico se calcula según la expresión $F = s_1^2/s_2^2$, de tal manera, que F siempre sea igual o mayor a la unidad. Los grados de libertad tanto del numerador como del denominador son n_1-1 y n_2-2 . Esto se realiza para comprobar si la diferencia entre dos varianzas muestrales es significativa ya que, que dos desviaciones tengan un valor diferente no significa que posean distinta precisión.

Por tanto, para eliminar los puntos de la recta de calibrado se aplica el test F, calculando la varianza de los residuales, para la recta con todos los puntos obtenidos al principio y para la misma con un punto menos. Se calcula el cuadrado de las varianzas y su respectivo cociente, hallando un valor que es comparable con el tabulado. Si el valor de F experimental es mayor que el valor tabulado, al nivel de confianza deseado (usualmente 95%), se rechazaría la hipótesis nula.

Destacando que al realizarlo estamos eliminando dos grados de libertad. El test F se aplica a todos los puntos sospechosos presentes en la recta de calibrado, ya que pueden provocar una disminución del coeficiente de correlación.

- Mejora de la precisión

Además de la eliminación de resultados anómalos, para mejorar la precisión asociada a unos valores obtenidos se pueden seguir los siguientes procedimientos:

- Aumento del número de medidas. Si se realizan un número muy reducido de medidas la desviación estándar que se obtiene no siempre refleja la precisión real del método. Los resultados suelen ser fiables a partir de unas 10 medidas y representativos con 20, debido a que al aumentar el número de medidas disminuye el intervalo de confianza.
- Optimización del procedimiento analítico. Se basa principalmente en detectar las causas de imprecisión y en el hecho de modificar dicho procedimiento para tratar de disminuirlas o incluso eliminarlas.

En la figura 2 se muestra la recta de calibrado con la que se va a evaluar definitivamente el rango lineal y el resto de parámetros analíticos.

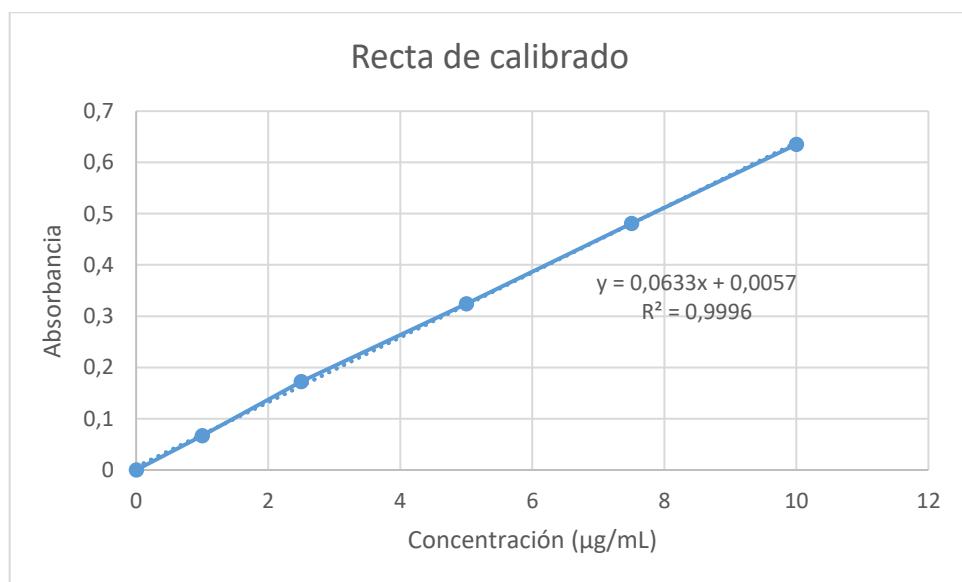


Figura II. Recta de calibración definitiva

La ecuación que representa la recta es $y=0,0663x + 0,0057$ y el coeficiente de correlación lineal es $R^2 = 0,9996$.

Con los datos obtenidos hasta el momento se puede afirmar que el rango lineal de concentraciones en el que es aplicable el método va de 0 a 10 $\mu\text{g/mL}$.

A partir de la desviación de la disolución de blanco, cuyo valor es 0,0008165, se pueden calcular el resto de parámetros mencionados anteriormente.

- El Límite de Detección se define como la menor concentración de analito que puede ser detectada con fiabilidad mediante un método analítico determinado. Se calcula multiplicando por tres la desviación calculada del blanco y dividida entre la pendiente de la recta, para obtener un valor en unidades de concentración.

$$LD = 0,03869652 \mu\text{g/mL}$$

- El Límite de Cuantificación es la menor concentración de analito que se puede determinar con cierta exactitud y precisión en condiciones experimentales fijadas. Se calcula de la misma forma que el límite de detección, pero en este caso se multiplica por 10 en vez de por 3¹⁷.

$$LC = 0,1289884 \mu\text{g/mL}$$

La pendiente de la recta de calibración de un método proporciona la relación entre la señal y la concentración, es decir, el cambio que se produce en la señal cuando la concentración varía en una unidad. Por tanto, se puede cuantificar la concentración característica como la concentración de analito que es capaz de absorber un 1% de la radiación incidente.

El cálculo expone una absorbancia de $0,01 * 0,0008165 = 0,000008165$ y éste valor equivale a una concentración característica de 0,00012899.

Otro parámetro analítico que se puede cuantificar es la precisión, que es el nivel de concordancia entre los resultados hallados cuando se aplica en varias ocasiones el mismo método analítico a la muestra. Se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Repetibilidad (\%)} = \frac{s * 100}{X}$$

$$X=0,002; s=0,0008165$$

Donde s es la desviación estándar del blanco expresada en unidades de concentración y X es el valor de la media de las medidas del blanco. Obteniendo así un valor de repetibilidad del 40,82%.

Por tanto, las condiciones óptimas en la cuantificación de la plata total en disolución son las que se exponen en la tabla 2:

Parámetro	Valor ($\mu\text{g/mL}$)
Rango lineal	0-10
Sensibilidad	0,000129
LD	0,038697
LC	0,128988
Repetibilidad (%)	41

Tabla II. Parámetros analíticos generales

- Puesta en disolución de las muestras de celulosa

El método adecuado de disolución y los datos cinéticos son imprescindibles en el diseño, desarrollo, operación y evaluación de los procesos de conversión de la materia orgánica. El grado y velocidad de hidrólisis dependen de varios factores, como el pH, temperatura, concentración de biomasa hidrolítica, tipo de materia orgánica y tamaño de partícula¹⁴.

La celulosa puede pasar por diferentes tratamientos químicos:

- Ozonólisis: como su nombre indica, tratamiento químico con ozono, el cual se ocupa de reducir la concentración de lignina (principal degradación). Este procedimiento se realiza a temperatura y presión ambiente. La principal desventaja de este tratamiento es que se requiere grandes cantidades de ozono y el proceso encarece.
- Hidrólisis ácida: este tratamiento destaca por mejorar la obtención de azúcares fermentables. Se emplean frecuentemente estos ácidos: HNO_3 , HCl , H_2SO_4 y H_3PO_4 . En este caso, dependiendo de la muestra las condiciones de temperatura, presión y concentración varían. Aunque este método resulta efectivo para la hidrólisis de la celulosa, no se consigue el mismo resultado con la lignina. Los principales productos de la hidrólisis ácida de la celulosa son la celobiosa, xilosa y glucosa.
- Hidrólisis alcalina: los reactivos más usados en este tratamiento NH_3 , CaO , Ca(OH)_2 y NaOH . Se necesitan temperaturas menores que en el caso anterior, pero las reacciones duran más tiempo. Estos compuestos provocan la degradación del éster, destruyendo la estructura de la lignina. El inconveniente es que algunas bases utilizadas se transforman en su correspondiente sal y ya no se puede recuperar.

- Disolventes orgánicos: se emplean por ejemplo acetona, metanol, etilenglicol y alcohol tetrahidrofurano, con catalizadores ácidos. En este caso, la fracción fibrosa de la celulosa se transforma en una disolución acuosa de glucosa muy concentrada, obtenida a través de hidrólisis enzimática ⁹.

Para que el analito de interés, en este caso Ag, esté en el estado óptimo para proceder con el análisis, tiene que estar totalmente disuelto. Este trabajo se centra en un tratamiento concreto de los descritos anteriormente. Por tanto, para destruir la mayor parte de materia orgánica se usarán medios ácidos y temperaturas elevadas. Los iones metálicos que se encuentren agregados a la muestra inicial, gracias a las disoluciones ácidas pasarán a la disolución y es en estas, donde serán analizados por absorción atómica de llama. Debido precisamente a que se trata de determinar un analito metálico y que los disolventes son ácidos inorgánicos, es el método que más favorece las lixiviaciones y que la plata pase de estar incorporada a la muestra sólida a disolución.

Eligiendo el método con el que más plata pase a la disolución, que posteriormente será medida por FAAS, se conseguirá un valor más próximo al real de concentración de plata en las muestras de celulosa.

- Determinación de la plata total y disuelta liberada en agua

La lixiviación es un proceso por el cual se extrae un soluto o varios de un sólido, utilizando un disolvente líquido. El proceso se denomina extracción si la sustancia de interés es la que pasa al disolvente, o lavado, si lo que se pretende disolver son las impurezas. En conclusión, la base de la lixiviación es la solubilidad.

Entonces, para conseguir una lixiviación eficiente el soluto tiene que ser más afín a la fase líquida que a la sólida, donde se encontraba inicialmente.

El procedimiento a seguir para la realización de la lixiviación de plata en agua se puede resumir en los siguientes pasos:

1. Pesar 500 mg de la muestra de celulosa y llevarla a un vaso de precipitados o tubo Falcon.
2. Adición 50 mL de agua ultrapura.
3. Agitación mecánica durante distintos intervalos de tiempo, a temperatura ambiente.
4. Centrifugación a 5000 rpm durante 17 minutos.
5. Coger 2 mL de sobrenadante tras haberse completado la centrifugación.
6. Dilución 1:5 HNO₃ al 1%.
7. Análisis de las muestras mediante FAAS.

Se tomaron tres alícuotas de la muestra de celulosa para desarrollar el procedimiento expuesto anteriormente, en diferentes tiempos. En la tabla 3 se expone el peso de éstas alícuotas con su respectivo tiempo de lixiviación.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Pesada (g)	0,5375	0,5101	0,5358
Tiempo lixiviación (min)	10	60	240

Tabla III. Diferentes alícuotas de la muestra de celulosa.

Una vez realizados todos los pasos sobre estas alícuotas, el análisis mediante FAAS nos dan los siguientes valores medios de absorbancia (Tabla 4).

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Tiempo (min)	10	60	240
Absorbancia	0,0373	0,0630	0,0577

Tabla IV. Valores medios obtenidos mediante FAAS.

- Métodos de digestión de la materia orgánica

Este apartado del trabajo corresponde a la parte bibliográfica, en la que la información expuesta debería haber sido comprobada experimentalmente. Por tanto, se basa en observaciones y ensayos realizados en muestras orgánicas en las que se determinaba también el contenido de Ag y a partir de éstas, se concluye cuál debe ser el método más apropiado para el análisis.

En las disoluciones ácidas de celulosa se observan cambios de color y textura, debido a la degradación de las estructuras hemicelulósicas, que se atribuye a una hidrólisis causada por la susceptibilidad de estas a los ácidos minerales^{9,10}. Los distintos métodos son:

- **HNO₃:** es un ácido oxidante. Se pesan 0,01 g de celulosa y se llevan a 2,5 ml de ácido nítrico 69%. La lixiviación se realiza aproximadamente a 80°C y se observará que la disolución toma un color ámbar y aparecerá espuma blanca por la digestión de la materia orgánica. Durante la reacción se liberarán vapores nitrosos. Hay que calentar la disolución hasta que finalmente se observe translucidez en esta (aproximadamente 90 minutos de reacción). Tras completar este paso se enfría y se lleva a un matraz (volumen 5 mL) donde se enrasará con HNO₃ 5%. Experimentalmente la muestra estaría lista para analizar mediante FAAS.

- **HNO₃ y H₂O₂:** Mezcla de ácidos con proporción 4:1. Se medirán también 0,01 g de muestra y se llevarán a 2,5 mL de HNO₃ 69% y H₂O₂ 30%. Las observaciones tras realizar esta lixiviación serán similares a las descritas en el método anterior.
- **HNO₃ + HClO₄:** Se pesará la misma cantidad de celulosa y se lleva a 2,5 mL HNO₃, 69%. También se liberarán vapores nitrosos con un color anaranjado. Se calienta la reacción y una vez obtenida prácticamente la sequedad total de la muestra, se añade HClO₄ gota a gota. Se necesita esta precaución porque la mezcla de estos ácidos puede ser explosiva si se contiene mucha materia orgánica. Se deja enfriar la disolución y se lleva al matraz de 5 mL enrasando con H₂O mili-Q. Ya se podría proceder a la medida mediante FAAS.
- **HNO₃ + HCl:** Se forma complejos insolubles de plata por la presencia del HCl en la disolución. Se miden 0,01 g de muestra y se llevan a 2 mL de HNO₃, 69% y se añade después 1 mL de HCl al 37%. Como en el primer método se observará un cambio de color ámbar al calentar a 80°C, generación de espuma blanca y liberación de gases nitrosos. Además, debido al HCl también habrá vapores de cloro. Cuando no se observa más liberación de gases nitrosos y la disolución torna a un color amarillento (posible formación de FeCl₃.6H₂O), se puede dejar enfriar. Se traspasa a un matraz y se enrasa con HNO₃ 5% y posteriormente se mide.
- **HCl:** Se pesan 0.01g de celulosa y se llevan a 2,5 mL de HCl 37%. Se calienta la disolución a 80°C hasta que tome un color negro. Se realizará una centrifugación ya que no se produce digestión de la materia orgánica. Aparecerá un precipitado y una capa surfactante encima del sobrenadante, por lo que no se podrá realizar medida mediante FAAS ²¹.

No se ha expuesto el resultado de la disolución con la mezcla de HNO₃ y H₂SO₄, debido a que el ácido sulfúrico actúa como catalizador de la producción de nitrato de celulosa, compuesto sólido también llamado algodón pólvora, que podría resultar peligroso en la medición con espectrometría de absorción atómica en llama.

En el apartado posterior de resultados y discusión, se expondrá las razones por las que el mejor método para trabajar la muestra y determinar la cantidad de analito, es la lixiviación con HNO₃ únicamente. Una vez elegido éste método, experimentalmente, se tendrían que haber realizado lixiviaciones a distintos tiempos de reacción y con porcentajes crecientes de ácido nítrico. Con el objetivo de optimizar el método y obtener los resultados más favorables posibles.

5. RESULTADOS DE LOS MÉTODOS DE LIXIVIACIÓN

- Parte experimental: Lixiviación con agua

Los valores obtenidos experimentalmente se interpolan en la recta de calibrado ($y=0,0663x + 0,0057$) que se obtuvo mediante las disoluciones patrón. De esta manera se consigue el valor de la concentración de las muestras en unidades de $\mu\text{g/mL}$.

En teoría, en la última muestra se debería haber obtenido el valor de absorbancia más alto, por lo que hay que calcular el intervalo de confianza para comprobar si los dos últimos valores de absorbancia son comparables estadísticamente o no.

Esto nos permite conocer de antemano en qué intervalo, en torno a uno o un promedio de varios valores medidos, se espera con cierta probabilidad que esté contenido el valor verdadero.

El intervalo de confianza no es otra cosa que la incertidumbre asociada al valor medio. Establecer dicha incertidumbre depende de la certeza que se esté dispuesto a aceptar, normalmente se considera que existe una probabilidad del 95% de encontrar el valor verdadero dentro del intervalo.

$$\mu = \bar{x} \pm t_{n-1} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Donde t depende del número de medidas (debido a los grados de libertad) y del nivel de confianza. Para $n=3$ y un nivel de confianza del 95%, $t = 4,3$.

En la tabla 5 se exponen los valores de concentración de las distintas muestras con sus respectivos intervalo.

	[Ag total] $\mu\text{g/mL}$
Muestra 1	$1,999 \pm 0,091$
Muestra 2	$3,621 \pm 0,157$
Muestra 3	$3,284 \pm 0,240$

Tabla V. Concentración de las muestras tras la lixiviación en agua

Estadísticamente los valores de concentración de las muestras 2 y 3 no son comparables. La primera deducción es que no hace falta que la lixiviación se produzca en intervalos de tiempo altos ya que con 1 hora se alcanza la solubilidad total de la plata en el agua.

Por otro lado, la diferencia en estos dos valores puede surgir de la dispersión en el tamaño de partícula en el paso de centrifugación. Al centrifugar las partículas de mayor tamaño quedan en el fondo y las más pequeñas arriba, entonces al coger el sobrenadante, esto podría causar una mayor incertidumbre en los resultados.

Las técnicas de separación por tamaños más destacadas son el fraccionamiento en flujo mediante campos (FFF), métodos cromatográficos y electroforéticos. Se usan habitualmente porque se pueden utilizar con detectores variados y tienen muchas aplicaciones debido al amplio rango de separación de tamaños y baja perturbación de la muestra. Sin embargo, también se pueden emplear otras técnicas para la separación de nanoparticulas de plata como diálisis o filtración por membrana. Para purificar AgNPs se usa la centrifugación debido al bajo coste y la facilidad de manejo. Sin embargo, como se ha nombrado anteriormente, durante la centrifugación puede tener lugar una agregación no deseada o una obturación del filtro, lo que podría implicar distorsión en los resultados.

- Parte bibliográfica: Digestión ácida de materia orgánica

Se descartan los métodos con HNO_3/HCl y únicamente HCl debido a la influencia de los cloruros al formar complejos insolubles de plata, ya que aportan complejidad al procedimiento y se tendrían que añadir etapas para una establecer una separación clara de fases.

Si se hubieran podido realizar las lixiviaciones experimentalmente, se podría determinar más específicamente la influencia de cada uno de los disolventes utilizados en las medidas mediante FAAS.

Como se ha comentado, las observaciones serían muy similares en los métodos de $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ y solamente HNO_3 debido a la sensibilidad y cantidad de muestra elegida, por lo que se descarta el primer método de mezcla.

Algo similar ocurre con la mezcla $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$, ya que usando este procedimiento tampoco se observa una mejora de los resultados. Por tanto, teniendo en cuenta todos estos aspectos, se concluye que el método indicado es realizar la lixiviación usando únicamente ácido nítrico.

Por último, debido a la capa surfactante que aparece al usar HCl este método obviamente no se podrá llevar a cabo porque no se puede realizar la medida mediante FAAS, ya que podría incluso llegar a taponar la sonda del espectrofotómetro.

Trabajando con el procedimiento de HNO_3 se obtiene el contenido de Ag total en cada una de las muestras. Si se desea distinguir entre la plata que se encuentra en forma iónica y la que está nanoparticulada, habrá que trabajar con ácido clorhídrico. Esto se debe a que la plata iónica que se encuentre en disolución reaccionará con los aniones cloruro, precipitando AgCl . Por tanto, la plata que quede en disolución no habrá reaccionado con los aniones ya que estará en forma nanoparticulada y restando el precipitado de la cantidad de plata total obtenida anteriormente, tendremos dicho valor ^{13,14}.

6. ESTUDIO DEL EFECTO MATRIZ Y RECUPERACIÓN

- Estudio del efecto matriz

El efecto matriz es el efecto total de los componentes de la muestra distintos del analito. Este efecto se traduce en la diferencia de sensibilidad que aparece cuando el calibrado se prepara en un disolvente, frente a uno preparado en exactamente el mismo entorno de la muestra. Entonces, para determinar su influencia hay que comparar dos métodos de calibración: calibración normal y adición estándar.

En la calibración, como hemos visto, se obtiene una señal en función de la concentración de analito y al representar gráficamente los datos obtenidos y ajustarlos a una ecuación se obtiene la recta de calibrado. Para este tipo de resultados el método de regresión más utilizado es el de mínimos cuadrados. Para conocer la concentración de analito en la muestra analizada únicamente hay que sustituir la señal de la misma, en la ecuación de calibrado. Siempre considerando los factores de dilución.

Sin embargo, la adición estándar se aplica cuando es complicado duplicar la matriz de la muestra. Consiste en añadir a la muestra una cantidad conocida de disolución estándar de analito. Se cogen dos porciones de muestra y una se mide como habitualmente, y a la otra se le añade una cantidad conocida de analito. La obtención de ambas señales se usa para calcular el contenido de analito en la muestra ²².

La pendiente de la recta de calibración de un método relaciona la señal y la concentración, es decir, el cambio producido en la señal cuando la concentración varía en una unidad. Entonces, la diferencia entre las pendientes de los dos métodos explicados en los párrafos anteriores, indica la presencia de efecto matriz (efecto indeterminado de las especies presentes en la muestra y que afectan a la sensibilidad de la determinación).

Por tanto, para determinar que no existen diferencias significativas entre calibración normal y adición estándar se aplica el test T de significación (medición de exactitud). La hipótesis nula H_0 establece que los dos métodos dan el mismo resultado $\mu_1 = \mu_2$.

Se poseen varias fórmulas para calcular el test estadístico t:

- Cuando se comparan el resultado experimental obtenido y con otro considerado verdadero, se emplea:

$$t_{exp} = \frac{|\bar{x} - \mu|}{s} \sqrt{n}$$

- Sin embargo, cuando se comparan dos resultados experimentales, como sería el caso de este trabajo, asumiendo que las desviaciones estándar no varían en gran medida:

$$t_{exp} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

$$s = \sqrt{\frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{(n_1+n_2-2)}}$$

- Cuando se ha determinado mediante el test F que las desviaciones estándar son significativamente diferentes, t se calcula de esta manera:

$$t_{exp} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

Donde los grados de libertad se calculan así:

$$v = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\left(\frac{s_1^4}{n_1^2(n_1-1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2(n_2-1)}\right)}$$

Si el valor de t experimental es mayor al tabulado, considerando los grados de libertad adecuados en cada uno de los tres casos y al nivel de confianza deseado, se rechazará la hipótesis nula H_0 y finalmente se concluye que los resultados difieren.

- Errores proporcionales

Los errores proporcionales dependen de la cantidad de variación que haya en una variable específica. Para designar la posible existencia de estos en el procedimiento realizado, hay que comparar las pendientes de las rectas obtenidas en los distintos experimentos que se desarrollen.

Se obtendrán rectas del tipo $y=mx + b$, donde el valor m es la pendiente. Si los valores de m de las distintas rectas varían mucho, se dice que existen errores proporcionales (por ejemplo si se habla de las impurezas presentes, el error será proporcional al tamaño de muestra que se utilice en el análisis).

- Interferencias

En espectrometría de absorción atómica por llama se pueden encontrar tres tipos de interferencias:

- Interferencias físicas: son sustancias capaces de modificar las propiedades físicas de la disolución de la muestra (por ejemplo densidad o viscosidad), es decir, influyen en el rendimiento de nebulización ya que se puede modificar el tamaño medio de las gotas formadas al nebulizar. Se eliminan mediante adición estandar.

También hay que tener en cuenta los sólidos disueltos, ya que pueden incluso llegar a obturar el capilar y alterar el caudal de aspiración. Únicamente hay que tratar la muestra para solucionar este problema.

- Interferencias espectrales: Hay varios tipos dentro de este grupo.

Distintos átomos. Aunque son menos probables, se refiere a elementos que tienen absorción a la misma longitud de onda que el analito que se quiere analizar. Se pueden evitar la longitud de onda de medida a pesar de que se pierda un poco de sensibilidad en la determinación.

Especies moleculares con espectros no estructurados. En ocasiones especies presentes en la muestra no llegan a atomizar, formándose especies moleculares o fragmentos, que pueden absorber a la misma longitud de onda que el analito, o incluso, ser excitadas y emitir. Los espectros de las especies moleculares dan lugar a bandas muy anchas, a diferencia de los de átomos. Este tipo de interferencias se pueden eliminar usando una lámpara de deuterio (D_2).

Especies moleculares con espectros estructurados. En algunas ocasiones, los espectros moleculares aparecen como un conjunto de líneas. Estas corresponden con transiciones rotacionales entre el nivel fundamental y el excitado. Estas interferencias no se eliminan con lámpara de deuterio porque se obtienen malos resultados, se suele emplear la autoabsorción de la lámpara de cátodo hueco (dispositivo incorporado en algunos equipos).

- Interferencias químicas: se refiere a las sustancias que forman parte de la muestra e impiden la atomización del analito. Hay dos tipos.

En primer lugar los compuestos que favorecen o perjudican la ionización del analito y este inconveniente se soluciona añadiendo un tampón de ionización (alcalino en exceso). Hay que destacar que este tipo de interferencia altera el rango de respuesta lineal.

Por otro lado, están las sustancias capaces de alterar el rendimiento de atomización. Pueden ser tanto aniones que forman especies estables en llama como cualquier otra molécula que pueda formar sustancias con especial dificultad de disociación. En este caso se pueden corregir mediante adición estándar o incluso utilizando agentes liberadores y protectores (por ejemplo, EDTA ¹¹).

- Estudio de la recuperación

La exactitud se expresa como la diferencia entre el valor real y el resultado obtenido en la medida. Este parámetro se evalúa mediante ensayos de recuperación. En éstos se comprueba que el método de disolución es el correcto, verificando que la matriz de la muestra no da lugar a error sistemático.

Los criterios de aceptación en los ensayos de recuperación son:

- El porcentaje de recuperación debe estar entre el $100\% \pm 4s$, donde la s es la desviación estándar del resultado.
- Al crear una gráfica con la cantidad total obtenida en el ensayo frente a la cantidad de analito añadida la pendiente tiene que tener un valor mayor o igual a 0,96 y el intercepto debe ser idéntico a la concentración inicial.

El porcentaje de recuperación se halla con la siguiente fórmula: $\%R = (X/X_a) * 100$, donde X es la cantidad de analito obtenido y X_a la cantidad de analito agregado. Tras calcular $\%R$ y realizar la gráfica, habrá que ver si cumplen las dos condiciones descritas anteriormente.

7. CONCLUSIONES

1. Se ha establecido, experimentalmente, un método analítico para la determinación de Ag mediante espectroscopia de absorción atómica por llama. Se ha caracterizado desarrollando términos de sensibilidad, precisión, repetibilidad y exactitud. Se pueden ver estos datos en la tabla II:

Parámetro	Valor ($\mu\text{g/mL}$)
Rango lineal	0-10
Sensibilidad	0,000129
LD	0,038697
LC	0,128988
Repetibilidad (%)	41

Tabla II. Parámetros analíticos generales

2. Se han estudiado distintos métodos de lixiviación de Ag en celulosa, determinándose bibliográficamente, que el más adecuado es digestión ácida con HNO_3 , debido a que es un proceso eficiente para extraer el analito en una sola etapa; las condiciones adecuadas son 80°C y 90 minutos de duración.
3. Se ha realizado un estudio previo, experimental, mediante lixiviación de plata en celulosa con agua, en la que los datos de concentración para tiempos de 60 y 240 minutos deberían ser equivalentes. Concluyendo que el error ha podido ocurrir por la separación de tamaños de las nanoparticulas de plata al centrifugar.
4. Queda abierto el estudio de la influencia de los cloruros en la determinación de plata mediante la técnica FAAS por la formación de complejos clorados.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Chytilk, R. et al. (2014) 'Vzhled jako kognitivní zkratka v politickém uvažování: Experimentální studie vlivu stereotypů na hodnocení politiků v prostředí se silnou přítomností politických témat', *Sociální studia / Social Studies*, 11(1), p. 81. doi: 10.5817/soc2014-1-81.
2. Ganchoz, H. G. and Luna, R. A. (2013) 'Obtención De Un Nanocompuesto Estructurado Por Nanocelulosa Y Dopado Con Nanopartículas De Plata (AgNPs) Con Actividad Antibacterial Y Cicatrizante, Utilizando Como Materia Prima Los Residuos De Banano: Raquis Y Cascara (Musa Acuminata).', *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), pp. 1689–1699. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
3. Poitras, E. P. et al. (2015) 'Development of an Analytical Method for Assessment of Silver Nanoparticle Content in Biological Matrices by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry', *Biological Trace Element Research*, 163(1–2), pp. 184–192. doi: 10.1007/s12011-014-0141-2.
4. Ovalle, S., Blanco, C. and Combariza, M. (2013) 'nanopartículas de plata sobre fibras de fique In situ synthesis of silver nanoparticles on fique fibers Síntese in situ de nanopartículas de prata em fibras de fique Materiales y métodos', *Revista Colombiana de Química*, 42(1), pp. 1–8.
5. Manual de la llama Perkin-Elmer. Ciencias Zaragoza, Ag, Standard Atomic Absorption Conditions for Ag, 1982.
6. Beaty, R. D. (1978) 'Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrometry', p. 49.
7. Perkin Elmer Inc (1996) 'Analytical methods for atomic absorption spectroscopy', *Analytical Methods*, p. 216.
8. B.Welz,M.Sperling.Atomic Absorption Spectrometry. Willey-VCH, 3^ºedición,1999,553.

9. Martínez Rendo, C. (2015) 'Hidrólisis ácida de la celulosa: magnitud del problema, solución y extensión de la vida útil del papel', IV Congreso Iberoamericano y XII Jornada de Técnicas de Reparación y Conservación del Patrimonio, (Figura 1), pp. 411–420.
10. Morales De La Rosa, S. (2015) 'HIDRÓLISIS ÁCIDA DE CELULOSA Y BIOMASA LIGNOCELULÓSICA ASISTIDA CON LÍQUIDOS IÓNICOS MEMORIA Para aspirar al grado de', p. 15.
11. Barve, K. H., Laddha, K. S. and Jayakumar, B. (2010) 'Extraction of saponins from safed musli', *Pharmacognosy Journal*, 2(13), pp. 561–564. doi: 10.1016/S0975-3575(10)80060-4.
12. Alberini, I. C. (2012) 'Biotechnological pretreatment of alternative raw materials for the obtainig of cellulose spherical', pp. 1–155.
13. Considerations, T. *et al.* (2002) 'Producción de Bioetanol', *El Ecologista*, 589(42), pp. 284–289.
14. Hernández, L. L. and Ortiz Moragón, J. (2016) 'Optimización De Un Procedimiento De Digestión En Muestras Ambientales Con Horno Microondas Y Su Aplicación a La Separación Radioquímica Del Po-210.'
15. Rac-Rumijowska, O. *et al.* (2018) 'Influence of Bulk Silver Nanoparticles on Surface Layer Properties in Nanocomposite Cellulose Fibers', *Proceedings of the International Spring Seminar on Electronics Technology*, 2018-May, pp. 3–7. doi: 10.1109/ISSE.2018.8443676.
16. Yang, Xiupei *et al.* (2017) 'Cloud point extraction-flame atomic absorption spectrometry for pre-concentration and determination of trace amounts of silver ions in water samples', *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(3), pp. 589–594. doi: 10.1016/j.sjbs.2017.01.030.
17. J.N.Miller, J.C.Miller. Statics and Chemometrics for Analytical Chemistry, Prentice Hall, 6º edición, 2010. Pag 125 para LD, 43-62 rango lineal.

18. K.D.Daskalakis, T.P.O' Connor, A.Crecelius. Evaluation of Digestion Procedures for determining silver in mussels and oysters. (Eds.: Environ Sci. Technol.), 1997, 31(8), 2303-2306. DOI: 10.1021/es9608959
19. "Procedimientos para la disolución de muestras". I.Analítico, Universidad central de Venezuela, Caracas, 2006, 2-5.
20. A.Vogel.Química Analítica Cuantitativa: Teoría y Práctica, 2º edición, Vol.II, Cap. IV.Kapelust, Buenos Aires, 1969.
21. R.M. Smith, A. E. Martell. Critical Stability Constant, Vol 4: Inorganic Complexes Pleuteau. (Eds.: Springer Science + Business Media), New York, 1976, 107.
22. G.R.Bruce, P.S.Gill. Estimates of Precision in a Standard Additions Analysis, Journal of Chemical Education, 76, 1999, 805-807.
23. "Diario Oficial de la Unión Europea" 275/38 20.10.2011/696/UE Recomendación de la Comisión de 18 de octubre de 2011 relativo a la definición de nanomaterial. Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo, al Consejo y al Comité Económico y Social Europeo. Segunda revisión de la normativa sobre los materiales.
24. Marambio-Jones, C. Hoek, E.M. A review of antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. (Nanopart Res.) 2010, 12: 1531-1551. DOI: 10.1016/j.cca.2010.08.016.
25. W.E.Kline, H.S.Flogler. Dissolution Kinetics: Catalysis by Strong Acids, Journal of Colloid and Interface Science, University of Michigan, 82, 1, 1981, 93-102.
26. Maqusood A. Silver nanoparticle applications and human health, Clinica Chimica Acta, Vol.411, Issues 23-24, 2010, 1841-1848; DOI: 10.1016/j.cca.2010.08.016.
27. M. Repetto. Toxicología avanzada, Díaz de Santos S.A., Madrid, 2009, 13.

