

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
ESCUELA DE POSGRADO



Título

Validación de un método colorimétrico basado en nanopartículas de oro para la determinación de plomo (Pb^{+2}) en muestras de agua para uso y consumo humano

TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN QUÍMICA

AUTOR

Miguel Omar Villanueva Villanueva

ASESOR:

DR. YVES PAUL COELLO DE LA PUENTE

Marzo, 2018



A mi madre Mery

A mi padre Claudio

A mi esposa Gaby

Mi familia

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a todos los que ayudaron y me dieron la fuerza para poder concluir satisfactoriamente esta etapa de mi vida, la Maestría en Química.

Agradezco a mi madre Mery, a mi padre Claudio y a mi esposa Gaby por ser mi principal motivación, por siempre darme fuerzas para seguir, y por confiar siempre en mí.

Agradezco a CIENCIA ACTIVA de CONCYTEC por los Programas de Maestría en Universidades Peruanas, mediante el Convenio 231-2015 FONDECYT, por el apoyo brindado mediante la financiación de estudios de Maestría en Química de la PUCP, el cual es una gran oportunidad para los jóvenes que desean adquirir más conocimientos de especialidad en las ciencias.

A los laboratorios de la Sección de Química de la PUCP, en especial a mi asesor el Dr. YVES PAUL COELLO DE LA PUENTE quien fue la pieza primordial y contribuyó a lo largo de los 2 años por su apoyo a que este trabajo pueda concretarse.

A la Dra. YULAN HERNANDEZ GARCIA y mis compañeros de investigación Lorena Amelia Veliz Portal y Glibver Jose Vasquez Villafana.

A la Dra. Patricia Morales Bueno por el apoyo en el ámbito académico, en la gestión de reactivos, materiales, ensayos y por sus consejos.

A los miembros del jurado.

A la Lic. Milka Cajahuanca Collao por el apoyo en la realización de los análisis de espectroscopía ultravioleta-visible.

Al Sr. Francisco Huamán por el apoyo en la gestión de los materiales y reactivos requeridos para la realización del presente trabajo.

A la Srta. Ana Farfán y compañía de la secretaría del programa de Química, por la gestión de recursos y documentación.

A los amigos de la Maestría por sus consejos, sugerencias y momentos compartidos.

A todas aquellas personas que de una u otra manera colaboraron en la realización del presente trabajo en el transcurso del tiempo de estudios.

AGRADECIMIENTO ESPECIAL A CONCYTEC

Agradezco a CIENCIA ACTIVA del Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC), que en convenio con la Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP) me brindó la beca integral para cursar mis estudios de maestría (convenio N° 231-2015 de FONDECYT).



RESUMEN

El plomo (Pb^{+2}) es un contaminante ambiental de alto riesgo para la salud. La OMS establece un valor límite máximo permisible de plomo en el agua potable de 48.3 nM. En contraposición, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) describe efectos nocivos en el desarrollo neurológico a niveles de 10.1 nM de plomo en agua para el consumo humano. En la industria de los laboratorios analíticos, la cuantificación de Pb^{+2} en agua para uso y consumo humano está dominada por métodos basados en AAS, ICP/MS y ICP/OES. Estas metodologías carecen de sensibilidad para los niveles de concentración descritos por la EFSA. La metodología propuesta se basa en un sensor químico a partir de nanopartículas de oro de 14 nm de diámetro funcionalizadas con ácido maleico, capaz de detectar y reconocer al Pb^{+2} en solución de manera específica y selectiva, mediante la alteración del plasmón de resonancia de superficie localizado de las nanopartículas de oro como señal analítica detectable mediante espectrofotometría UV-Vis. La calidad del agua puede ser controlada a través de la medición de contaminantes ambientales por métodos que deben pasar previamente por una validación metodológica para brindar confiabilidad en los resultados analíticos. Entonces, debe validarse el método evaluando el desempeño de la metodología y estimando la incertidumbre del resultado. La validación demuestra que el método es lineal en un rango de concentraciones de 2.30 a 100 nM de Pb^{+2} con un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9948. La estimación de los límites de detección y cuantificación son 0.70 nM y 2.30 nM respectivamente. El método es veraz, al obtener 101.0% de recuperación para niveles de Pb^{+2} de 10 nM. Los interferentes estudiados en este trabajo no son fuente de error para los límites máximos permisibles (LMP) para la matriz de agua de uso y consumo humano descritos por el Ministerio de Salud del Perú.

Índice general

Índice general.....	4
Índice de figuras.....	7
Índice de tablas.....	9
Abreviaturas.....	11
1. Introducción.....	12
2. Objetivos.....	14
2.1. Objetivo General.....	14
2.2. Objetivos Específicos.....	14
3. Marco teórico.....	15
3.1. Plomo.....	15
3.1.1. Efecto del plomo en la salud.....	15
3.1.2. Situación actual en la legislación del plomo.....	16
3.2. Nanopartículas de oro.....	16
3.2.1. Síntesis de nanopartículas de oro.....	16
3.2.2. Caracterización de las nanopartículas de oro por espectrofotometría UV-Visible.....	18
3.2.3. Estabilidad de las nanopartículas de oro.....	19
3.3. Sensores químicos a base de nanopartículas de oro.....	20
3.3.1. Sensores de Pb ²⁺ basados en nanopartículas de oro.....	21
3.4. Validación.....	22
3.4.1. Requisitos estadísticos de la validación.....	24
3.4.2. Parámetros de validación.....	25
3.4.3. Estimación de la incertidumbre (U).....	31
3.5. Importancia de la validación.....	33
3.6. Justificación del problema.....	33
4. Hipótesis.....	35
5. Parte experimental.....	36
5.1. Reactivos utilizados, materiales y equipos.....	36
5.1.1. Preparación de soluciones de reactivos.....	37
5.2. Metodología.....	38
5.2.1. Síntesis de nanopartículas de oro.....	38
5.2.2. Caracterización de nanopartículas de oro.....	39

5.2.3.	Protocolo inicial de funcionalización de las nanopartículas.....	39
5.2.4.	Protocolo optimizado de funcionalización de las nanopartículas.	40
5.2.5.	Protocolo inicial de detección de Pb ⁺²	40
5.2.6.	Protocolo optimizado de detección y cuantificación de Pb ⁺²	40
5.2.7.	Muestreo	40
5.2.8.	Requisitos estadísticos de la validación	41
5.2.8.1.	Normalidad de datos	41
5.2.8.2.	Presencia de datos atípicos.....	41
5.2.8.3.	Homogeneidad de varianza	42
5.2.8.4.	Igualdad de medias.....	42
5.2.9.	Parámetros de validación.....	43
5.2.9.1.	Linealidad.....	43
5.2.9.2.	Límite de detección	44
5.2.9.3.	Límite de cuantificación	44
5.2.9.4.	Veracidad.....	44
5.2.9.5.	Precisión	45
5.2.9.6.	Selectividad	46
5.2.10.	Estimación de la incertidumbre.....	47
5.2.10.1.	Incetidumbre del analista	47
5.2.10.2.	Incetidumbre del sesgo	47
5.2.10.3.	Incetidumbre la metodología	47
5.2.10.4.	Combinación de las incetidumbres parciales.....	47
5.2.10.5.	Incetidumbre expandida.....	47
5.3.	Resultados experimentales.....	48
5.3.1.	Síntesis y caracterización de las nanopartículas de oro	48
5.3.2.	Proceso de optimización de la metodología.....	48
5.3.3.	Requisitos estadísticos de la validación	59
5.3.3.1.	Normalidad de datos	59
5.3.3.2.	Homogeneidad de varianza	62
5.3.3.3.	Igualdad de medias	63
5.3.4.	Parámetros de validación y tratamiento estadístico.....	65
5.3.4.1.	Linealidad.....	65
5.3.4.2.	Límite de detección (LD)	67
5.3.4.3.	Límite de cuantificación (LC)	68

5.3.4.4.	Veracidad.....	68
5.3.4.5.	Precisión	70
5.3.4.6.	Selectividad	71
5.3.5.	Estimación de la incertidumbre	73
5.3.5.1.	Identificación de las fuentes de incertidumbre.....	74
5.3.5.2.	Incertidumbre del analista	74
5.3.5.3.	Incertidumbre del sesgo	74
5.3.5.4.	Incertidumbre de la metodología.....	74
5.3.5.5.	Combinación de las Incertidumbres parciales	77
5.3.5.6.	Incertidumbre expandida.....	78
5.3.6.	Informe de validación.....	79
6.	Discusión de resultados	81
6.1.	Optimización del ensayo analítico	81
6.2.	Validación metodológica.....	82
7.	Conclusiones y recomendaciones.....	83
7.1.	Conclusiones.....	83
7.2.	Recomendaciones.....	83
8.	Bibliografía.....	85



Índice de figuras

<i>Figura 1. Nanopartículas de oro en diferentes estados de agregación con ditiotreitól.</i>	16
<i>Figura 2. Síntesis de nanopartículas de oro por el método de Turkevich, a partir de ácido cloroáurico y citrato de sodio.</i>	17
<i>Figura 3. Mecanismo de nucleación-crecimiento para controlar la síntesis de nanopartículas de oro. Los brazos en las nanopartículas representa el agente estabilizador.</i>	18
<i>Figura 4. Relación entre el tamaño de las nanopartículas de oro esféricas y sus respectivas bandas de resonancia del plasmón de superficie localizados.</i>	18
<i>Figura 5. Modelo de doble capa eléctrica para las nanopartículas, las capas fijas y difusas brindan estabilidad a la nanopartícula.</i>	20
<i>Figura 6. Esquema de detección de los sensores químicos a base de nanopartículas de oro.</i>	20
<i>Figura 7. Mecanismo de acción del sensor colorimétrico ante la presencia del analito Pb^{+2} y cambio en el estado de agregación de las nanopartículas de oro.</i>	22
<i>Figura 8. Gráficos de linealidad de respuesta del equipo versus concentración del analito.</i>	26
<i>Figura 9. Gráfico lineal de respuesta del equipo versus concentración del analito a varias pendientes de diferentes sensibilidad.</i>	27
<i>Figura 10. Relación entre exactitud, veracidad y precisión.</i>	28
<i>Figura 11. Diagrama de causa efecto de las fuentes de incertidumbre del método. -</i>	31
<i>Figura 12. Esquema de la síntesis de nanopartículas de oro para la metodología descrita.</i>	39
<i>Figura 13. Espectro de absorbancia en el rango de 400 a 700 nm de las nanopartículas de oro.</i>	48
<i>Figura 14. Espectro de absorbancia en el rango de 450 a 600 nm del sensor en ausencia y presencia de Pb^{2+}.</i>	49
<i>Figura 15. Curvas de calibración para diferentes valores de pH de ácido maleico durante la funcionalización.</i>	50
<i>Figura 16. Curvas de calibración para diferentes valores de pH de la solución de lavado durante la funcionalización de las nanopartículas de oro, las barras representan los errores estándar.</i>	51
<i>Figura 17. Curvas de calibración para diferentes valores de concentración del ácido maleico durante la funcionalización de las nanopartículas de oro.</i>	52
<i>Figura 18. Curvas de calibración para diferentes valores de Concentración de las nanopartículas de oro durante la cuantificación de Pb^{+2}.</i>	53
<i>Figura 19. Curvas de calibración para diferentes valores de la concentración del buffer durante la cuantificación de Pb^{+2}.</i>	54
<i>Figura 20. Curvas de calibración para diferentes valores de tiempo de espera de estabilización para la lectura del ensayo durante la cuantificación de Pb^{+2}.</i>	55
<i>Figura 21. Curvas de calibración para diferentes valores de pH del buffer fosfato durante la cuantificación de Pb^{+2}.</i>	56

<i>Figura 22. Curvas de calibración para diferentes valores de concentración del buffer del ensayo durante la cuantificación de Pb²⁺.</i>	59
<i>Figura 23. Resultados de la prueba de Anderson-Darling.</i>	60
<i>Figura 24. Histograma de los datos de las concentraciones de Pb²⁺.</i>	61
<i>Figura 25. Prueba de Bartlett, grafica de la distribución de las varianzas de los tres grupos.</i>	63
<i>Figura 26. Gráficos de distribución de datos concentración de Pb²⁺.</i>	64
<i>Figura 27. Prueba de Anderson Darling para los residuales.</i>	65
<i>Figura 28. Curva de calibración de Pb²⁺.</i>	67
<i>Figura 29. Gráfico de cajas de la recuperación por el método de adición estándar.</i>	70
<i>Figura 30. Diagrama de Kragten de las fuentes de incertidumbre y su contribución de la metodología propuesta.</i>	78



Índice de tablas

Tabla 1.	Sensores basados en el uso de nanopartículas de oro para la detección de Pb^{+2} .	22
Tabla 2.	Descripción de las condiciones de repetibilidad y reproducibilidad para las réplicas en los ensayos metodológicos.	30
Tabla 3.	Tipos de distribución de datos y sus respectivos factores de cobertura.	33
Tabla 4.	Lista de los reactivos y características utilizados.	36
Tabla 5.	Lista de los software, equipos y características utilizados.	37
Tabla 6.	Hipótesis y criterio de decisión para la verificación de la normalidad de datos en la prueba de Anderson-Darling.	41
Tabla 7.	Hipótesis y criterio de decisión para la detección de datos atípicos en la prueba de Z-score paramétrico.	42
Tabla 8.	Hipótesis y criterio de decisión para la verificación de la igualdad de precisión en la prueba de Bartlett.	42
Tabla 9.	Hipótesis y criterio de decisión para la verificación de la igualdad de las medias en la prueba ANOVA de un factor.	43
Tabla 10.	Hipótesis y criterio de decisión para la estimación de la linealidad de la metodología en el rango de trabajo.	44
Tabla 11.	Hipótesis y criterio de decisión para la verificación de la veracidad de la metodología a través de la recuperación de la adición estándar.	45
Tabla 12.	Hipótesis y criterio de decisión en la estimación de la precisión de la metodología a través de la estimación del RSD.	46
Tabla 13.	Variables de optimización de la metodología, para un rango de trabajo de 0 a 5 μM de Pb^{+2} .	50
Tabla 14.	Parámetros de optimización para diferentes valores de pH de ácido maleico durante la funcionalización de las nanopartículas de oro con ácido maleico.	51
Tabla 15.	Parámetros de optimización para diferentes valores de pH de la solución de lavado después de la funcionalización de las nanopartículas de oro con ácido maleico.	52
Tabla 16.	Parámetros de optimización para diferentes valores de concentraciones de ácido maleico durante la funcionalización de las nanopartículas de oro con ácido maleico.	53
Tabla 17.	Parámetros de optimización para diferentes valores de concentraciones de nanopartículas de oro en la funcionalización de las nanopartículas de oro con ácido maleico.	54
Tabla 18.	Parámetros de optimización a diferentes valores de concentración del buffer fosfato del ensayo en la cuantificación de Pb^{+2} .	55
Tabla 19.	Parámetros de optimización a diferentes tiempos de lectura durante el ensayo en la cuantificación de Pb^{+2} .	56
Tabla 20.	Parámetros de optimización a diferentes valores de pH de buffer fosfato durante el ensayo en la cuantificación de Pb^{+2} .	57
Tabla 21.	Valores de pH finales para las muestras de lectura a diferentes valores de pH de buffer fosfato durante el ensayo en la cuantificación de Pb^{+2} .	57
Tabla 22.	Variables de optimización finales para un rango de trabajo de 0 a 5 μM Pb^{+2} .	58

Tabla 23. Variables de optimización, para un rango de trabajo de 0 a 100 nM Pb ⁺² .	58
Tabla 24. Parámetros de optimización a diferentes valores de concentración del buffer fosfato en la cuantificación de Pb ⁺² , para un rango de trabajo de 0 a 100 nM Pb ⁺² .	59
Tabla 25. Datos para evaluar normalidad de los resultados y la estadística descriptiva.	60
Tabla 26. Datos para la evaluación de los datos atípicos y determinación del valor de Z-score.	62
Tabla 27. Absorbancias y el ratio de A520/A600 de las 3 curvas de calibrado con su estadística descriptiva.	66
Tabla 28. Coeficiente de determinación de las 3 curvas de calibrado.	66
Tabla 29. Datos de blancos matriz para determinación de límites de detección y cuantificación.	68
Tabla 30. Datos de blancos matriz fortificados para la verificación del límite de cuantificación.	68
Tabla 31. Datos de muestras fortificadas y porcentajes de recuperación de la adición estándar con la estadística descriptiva.	69
Tabla 32. Estimación de t-Student 1 muestra experimental, sobre el promedio de los porcentajes de recuperación.	69
Tabla 33. Datos de concentración de Pb ⁺² a nivel bajo y alto para determinar la precisión.	70
Tabla 34. Estimación de límites de repetibilidad y reproducibilidad para el nivel bajo y alto de concentración de Pb ⁺² .	71
Tabla 35. Estimación del RSD experimental y Horwitz para la precisión de la metodología.	71
Tabla 36. Lista de iones interferentes estudiados y los valores de LMP para la matriz de agua para uso y consumo según MINSA.	72
Tabla 37. Estudio de interferencias.	73
Tabla 38. Estimación de la incertidumbre del analista a partir de las desviaciones estándar.	74
Tabla 39. Estimación de la incertidumbre de sesgo a partir del valor de referencia de Pb ⁺² .	74
Tabla 40. Estimación de las incertidumbres parciales de los pasos metodológicos para la determinación de la Incertidumbre de la metodología.	76
Tabla 41. Estimación de las incertidumbres combinadas de los pasos metodológicos para la determinación de la Incertidumbre de la metodología.	76
Tabla 42. Valores de los parámetros requeridos para la determinación de la incertidumbre de la concentración.	77
Tabla 43. Estimación de la incertidumbre de la concentración.	77
Tabla 44. Estimación de la incertidumbre de la metodología.	77
Tabla 45. Estimación de las incertidumbres parciales por factores.	78
Tabla 46. Estimación de la incertidumbre combinada para la metodología propuesta.	78
Tabla 47. Estimación de la incertidumbre expandida de las diferentes concentraciones de Pb ⁺² en la curva de calibrado para la metodología propuesta.	79

Abreviaturas

A	Absorbancia
ANOVA	Prueba de análisis de varianza
AOAC	Asociación de Químicos Analíticos Oficiales
AM	Ácido maleico
CEN	Comité Europeo de Normalización
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
AAS	Espectroscopía de Absorción Atómica
ICP-OES	Espectroscopía de emisión óptica con Plasma Acoplado Inductivamente
ICP-MS	Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente
Fd	Factor de dilución
INACAL	Instituto Nacional de la Calidad
H ₀	Hipótesis nula
H _A	Hipótesis alterna
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
AuNPs	Nanopartículas de oro
AuNPs-AM	Nanopartículas de oro funcionalizadas con ácido maleico
LD	Límite de detección
LC	Límite de cuantificación
LMP	Límite máximo permisible
Límite r	Límite de repetibilidad
Límite R	Límite de reproducibilidad
λ	Longitud de onda
MRC	Material de referencia certificado
MINSA	Ministerio de Salud
ISO	Organización Estándar Internacional
LSPR	Plasmón superficial de resonancia localizado
Pb ⁺²	Plomo
A600/A520	Ratio de las absorbancias a 600nm y 520nm
r ²	Coeficiente de determinación
RSD	Desviación estándar relativa
s	Desviación estándar del grupo
U	Incertidumbre
UP	Ultrapura
UV-Vis	Ultravioleta-visible
VIM	Vocabulario internacional de metrología

1. Introducción

En la sociedad actual en la que vivimos, tanto los alimentos como el agua potable están usualmente contaminados con sustancias nocivas como parte del proceso de producción.¹ La contaminación ambiental debido a metales pesados es de gran interés en la comunidad científica mundial, especialmente en las zonas urbanas donde se suele tener una mayor exposición a estos.^{2,3} Los principales iones de metales pesados como As^{3+} , Cr^{6+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , y Hg^{2+} son tóxicos, aun a concentraciones trazas para los seres vivos.⁴⁻⁸ El plomo (Pb^{2+}) es un contaminante ambiental importante y ocupa el segundo lugar en la lista de sustancias tóxicas que causan mal funcionamiento renal y daño en el cerebro.¹ También ha sido clasificado como agente cancerígeno por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer.⁹ El plomo afecta principalmente al sistema nervioso.¹⁰ Por lo tanto, el nivel de Pb^{2+} en el agua potable apta para el consumo humano no debe ser superior a 10 $\mu\text{g/L}$ o 48.3 nM.¹

Algunos países, entre ellos México y Perú, son los principales productores de plomo de la región.¹¹ El mayor incremento en la producción de plomo se produjo entre los años 1950 y 2000, como consecuencia de su uso como aditivo de la gasolina.¹² A pesar que en la actualidad la gasolina está libre de plomo, otras fuentes son importantes como el reciclaje de baterías y barnizado de cerámicas.¹¹ Industrias mineras y las relacionadas con la combustión del carbón y residuos son fuentes de plomo menos importantes.¹²

El plomo está raramente presente en el agua del grifo.⁹ La contaminación proviene de factores externos como el material de las tuberías, uniones de soldadura o accesorios metálicos. La cantidad de plomo disuelto en las tuberías se favorece con elevadas temperaturas, bajos niveles de dureza del agua y valores de pH ácido.¹³

La principal fuente de contaminación por plomo es la comida y el agua en la población adulta. Los niños son más afectados por la mayor proporción de ingesta por kilogramo de peso y su menor capacidad para la desintoxicación. Al mismo tiempo, ciertos patrones de comportamiento, como llevarse objetos a la boca, aumenta la probabilidad de exposición al plomo.¹²

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) concluyó que aun a una baja concentración de Pb^{2+} en el agua potable apta para el consumo humano de (2.1 $\mu\text{g/L}$ o 10.1 nM), los efectos nocivos en el desarrollo neurológico medidos en la disminución en los valores de coeficiente intelectual,¹⁴ especialmente en los subgrupos sensibles (bebés y exposiciones fetales).¹ Los grupos sensibles carecen de una protección biológica como la barrera hematoencefálica, encargada de proteger al cerebro ante la exposición a sustancias tóxicas, que hasta seis meses después del nacimiento no está totalmente formada.¹²

Varios métodos han sido utilizados para la detección de Pb^{+2} , tales como la espectroscopía de absorción atómica (AAS)¹⁵⁻¹⁷ y la espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP/MS).¹⁸ Si bien estos métodos pueden detectar Pb^{+2} con sensibilidad y precisión, para los niveles de concentración descritos por la EFSA, requieren de instrumentación adicional más sofisticada como la técnica de horno de grafito. Además, sus procesos de preparación de muestras son complicados, costosos y puede exigir de analistas especializados.¹⁹

En ausencia de un límite de exposición seguro de los niños al Pb^{2+} y debido a su capacidad para acumularse en el cuerpo por un largo tiempo, ha surgido un gran interés en la evaluación de los efectos adversos de Pb^{2+} en bajas concentraciones, aun debajo de los límites máximos permitidos (LMP).¹

Los sensores químicos a partir de AuNPs son ampliamente usados en la detección de analitos.²⁰ El mecanismo de detección se basa en las propiedades ópticas de las nanopartículas metálicas que cambian con el estado de agregación del sistema.²¹

La Cooperación Internacional de Acreditación de Laboratorios (ILAC) recomienda al momento de evaluar la competencia técnica de los laboratorios, este debe presentar “métodos y procedimientos de pruebas válidos y apropiados”.²² La validación de un método es un proceso, en el cual se verifica una serie de requisitos y se recopila información para estimar la exactitud, precisión, veracidad, límite de detección (LD) y cuantificación (LC) del método analito estudiado. La finalidad última de la validación corresponde a una necesidad del mercado y su uso habitual en el laboratorio debe ser autorizada formalmente por la persona responsable, a partir de un procedimiento estandarizado.²³



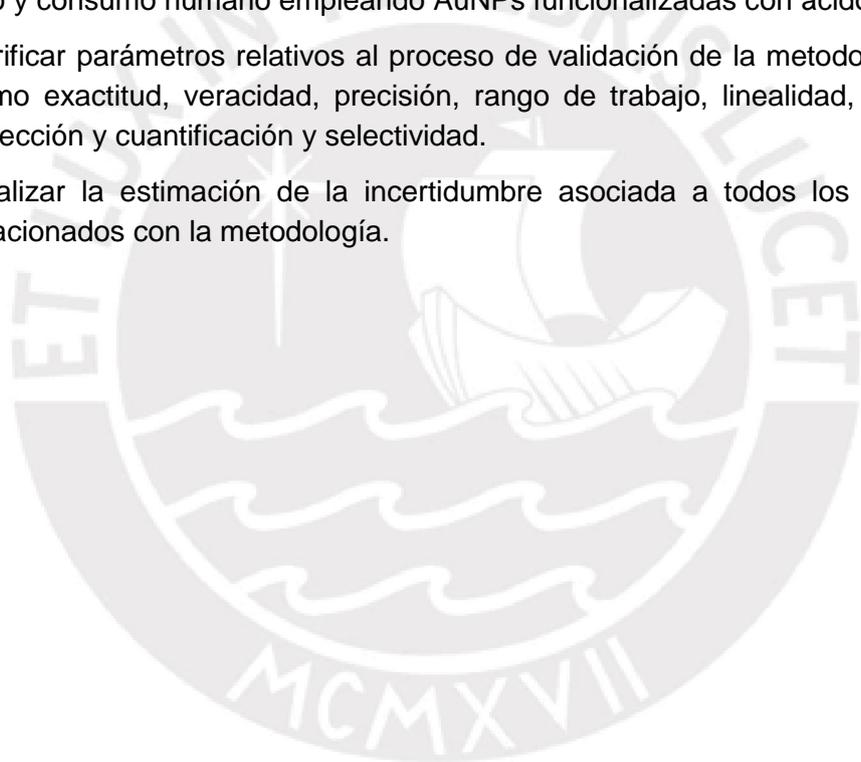
2. Objetivos

2.1. Objetivo General

- Validar una metodología colorimétrica para determinación de plomo (Pb^{+2}) en muestras de agua para uso y consumo humano usando AuNPs oro funcionalizadas.

2.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar las AuNPs por reducción con citrato de sodio y caracterizarlas mediante espectroscopía UV-Vis.
- Desarrollar y optimizar un método colorimétrico, con un rango de trabajo en el orden de nM, para la determinación de plomo (Pb^{+2}) en muestras de agua para uso y consumo humano empleando AuNPs funcionalizadas con ácido maleico
- Verificar parámetros relativos al proceso de validación de la metodología tales como exactitud, veracidad, precisión, rango de trabajo, linealidad, límites de detección y cuantificación y selectividad.
- Realizar la estimación de la incertidumbre asociada a todos los elementos relacionados con la metodología.



3. Marco teórico

3.1. Plomo

El plomo es un metal pesado, con características físicas de un metal suave, azul-gris.⁷ Su uso histórico está relacionado con los combustibles, también en la elaboración de productos como las baterías, tuberías, pintura, entre otros;²⁴ el amplio espectro de usos que tiene el plomo explica su aun presencia en el medio ambiente y la facilidad del contacto de los seres vivos con alguno de los productos derivados.¹⁰

El plomo se encuentra en diversas formas tanto orgánicas como inorgánicas. En su forma orgánica como tetraetilo de plomo, fue usado como antidetonante en los combustibles hasta la década de los años 70.²⁵ Actualmente la contaminación por este tipo de plomo se limita a un contexto ocupacional en zonas de riesgo, como áreas industriales.¹⁰ En su forma inorgánica, principalmente como óxidos de plomo, se encuentra en la pintura antigua, el suelo y varios productos descritos con contenido de plomo como baterías de autos.²⁵

3.1.1. Efecto del plomo en la salud

Más del 90% del plomo presente en el cuerpo humano es retenido en el esqueleto y su degradación puede tomar meses o incluso años. El resto de plomo en el cuerpo se elimina por vías como orina, sudor, cabello y uñas.²⁶

Numerosos estudios epidemiológicos han observado efectos adversos neuroconductuales asociados con la exposición al plomo en la infancia, incluso con un nivel bajo de concentraciones de Pb^{+2} en la sangre $<10 \mu\text{g/dL}$.²⁷ Al respecto, cabe señalar que en los seres humanos, especialmente en los niños, el contacto con plomo es potencialmente peligroso por la capacidad de bioacumulación en el organismo,²⁶ y los efectos irreversibles que genera en la función cerebral, disminuyendo la capacidad de aprendizaje.²⁴

El envenenamiento por plomo en humanos se da por la acumulación de plomo en los órganos del cuerpo, el plomo impide la síntesis de hemoglobina y disminuye el transporte de oxígeno en el cuerpo.²⁶ El plomo afecta la sangre, los riñones, y el sistema nervioso. Los efectos del plomo en el sistema nervioso central se observan en problemas de comportamiento caracterizados por convulsiones o hinchazón del cerebro, puede causar hemorragia cerebral, retraso mental y otras lesiones neurológicas permanentes.²⁶

Los efectos del plomo en el sistema nervioso central son notorios en la disminución de las calificaciones obtenidas en las pruebas de coeficiente intelectual, menor rendimiento en las pruebas estandarizadas y disminución de las tasas de graduación.²⁸ Mas síntomas son atribuidos a presencia de plomo en el sistema nervioso central como síndrome de déficit de atención, problemas de conducta, pérdida de memoria y un rendimiento lingüístico deficiente.²⁸

3.1.2. Situación actual en la legislación del plomo

A finales de los años noventa en el Perú se investigó las concentraciones de plomo en la sangre de las personas en centros urbanos de la capital. Los resultados mostraron contaminación de niños con plomo en la sangre superior a 10 µg/dL en zonas del Callao.²⁴ En Latinoamérica se eliminó el plomo en los combustibles a partir de la Cumbre de los Presidentes de las Américas en Miami en 1994.²⁹

En 2012, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC por sus siglas en inglés) bajaron su nivel de referencia para la exposición de los niños a Pb⁺² de 10 a 5 µg/dL como cantidad máxima permisible de Pb⁺² en sangre.³⁰

3.2. Nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro (AuNPs), están formadas por una suspensión de oro coloidal en un solvente que usualmente es agua y poseen un característico color rojo para dimensiones menores a 100 nm.³¹

Las AuNPs tienen propiedades interesantes a nivel de producción, existen diversas metodologías de síntesis y aplicaciones,³² son consideradas las más estables entre las nanopartículas metálicas.³³ Entre sus propiedades destacan las ópticas y catalíticas que son dependientes del tamaño de partícula y su respectivo estado de agregación mostrado en la figura 1.³³ Las AuNPs poseen propiedades físicas y químicas relacionadas con su tamaño como consecuencia de estructura electrónica específica.³⁴



Figura 1. Nanopartículas de oro en diferentes estados de agregación con ditiotreitól.³⁵

3.2.1. Síntesis de nanopartículas de oro

La síntesis de AuNPs se clasifica en dos enfoques “top down” y “bottom up”, en el primero el oro se descompone hasta obtener el tamaño de partícula deseado y el segundo se basa en una reducción química o biológica de moléculas individuales.³⁶ Los métodos de reducción química, técnicas electroquímicas y de

reducción fotoquímica son los más utilizados por la menor dispersión de tamaño de partícula con respecto a los otros procesos,³⁷ lo que confiere una mayor homogeneidad en las propiedades cuánticas de las AuNPs.

En la síntesis química de nanopartículas por reducción, la literatura menciona la necesidad de una sal de oro, un agente reductor, un agente estabilizador y algún proceso que aporte energía al sistema (calentamiento, irradiación con microondas, etc.).³³ Es de gran importancia para la regulación del tamaño final de las nanopartículas el agente reductor y el agente estabilizador.³⁸

Existen diferentes métodos para lograr la reducción hasta formar las AuNPs, el método de Turkevich-Frens involucra la reducción de oro con citrato de sodio,³⁸ las ventajas de este procedimiento son el bajo costo del citrato de sodio, el uso de agua como solvente, y que esta reacción no genera subproductos que puedan afectar al medio ambiente, lo que lo hace amigable con el medio ambiente.^{36,38}

En esta investigación, la síntesis involucra ácido tetracloroaúrico (HAuCl_4) como precursor de las AuNPs y citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) como agente reductor y estabilizador mostrada en la figura 2.³⁶

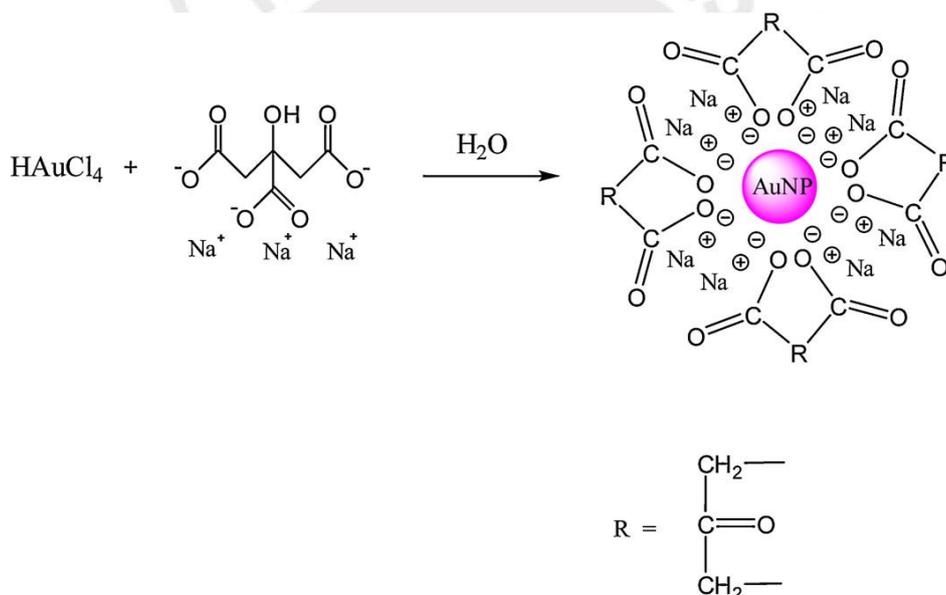


Figura 2. Síntesis de nanopartículas de oro por el método de Turkevich, a partir de ácido cloroaúrico y citrato de sodio.³⁶

Al inicio del proceso, se produce la oxidación del citrato formando dicarboxi acetona y simultáneamente la reducción de los iones Au^{3+} a $\text{Au}^{(0)}$. El citrato de sodio es el agente reductor y modula el pH del sistema (buffer), que es un factor importante en el tamaño final de las nanopartículas.³⁶

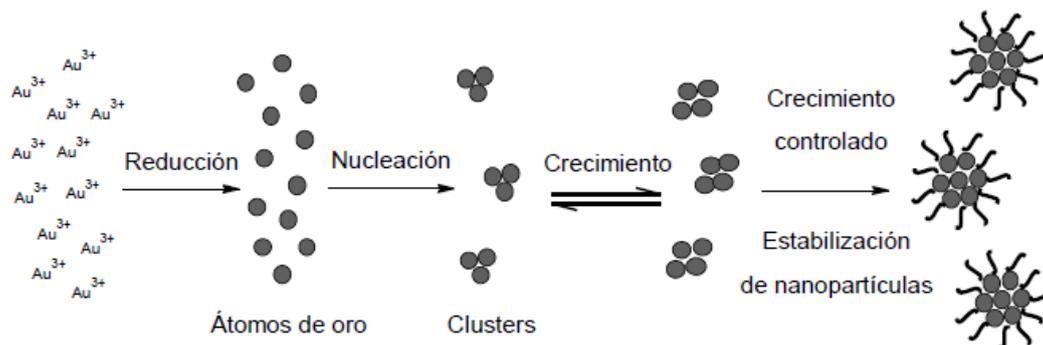


Figura 3. Mecanismo de nucleación-crecimiento para controlar la síntesis de nanopartículas de oro. Los brazos en las nanopartículas representan el agente estabilizador.³³

La formación de AuNPs monomodales en solución puede explicarse mediante el mecanismo de nucleación-crecimiento según el modelo de La Mer,³⁹ mostrado en la figura 3. En el cual se da la reducción de iones Au^{3+} a átomos de Au hasta alcanzar la sobresaturación del medio, donde luego se da un crecimiento controlado hasta la estabilización en el tamaño final de las AuNPs.⁴⁰

3.2.2. Caracterización de las nanopartículas de oro por espectrofotometría UV-Visible

La caracterización de las AuNPs se basa en una propiedad física de las partículas denominada resonancia de plasmones de superficie localizados (LSPR), definida como la oscilación de los electrones libres de la banda de conducción en la superficie de la nanopartícula como consecuencia de absorber radiación electromagnética de una determinada frecuencia en el rango del espectro visible.³²

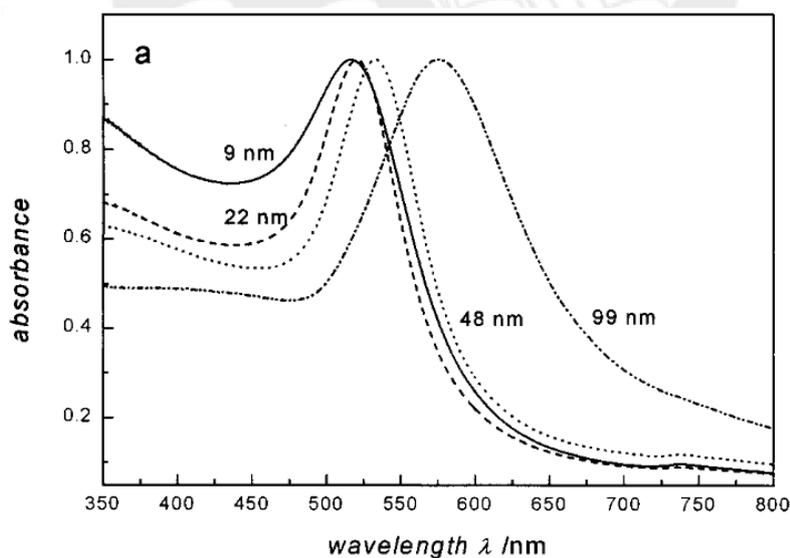


Figura 4. Relación entre el tamaño de las nanopartículas de oro esféricas y sus respectivas bandas de resonancia del plasmón de superficie localizados.⁴¹

El tamaño de las AuNPs están relacionada con su color visible y sirve como una referencia rápida y simple con su tamaño.²⁰ Las AuNPs con tamaño entre 9 - 99 nm poseen bandas de LSPR entre 515 y 585 nm, lo cual las hace fácilmente

reconocibles en el espectro UV-Vis. El espectro UV-Vis permite también estimar la polidispersidad y el estado de agregación de las nanopartículas.⁴² Espectros UV-Vis de AuNPs de varios tamaños se muestran en la figura 4.

3.2.3. Estabilidad de las nanopartículas de oro

La estabilidad de las AuNPs se describe por la teoría DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek)⁴³. Esta teoría considera que las interacciones químicas y físicas entre las nanopartículas pueden expresarse a través de la ecuación general:

$$GT = GA + GR + GH + GS \quad \text{Ecuación 1}$$

donde

GT: Energía libre total de interacciones

GA: Interacciones de atracción

GR: Interacciones de repulsión

GH: Fuerzas de hidratación

GS: Las fuerzas relacionadas con la forma física de las nanopartículas (generalmente esféricas)

La estabilidad de las nanopartículas se debe a que las fuerzas de repulsión entre partículas son más intensas que las fuerzas de atracción, lo que mantiene a todo el sistema estable, en caso contrario se favorece la formación de agregados por efectos de coagulación-floculación.³³ Los agregados son conjuntos de nanopartículas de tamaño mayor (por ende mayor atracción entre sí), que cambia las interacciones entre las nanopartículas y el medio favoreciendo la interacción con las sales y precipitan con el tiempo.

Un modelo químico que explica la estabilización de las nanopartículas es el de la doble capa, mostrado en la figura 5. Este modelo describe la distribución de cargas positivas y negativas alrededor de una nanopartícula formando dos capas sobre un núcleo de nanopartícula metálica.³³ Donde la capa fija está cubierta por una carga positiva y la capa difusa mantiene una carga neutra descrita por una distribución Boltzmann conforme se alejan de la superficie de la nanopartícula.⁴³

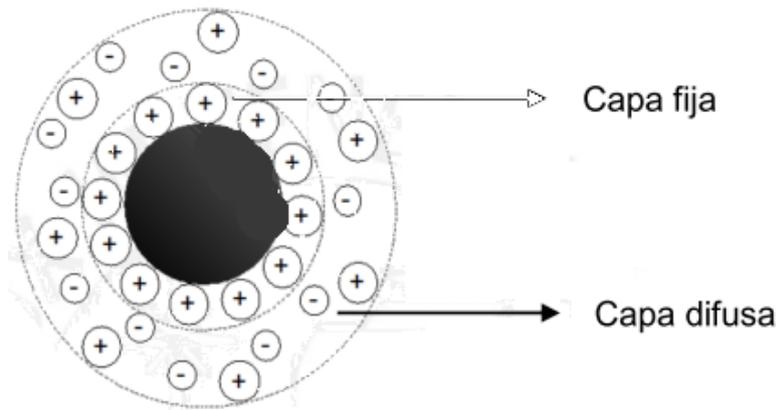


Figura 5. Modelo de doble capa eléctrica para las nanopartículas, las capas fijas y difusas brindan estabilidad a la nanopartícula.³³

3.3. Sensores químicos a base de nanopartículas de oro

Un sensor se define como “un dispositivo capaz de detectar y responder a un estímulo físico o químico, y transformar la correspondiente señal adecuadamente”.⁴⁴ La figura 6 muestra el esquema de detección de los sensores a base de AuNPs, en el cual un elemento de reconocimiento que ha sido funcionalizado sobre la superficie de la AuNPs, es capaz de detectar al analito de manera específica y selectiva (bajo ciertas condiciones controladas), como consecuencia de ello se altera una propiedad que es plausible de medición.²⁰

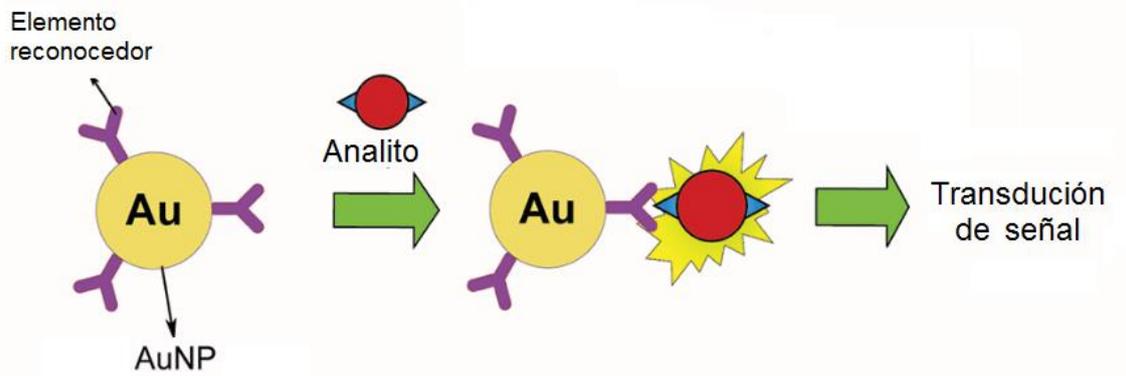


Figura 6. Esquema de detección de los sensores químicos a base de nanopartículas de oro.²⁰

La eficiencia de un sensor químico, es evaluada en términos de una elevada relación señal/ruido, selectividad hacia los analitos a detectar y los bajos niveles de LD que se pueden obtener del sensor.²⁰

La interacción entre el elemento reconocedor y un analito, provoca alteraciones en las propiedades fisicoquímicas de las AuNPs tales como el LSPR. Esta alteración genera una señal o respuesta detectable que es convertida a una señal de fácil procesamiento.²⁰

El uso de AuNPs como sensores químicos abarca un amplio rango de aplicaciones en diferentes tipos de muestras. La detección de cationes metálicos es una de las aplicaciones más conocidas y se basa en la incorporación de agentes quelantes en la superficie de las AuNPs. También se han desarrollado sensores para aniones como el cianuro.⁴⁵ Otras aplicaciones incluyen la detección de pequeñas moléculas orgánicas, oligonucleótidos y proteínas,²⁰ estas se encuentran a menudo asociadas con el campo médico, por ejemplo, la detección de moléculas orgánicas pequeñas de relevancia biológica como la glucosa, la detección de oligonucleótidos y proteínas asociadas con enfermedades genéticas tales como el cáncer.²⁰

3.3.1. Sensores de Pb²⁺ basados en nanopartículas de oro

Se han descrito sensores de AuNPs para la cuantificación de Pb²⁺ que emplean esquemas de detección basados en colorimetría, fluorimetría, dispersión hiper-Rayleigh y dispersión dinámica de luz. La mayoría de estos sensores buscan mejorar los límites de detección existentes. La tabla 1 muestra un resumen de los sensores reportados para el Pb²⁺ a partir de AuNPs como agente reconocedor, el LD de la técnica analítica y la matriz de muestra usada en el estudio. El uso de técnicas como la dispersión hiper-Rayleigh (HRS) o dispersión dinámica de luz (DLS) en soluciones acuosas presenta niveles de sensibilidad y selectividad altamente competitivos.^{3,46} El creciente uso de técnicas como la fluorimetría ha permitido desarrollar sensores para la detección y cuantificación de Pb²⁺, que presentan altos niveles de sensibilidad a bajas concentraciones.^{47,48} Se han descrito también varios sensores colorimétricos a base de AuNPs para la detección y cuantificación de Pb²⁺. La mayoría de ellos presentan características como alta sensibilidad y selectividad ante la presencia de interferentes.^{1,49,50,46} Los sensores basados en la detección colorimétrica como señal analítica presentan ventajas, al ser métodos sencillos que no requieren el uso de instrumentos especializados y costosos e incluso permiten efectuar mediciones en campo (*in situ*).⁵¹ Adicionalmente, los sensores colorimétricos son descritos como económicos y relativamente rápidos comparados con los métodos clásicos (AAS, ICP-OES e ICP-MS).^{52,1,7,53,54,49,56,57,58,59} Desde el punto de vista de la muestra matriz, se han aplicado estos sensores a muestras de agua potable o de bebida,^{1,5} y a matrices más complejas como leche materna humana¹ y muestras de sangre.⁷

En este trabajo se usó un sensor colorimétrico para cuantificar Pb²⁺ en una matriz de muestra de agua para uso y consumo humano empleando AuNPs funcionalizadas con AM. El mecanismo de acción del sensor se muestra en la figura 7, la molécula de AM presenta dos grupos carboxílicos (HO₂CCH=CHCO₂H), uno de ellos se une a la superficie de las AuNPs, y el otro queda libre para interactuar con el Pb²⁺.¹ Las nanopartículas funcionalizadas con ácido maleico (AuNPs-AM) se producen por la adsorción del AM sobre la superficie de las AuNPs. La agregación de las AuNPs induce el acoplamiento de plasmón de superficie entre partículas y resulta en un cambio de color visible de rojo a azul. Este fenómeno es útil para la detección colorimétrica del analito.²⁰

Tabla 1. Sensores basados en el uso de nanopartículas de oro para la detección de Pb^{+2} .

Tipo de nanopartículas		Tamaño de nanopartícula	Límite de detección	Rango de trabajo	Matriz de muestra	Tipo de detección	Referencia bibliográfica
AuNP-Papaína	P-AuNPs	42 nm	200 nM		Solución acuosa	Colorimetría	59
AuNP-DNAzima 17E	AuNP-DNAzima	13 nm	4 ppm ($\approx 20 \mu M$)	20 - 60 μM	Sangre	Colorimetría	7
AuNP-Ácido gálico	GA-AuNPs	9.3 nm	10 nM	10 - 1000 nM	Agua de bebida	Colorimetría	60
AuNP-AgNPs- ácido 4-mercapto benzoico		17 nm	16 nM	16 - 100 nM	Solución acuosa	Colorimetría	52
AuNP y AgNP-Ácido gálico		≈ 50 nm	30 μM	30 - 300 μM	Solución acuosa	Colorimetría	51
AuNP-Ácido gálico	GA-AuNPs	35 nm	25 nM	50 - 1000 nM	Solución acuosa	Colorimetría	55
AuNP-DNAzima 17Ec		13 nm	100 nM	0.1 - 4 μM	Solución acuosa	Colorimetría	56
AuNP-DNAzima 17E		13 nm	3 nM	3 - 100 nM	Solución acuosa	Colorimetría	57
AuNP- tiosulfato y 2-mercaptoetanol		14.2 nm	0.5 nM	2.5 nM - 10 μM	Muestra ambientales (suelos y ríos)	Colorimetría	53
AuNP-DNAzima 17E		13 nm	500 nM		Solución acuosa	Colorimetría	54
AuNP-tiol alquil fosfatos	Phos-AuNPs	13 nm	1.63 μM		Solución acuosa	Colorimetría	58
AuNP-Ácido maleico		20 nm	2.4 nM	2.4 - 48.3 nM	Agua de bebida y leche materna	Colorimetría	1
AuNP-catequina		48.1 nm	1.5 nM	10 - 1000 nM	Muestras de orina	Fluorimetría	47
AuNP-Ácido 3-mercaptopropiónico		30 nm	100 nM		Muestra ambientales (agua de caño, río y agua mineral)	Fluorimetría	48
AuNP-DNAzima 17Ec		16.1 nm	0.1 nM	0.1 - 1 nM	Solución acuosa	Dispersión dinámica de la luz	46
AuNP-ácido 11 mercaptoundecanoico	Au-MUA	2.4 nm	25 μM		Solución acuosa	Dispersión de hiper-Rayleigh (HRS)	49

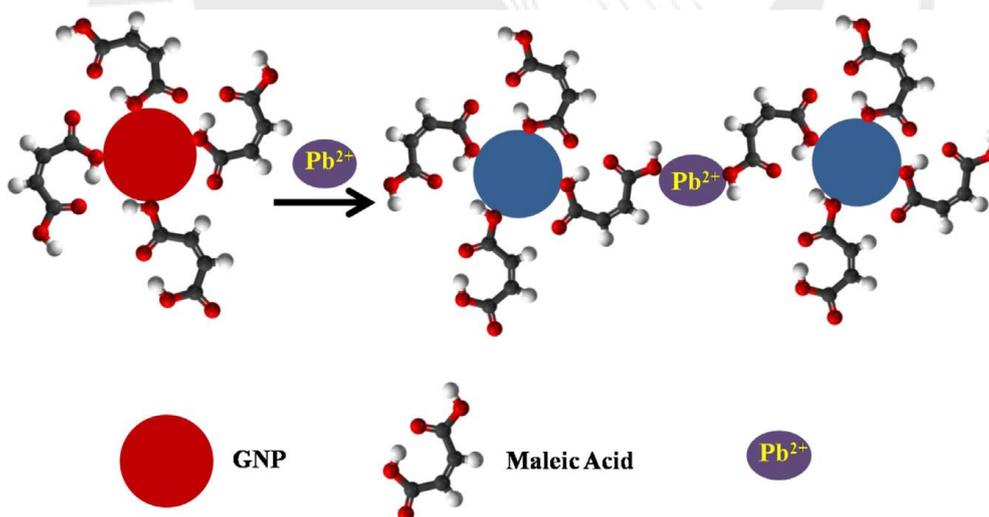


Figura 7. Mecanismo de acción del sensor colorimétrico ante la presencia del analito Pb^{+2} y cambio en el estado de agregación de las nanopartículas de oro. ¹

3.4. Validación

La validación de un método analítico es definida como “un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados por dicho método son confiables”.⁶¹ La finalidad de la validación de un método es poder determinar la utilidad del

método para los fines previstos,²³ es decir es ideal para el analito de interés dentro de los rangos de trabajo determinados y sobre la matriz de muestra.

Es necesario establecer parámetros de la metodología antes de iniciar la validación, para establecer el alcance de la validación,²³ vale decir conocer el método a validar y su campo de aplicabilidad (el analito, su concentración y la matriz en la cual se desea utilizar).

Es adecuado describir que un método normalizado hace referencia a un método que ha sido estandarizado para su fin previsto y que establece parámetros específicos que pueden ser reproducidos en cualquier laboratorio externo. Los métodos normalizados son publicados por entidades internacionales especializadas como Organización Estándar Internacional (ISO), Comité Europeo de Normalización (CEN) o Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC).⁶² Adicionalmente un método normalizado tiene un respaldo legal por el laboratorio de origen, los resultados emitidos por estos, útiles en procesos legales por ejemplo al determinar el impacto ambiental en zonas contaminadas.

A consecuencia de lo anterior, una práctica común en los laboratorios analíticos del mundo es validar sus metodologías de cuantificación para diferentes analitos y diferentes tipos de matrices de muestra. En el Perú el único ente capaz de acreditar la validez de una metodología es el Instituto Nacional de la Calidad (INACAL) referido en el reglamento internacional descrito como la norma NTP-ISO/IEC 17025:2006 “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayos y calibración”.

En general, se establece que el laboratorio debe validar los “métodos no normalizados o métodos normalizados con una o más modificaciones”.⁶³

1. Métodos no normalizados: Métodos provenientes de alguna fuentes diferentes a las entidades internacionales especializadas, ya sea desarrollados por el propio laboratorio o tomados de autores (ejemplo: publicado en revista científica).⁶⁴

2. Método normalizado con una modificación significativa: En el caso que el laboratorio desea modificar un método normalizado para ampliar su alcance previsto,⁶³ se realiza una validación retrospectiva, una validación en que se dispone de datos históricos realizados por el mismo laboratorio. Estos datos son de utilidad pues brindan información sobre el comportamiento del método y corresponden a curvas de calibración, resultados de ensayos, cartas de control, ensayos de aptitud, etc.²³ Con esta información previa, se deberán determinar los parámetros de validación son aceptables. Según el Vocabulario internacional de metrología (VIM), la verificación es el aporte “de evidencia objetiva de que un elemento dado satisface los requisitos especificados”⁶⁵ y que la verificación no implica la acción de validar un método.

La verificación es un proceso por el cual el método normalizado se utiliza correctamente. En caso de un método normalizado modificado, la verificación se enfoca solo en la o las variaciones realizadas no afecten el ensayo.⁶⁶ Es decir, estos dos términos no son contrarios, sino que se complementan entre sí, por

ejemplo se puede verificar un equipo instrumental a partir de la respuesta del equipo y se puede validar un método destinado a un analito y matriz en específico. Otra aplicación útil de la validación es demostrar que un método es equivalente a otro.⁶¹

3.4.1. Requisitos estadísticos de la validación

Durante el proceso de la validación se requiere comprobar los parámetros de validación y sus requisitos estadísticos, para los cuales se definen criterios de aceptación basados en hipótesis estadísticas. Para estas hipótesis se recomienda emplear un nivel de significancia del 95% ($p\text{-value} = 0.05$).⁶¹

La repetición es esencial para obtener resultados confiables, evaluar las posibles variaciones dentro del uso rutinario del método en condiciones reales debe ser tomado en cuenta al momento de diseñar las pruebas de validación.⁶²

Normalidad de datos

La normalidad de datos es una característica de cómo están distribuidos un grupo de datos relativamente grande (30 datos o más) y define cuál es la medida de tendencia central que describe mejor el grupo de datos. La normalidad de datos se toma como primer paso en una validación y determina el comportamiento de una serie de datos como paramétrico (normal) o no paramétrico (no normal).⁶³ Los datos paramétricos son similares alrededor del promedio de sus réplicas y son representados por la media de sus concentraciones. Los datos no paramétricos presentan un sesgo alrededor del promedio de sus réplicas y son mejor representados por la mediana de sus concentraciones. La validación se planifica con un valor que represente mejor al grupo de datos. Las validaciones con datos normales toman a la media como medida de tendencia central y las validaciones con datos no normales toman a la mediana.⁶³

La prueba estadística que evalúa la normalidad de un grupo de datos es la de Anderson-Darling empleada y descrita en la sección 5.2.8.1, la cual evalúa el comportamiento de la serie de datos sobre una línea de referencia base.⁶⁷

Presencia de datos atípicos

Un grupo de réplicas de concentraciones de un analito posee un nivel de variabilidad descrito por su desviación estándar. Se considera como dato atípico a aquel que esté fuera de la máxima variabilidad positiva o negativa esperada para el grupo de réplicas. La presencia de datos atípicos puede deberse a errores sistemáticos de la metodología (optimización de la metodología) o errores aleatorios por parte del analista.⁶³ Los datos que sean considerados como atípicos deben ser descartados para la validación.

Los datos dentro de una serie se asocian con su valor de *Z-score*, que caracteriza su proximidad con el punto medio de los datos. La prueba de determinación de datos atípicos es un requisito para la validación metodológica.

La prueba estadística que determina los datos atípicos es la prueba de Z-score paramétrico empleada y descrita en la sección 5.2.8.2, la cual toma como requisito la normalidad de los datos.

Homogeneidad de varianzas

La homogeneidad de la varianzas es un requisito estadístico para la estimación de la veracidad.⁶³ La prueba estadística de igualdad (también denominada homogeneidad) de varianzas empleada y descrita en la sección 5.2.8.3 consiste en comparar las varianzas entre los datos y evaluar si existen diferencias significativas entre ellos. La varianza y la desviación estándar miden la variabilidad en una población. La prueba estima intervalos de confianza de Bonferroni como los mínimos y máximos valores que pueden llegar a tomar la varianzas de los grupos.

La prueba estadística que evalúa la homogeneidad de las varianzas es la prueba de Bartlett, recomendada para grupo de datos con distribución normal.

Igualdad de medias

La igualdad de medias es un requisito estadístico para la estimación de la veracidad. La prueba estadística consiste en comparar el promedio de concentración de un analito entre los grupos de datos y evaluar si existen diferencias significativas entre ellos. La prueba estadística que evalúa la igualdad de medias es la prueba de ANOVA para un solo factor empleada y descrita en la sección 5.2.8.4. Esta prueba asume la homogeneidad de varianzas entre los grupos.⁶⁷

Adicionalmente en el análisis ANOVA es necesario evaluar la distribución de los residuales de los datos (valor de diferencia entre el valor experimental y el valor esperado). La distribución de los residuales debe ser normal y sin ninguna tendencia no aleatoria.

3.4.2. Parámetros de validación

Linealidad

La linealidad es la capacidad de un método de dar una respuesta instrumental proporcional a la cantidad del analito en la muestra, dentro de un determinado intervalo de concentraciones.⁶¹ El valor mínimo de concentración es tomado como el límite de cuantificación (LC) y el valor máximo es aquel que presenta anomalías significativas en la sensibilidad analítica. Un ejemplo común es de esto es el efecto meseta, representado por el decaimiento de la linealidad, a altos valores de absorbancia en la espectroscopía UV/Vis.⁶²

La linealidad se determina a partir del gráfico de concentración versus respuesta instrumental, llamada función respuesta o recta de calibrado.⁶¹ Este grafica se realiza un blanco y los patrones de valor teórico conocido de concentración del analito, que cubran todo el intervalo de trabajo, desde valores cercanos al LC de la metodología hasta valores superiores a los LMP o al valor de

interés. El número de puntos a analizar deberá ser establecido por el analista (mínimo de cuatro valores).⁶¹

Luego de realizar el gráfico de respuesta (eje Y) versus concentración de los estándares de calibración (eje X), se puede observar el comportamiento de la curva, tal como ilustra la *figura 8*.

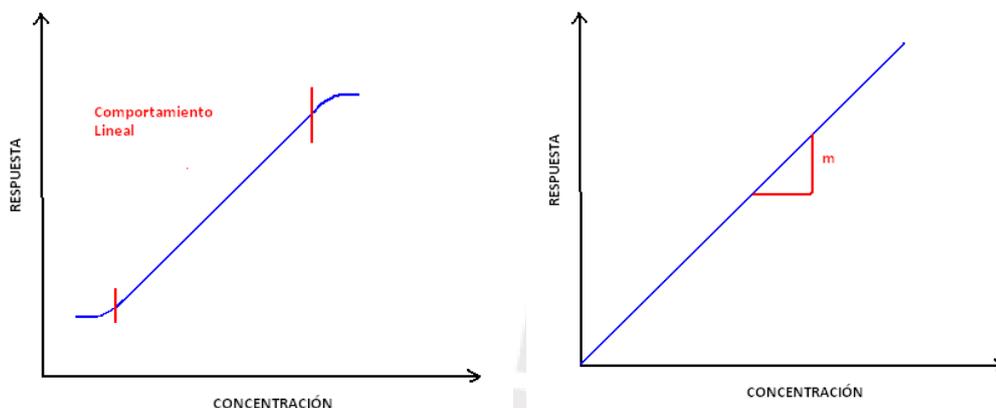


Figura 8. Gráficos de linealidad de respuesta del equipo versus concentración del analito. Izquierda: Comportamiento lineal dentro del rango de trabajo. Derecha: pendiente de la curva de calibración como una relación aritmética entre la respuesta y concentración.

Los estimadores estadísticos que representan la linealidad de una curva de concentración son la pendiente (m), el coeficiente de correlación (r^2) y el punto de corte (intercepto) con el eje de las Y (L_0), que se correlacionan a través de la siguiente ecuación.

$$Y = mX + L_0 \quad \text{Ecuación 2}$$

Para una curva de calibración o trabajo, como la representada en la *ecuación 2*, es recomendable que el valor de r^2 obtenido sea mayor o igual a 0.999, aunque para el caso de trazas se admite un valor igual o mayor que 0.99.^{23,61}

Sensibilidad

La sensibilidad es un parámetro útil para determinar las pequeñas variaciones a bajas concentraciones y se define como el cociente entre el cambio de respuesta instrumental y el cambio en el valor de concentración del analito.⁶¹

En la figura 9, se muestra diferentes curvas de calibración, siendo la pendiente más alta, próxima al eje de las Y, más sensible. Esto significa que a pequeñas variaciones en las concentraciones, resultara en grandes variaciones en los resultados de las lecturas observadas.⁶¹

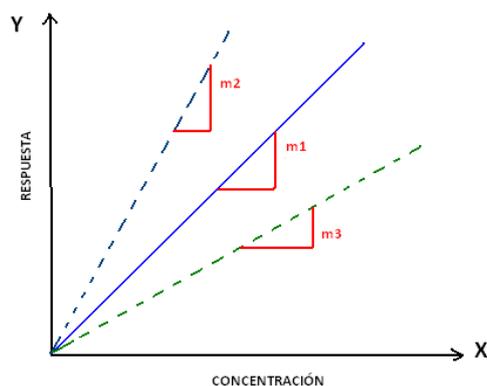


Figura 9. Gráfico lineal de respuesta del equipo versus concentración del analito a varias pendientes de diferentes sensibilidad.⁶¹

Límites

Para mediciones a concentraciones bajas deben tenerse en consideración los siguientes parámetros: límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC). Ambos límites se calculan por la multiplicación de la desviación estándar por un factor adecuado. El valor de esta desviación estándar debe ser representativa de la precisión obtenida para la población de muestras para brindar una estimación confiable.⁶²

Límite de detección

El límite de detección se define como “la menor concentración posible a la cual se puede detectar la presencia del analito con un razonable nivel de certeza”.²³ La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) recomienda un nivel de error en la detección de la presencia o ausencia del analito de un 5%.⁶⁵

Límite de cuantificación

El límite de cuantificación se define como “la menor concentración que puede cuantificarse con un grado de exactitud y precisión superior al nivel de significancia del 95%”.²³

Exactitud

Se define la exactitud como “el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia”.⁶¹ Con frecuencia se utilizan diferentes conceptos, tales como, exactitud, veracidad y precisión. Las definiciones entre estos términos no son universales, han cambiado con el tiempo, se han introducido nuevos términos, además sectores diferentes usan términos diferentes, todo esto genera confusión.⁶² Por lo tanto, en este trabajo vamos a basarnos en las definiciones y conceptos obtenidos del VIM y la Guía Eurachem sobre terminología, ilustrado en la figura 10.



Figura 10. Relación entre exactitud, veracidad y precisión.⁶¹ Izquierda: Descripción cualitativa entre exactitud, veracidad y precisión. Derecha: Ejemplos de distribuciones con diferentes grados de precisión y veracidad, donde la suma de ambos se toma como exactitud.

Veracidad

La veracidad determina el “grado de coincidencia existente entre el valor medio obtenido de una serie de resultados y un valor de referencia aceptado”⁶¹, la relación entre el resultado obtenido y el valor de referencia puede ser evaluado en términos de sesgo o recuperación.⁶¹ La evaluación del sesgo necesita un material de referencia certificado (MRC) como valor de referencia; en la evaluación de la recuperación, se fortifica a una muestra real con el analito a una concentración conocida y esta cantidad fortificada es tomada como valor de referencia.⁶²

Recuperación

En ausencia de algún MRC adecuados, ya sea porque son costosos o no se encuentran disponibles en el mercado para cierta matriz y cierto analito, se pueden realizar ensayos con adiciones, o sea fortificar una muestra para que contenga el analito de interés.⁶² La recuperación de concentración permite evaluar el rendimiento de un método analítico.⁶⁸

Se calcula de la siguiente manera:

$$\% R = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{adición}} \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

donde

- R: Porcentaje de recuperación
- \bar{x}' : Concentración de analito de la muestra fortificada
- \bar{x} : Concentración de analito medida en la muestra sin adicionar.

$X_{\text{adición}}$: Concentración de analito adicionado a la muestra fortificada.

Precisión

La precisión describe la similitud entre un grupo de datos, pero debido a que no se puede evaluar estadísticamente la similitud de datos, la precisión se expresa como dispersión (imprecisión) entre un grupo de datos y se calcula como la desviación estándar de los resultados.⁶¹

La dispersión de datos se evalúa a través de la desviación estándar relativa (RSD). El RSD se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \quad \text{Ecuación 4}$$

donde

s: Desviación estándar del grupo de datos

\bar{x} : Media de los datos

El RSD de Horwitz representa la máxima dispersión aceptada para los niveles de concentración, según la siguiente ecuación:⁶¹

$$\% RSD \text{ Horwitz} = 0.5 \times 2^{1-0.5 \log C} \quad \text{Ecuación 5}$$

donde

C: concentración del analito en unidades de molaridad y sin prefijos (mili, micro, nano, etc.).

Es útil también expresar la precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad. La condición de repetibilidad o reproducibilidad se determina en base a las condiciones usadas durante el desarrollo de las réplicas en el análisis químico, descritas en la tabla 2.

Tanto la repetibilidad como la reproducibilidad son representadas por sus respectivos límites, límite de repetibilidad (límite r) y límite de reproducibilidad (límite R), que muestran las máximas tolerancias posibles de las réplicas bajo las condiciones de repetibilidad o reproducibilidad.

Repetibilidad:

El término repetibilidad, precisión bajo las condiciones de repetibilidad, situación en la cual los resultados de análisis se obtienen con el mismo método, mismo laboratorio, mismo operador, mismo instrumento de medición dentro de intervalos cortos de tiempo.^{61,62}

$$\text{Límite } r = \sqrt{2} \times t \times s_r \quad \text{Ecuación 6}$$

donde

t: t-Student para el número de repeticiones y al nivel de significancia

s_r : Desviación estándar en condiciones de repetibilidad

Una aproximación válida se realiza al asumir un número de repeticiones relativamente grande, para las cuales se toma un valor de $t \approx 2$ para un nivel de significancia del 95%. En tal caso, $Límite r = 2.8 \times s_r$.

Reproducibilidad:

El término reproducibilidad, precisión bajo las condiciones de reproducibilidad, situación en la cual los resultados de análisis se obtienen con el mismo método, pero con diferentes condiciones como el laboratorio (ubicación), diferentes analistas, distintos equipos, entre otros.⁶¹

La reproducibilidad asume un valor más grande de variabilidad que bajo condiciones de repetibilidad. El objetivo es hacer una simulación sobre la posible variación de la metodología llevada a cabo en otro laboratorio.⁶²

El cálculo es semejante al de repetibilidad

$$Límite R = 2.8 \times s_R \quad \text{Ecuación 7}$$

donde

s_R : Desviación estándar en condiciones de reproducibilidad.

Tabla 2. Descripción de las condiciones de repetibilidad y reproducibilidad para las réplicas en los ensayos metodológicos.⁶¹

	Condición de Repetibilidad	Condición de Reproducibilidad
Instrumento	No cambiar	Cambiar
Accesorios	No cambiar	Cambiar
Operadores	No cambiar	Cambiar
Matriz muestras	Cambiar	Cambiar
Concentración	Cambiar	Cambiar
Lote de reactivos	No cambiar	Cambiar
Condiciones ambientales	No cambiar	Cambiar

Selectividad

La selectividad es definida como “el grado en que un método puede cuantificar al analito en presencia de interferentes”.⁶¹ Durante el proceso de validación se debe analizar el efecto de la presencia de interferencias en el ensayo, como parte del estudio de selectividad del método.⁶² Los interferentes son seleccionados en base a la matriz de interés.⁶¹ La presencia de interferentes en ciertos niveles de concentración puede generar desviaciones positivas o negativas durante la cuantificación del analito.⁶¹

3.4.3. Estimación de la incertidumbre (U)

La incertidumbre de la medición analítica es el error de la concentración resultante, es decir, representa la dispersión de los valores de concentración final de Pb^{+2} .⁶¹

La determinación de la incertidumbre incluye 4 pasos.

- Determinación de las fuentes de incertidumbre.
- Determinación de las incertidumbres parciales.
- Combinación de las diferentes incertidumbres
- Determinación de la incertidumbre expandida

Determinación de las fuentes de incertidumbre.

Identificar las fuentes de incertidumbre durante el ensayo asegura la correcta interpretación de los datos obtenidos al final de la estimación de la incertidumbre. Se toman como fuentes de incertidumbre la metodología (equipos y/o materiales), el analista y el sesgo.⁶⁹ Se muestra un esquema de fuentes de incertidumbre en la figura 11.

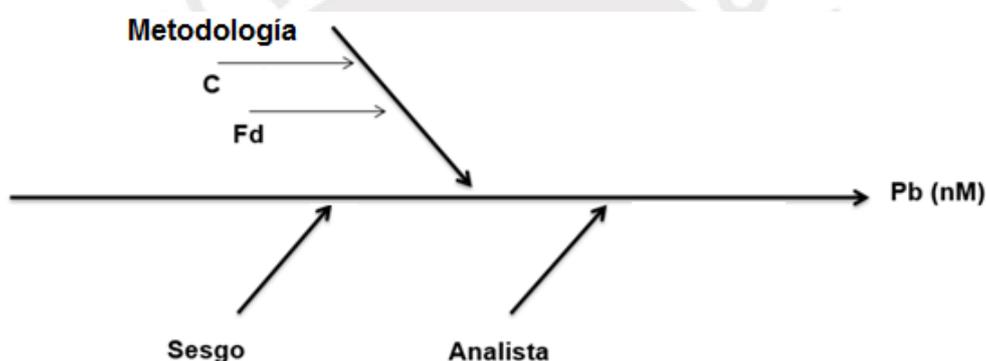


Figura 11. Diagrama de causa efecto de las fuentes de incertidumbre del método. Las fuentes de incertidumbre corresponden a los términos de la ecuación 16 de cuantificación de Pb^{+2} , donde C es la concentración de Pb^{+2} en el volumen de lectura y Fd es el factor de dilución usado para la muestra.

Determinación de las incertidumbres parciales

Las incertidumbres parciales son calculadas a partir de componentes individuales:

- Incertidumbre del analista ($U_{analista}$)
- Incertidumbre de sesgo (U_{sesgo})
- Incertidumbre de la metodología ($U_{metodología}$)

Incertidumbre del analista ($U_{analista}$)

La incertidumbre del analista describe la variabilidad que aporta el o los analistas que realizaron el análisis químico y es específica y diferente para cada

uno. Está determinado por la desviación estándar de los resultados reportados por el analista descrito en la sección 5.2.10.1.

Incertidumbre del sesgo (U_{sesgo})

La incertidumbre del sesgo viene dada por la diferencia entre el valor de referencia de concentración del analito en muestras fortificadas y los valores de concentración reportados de por el analista descrito en la sección 5.2.10.2.

Incertidumbre de la metodología ($U_{\text{metodología}}$)

La incertidumbre de la metodología es específica en cada proceso de validación, dado que abarca todos los pasos metodológicos que tengan un impacto directo en la concentración final del analito y viene determinada al usar la ecuación general de propagación de errores de cada factor dentro de la ecuación que cuantifica la concentración de Pb^{+2} descrita en la sección 5.2.10.3.

Las incertidumbres de cada paso metodológico se calculan a partir de las tolerancias máximas descritas en los manuales de uso de los instrumentos de laboratorio (matraces volumétricos, pipetas, micropipetas, balanzas, etc.). La incertidumbre de cada paso viene dada por

$$U_{Xi} = \frac{\text{Tol } Xi}{K} \quad \text{Ecuación 8}$$

donde

- U_{xi} : Incertidumbre asociada al proceso Xi
 Tol _{xi} : Tolerancia asociada a la etapa Xi.
K: Factor de cobertura.

Los factores de cobertura están definidos por el proceso que describen y se muestran en la tabla 3.

- Distribución normal: asociada con procesos de distribución normal, por ejemplo, procesos de medición automatizada de valores continuos como el pesado de una sustancia en el cual el resultado se puede alterar constantemente hasta un punto final.
- Distribución triangular: asociada con procesos de distribución triangular, por ejemplo, procesos de medición manual de valores discretos como la toma de volúmenes.
- Distribución rectangular: asociados con procesos de distribución rectangular, donde la distribución no favorece ningún punto y la probabilidad es igual para todos los puntos, por ejemplo, procesos de medición en electrodos.

Tabla 3. Tipos de distribución de datos y sus respectivos factores de cobertura.⁷⁰

Tipo de distribución		K
Normal	$K = 2$	2.00
Triangular	$K = \sqrt{6}$	2.45
Rectangular	$K = \sqrt{3}$	1.73

Combinación las diferentes incertidumbres

La combinación de incertidumbres parciales es un proceso por el cual se combina todas las incertidumbres de analista, sesgo y metodología en una sola incertidumbre por medio de la suma de sus cuadrados descrita en la sección 5.2.10.4 y en la ecuación 13.⁷⁰

Determinación de la incertidumbre expandida

La incertidumbre expandida se determina multiplicando la incertidumbre combinada por un factor de cobertura K, cuyo valor está definido por el nivel de significancia. Usualmente se toma como $K = 2$, a un 95% de significancia.⁶¹ Así, se establece el intervalo alrededor del resultado de la medición en el cual se puede esperar que se encuentre el valor de concentración final de Pb^{+2} .

3.5. Importancia de la validación

Todos los aspectos de la sociedad se sustentan, de una manera o de otra, en el trabajo analítico y mediciones analíticas que se hacen cada día en miles de laboratorios de todo el mundo.⁶² Por ejemplo, al controlar la calidad de bebidas y alimentos para confirmar su idoneidad para su consumo. La incorrecta medición analítica puede ocasionar grandes riesgos, por ejemplo, los ensayos que demuestren que los alimentos son no aptos para el consumo pueden derivar quejas e indemnizaciones; generar sanciones económicas, encarcelamiento o incluso, en algunos países, la ejecución.⁶²

Los resultado de un análisis se usan para la toma de decisiones.⁶² Los clientes solicitan trabajos analíticos a un laboratorio y esperan confiar en los resultados recibidos, entonces, el laboratorio tienen la responsabilidad de brindar confianza al cliente.⁷¹

3.6. Justificación del problema

A nivel nacional, existen diversos estudios que demuestran la presencia de población expuesta al plomo, afectada por procesos industriales de manera sistemática en lugares tales como la región Callao y el distrito de la Oroya en el departamento de Junín.^{24,72} Además de las fuentes de contaminación originadas por los procesos industriales, como la industria minera, industria textil o industria de las pinturas o colorantes, existen otras fuentes de contaminación a partir de las conexiones de tuberías del servicio de agua potable y procesos de soldadura asociados⁷³. Estas últimas fuentes de contaminación están aún presentes en muchos hogares a nivel nacional.

La EFSA refiere que aún a concentración trazas de Pb^{+2} (2.1 $\mu\text{g/L}$ o 10.1 nM) en el agua potable, este metal es nocivo especialmente en los subgrupos sensibles (bebés y exposiciones fetales)¹ al producir un decrecimiento importante en los niveles de cociente intelectual, que no llegan a recuperarse a largo de la vida del ser humano.^{28,74} Nótese que la concentración referida es inferior al LMP (10 $\mu\text{g/L}$ o 48.3 nM) declarado por la OMS, como la mínima concentración que al ser excedida causa o puede causar daños a la salud y al medio ambiente.

En los laboratorios nacionales, la cuantificación de Pb^{+2} en la matriz de agua para uso y consumo humano se lleva a cabo mediante instrumentos de medición de AAS e ICP ya sea como ICP-OES o ICP-MS. Según registros de INACAL (fecha de actualización 2016-12-15), existen 17 laboratorios analíticos en el Perú que pueden cuantificar el Pb^{+2} en la matriz de agua para uso y consumo humano con 34 métodos acreditados. La mayoría de las diferencias entre métodos se encuentra en la digestión de muestra. Esta puede darse por vía húmeda con el uso de diferentes ácidos (ácido nítrico y ácido clorhídrico) o con el uso de microondas. Existen también metodologías para la determinación de plomo total o plomo disuelto que no requieren digestión. Los 34 métodos referidos emplean AAS, ICP/OES o ICP/MS como instrumentos de medición.⁷⁵ La gran diversidad en las metodologías se debe a la poca precisión de estos métodos a bajas concentraciones y a la presencia de interferentes provenientes de la materia orgánica que acrecientan más estos problemas de sensibilidad a bajas concentraciones.

Otro punto de vista es la relación entre la industria y las universidades. En el Perú, las universidades no son reconocidas como instituciones de gran nivel académico, productoras de ciencia, tecnología e innovación. Para el ámbito nacional son consideradas como formadoras de profesionales cuyo único objetivo es ingresar al ámbito laboral tan pronto sea posible.⁷⁶ Por tal razón, la gran mayoría de universidades del Perú no produce ciencia y tecnología en los niveles de calidad que los tiempos actuales demandan. Se puede considerar como esfuerzos malgastados, si los resultados de las investigaciones no se validan científicamente o se exponen a crítica por el ámbito de la comunidad científica.⁷⁶

A partir de lo anterior, es necesaria la validación metodológica de un método analítico para la determinación de Pb^{+2} en la matriz de agua para uso y consumo humano para un rango de concentración de trazas (concentraciones del analito menores a un 0.01% en la matriz específica).⁷⁷

4. Hipótesis

La metodología desarrollada durante esta investigación es adecuada para su uso previsto, es decir, el nanosensor es adecuado para la cuantificación de Pb^{+2} en el rango de 2.30 nM a 100 nM, para la matriz de agua para uso y consumo humano.



5. Parte experimental

5.1. Reactivos utilizados, materiales y equipos

Los reactivos utilizados tanto en la síntesis de las AuNPs como en la detección de Pb^{+2} son los mostrados en la tabla 4.

Tabla 4. Lista de los reactivos y características utilizados.

Nombre	Fórmula	Marca	Grado de pureza
Citrato de sodio, dihidratado granular	$Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$	JT Baker	Reactivo analítico (PA)
Trihidratado cloruro de oro (III) o ácido cloroáurico	$HAuCl_4 \cdot 3H_2O$	Sigma-Aldrich	Reactivo analítico (PA)
Hidroxido de sodio, grajeas	NaOH	Macron	Reactivo analítico (PA)
Fosfato monobásico de sodio monohidratado, cristales	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	Fisher Scientific	Reactivo analítico (PA)
Fosfato dibásico de sodio anhidro	Na_2HPO_4	Merck-Millipore	Reactivo analítico (PA)
Ácido cis-butenodioico o ácido maleico	$C_4H_4O_4$	Sigma-Aldrich	Grado HPLC
Nitrato de plomo (II)	$Pb(NO_3)_2$	Merck-Millipore	Reactivo analítico (PA)

El agua utilizada en todos los experimentos fue de grado ultrapura (conductividad eléctrica menor a $0.5 \mu S/cm$) a partir de un sistema de agua ultrapura Thermo Scientific NANOpure® por ósmosis inversa y filtración mediante filtro de fibra hueca con tamaño de poro $0.2 \mu m$.

Los equipos utilizados en la caracterización de las AuNPs y los estudios de cuantificación de Pb^{+2} se encuentran en el laboratorio de Análisis Instrumental de la Sección de Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú y son descritos en la tabla 5.

Tabla 5. Lista de los software, equipos y características utilizados.

Nombre	Descripción
Minitab 17 Statistical	Programa estadístico con hojas de cálculo.
Espectrofotómetro UV-Visible Perkin Elmer Lambda 850	Dos fuentes de radiación, una lámpara de deuterio y una lámpara de deuterio y una lámpara de Tungsteno-halógena, que cubren el rango de longitudes de onda 175-900 nm con una rendija de 1 nm.
Espectrofotómetro UV-Visible-Agilent 8453	Dos fuentes de radiación, una lámpara de deuterio y una lámpara de Wolframio, que cubren el rango de longitudes de onda 180-800 nm con una rendija de 1 nm.
Balanza analítica - AND GH200	Precisión: 1 mg.
	Carga máxima 220 g.
Medidor de pH - Medidor PH BASIC 20	Medidor pH CRISON.
	Medida por estabilidad o en continuo.
	Resolución de 0.01 pH.
Agitador de mezclas Vortex - Heidolph	Movimiento orbital de 5 mm.
	Velocidad de hasta 2500 rpm.
Agitar magnético THERMO SCIENTIFIC SP131320-33Q	Rango de temperatura: 5 a 540 °C.
	Material de la placa superior cerámica.
Incubadora Heratherm IGS60	Rango de temperatura: 5 a 75°C.
	Volumen: 75 L.
	Precisión: ± 0.2 a 37°C.
Centrífuga Sigma 1-16	Máxima capacidad: 24 x 2.0 mL.
	Velocidad: Min 200 rpm. Max 15000 rpm.

5.1.1. Preparación de soluciones de reactivos

- Solución de ácido cloroáurico trihidrato ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$): Se preparó a partir de una solución intermedia de concentración 0.5 M. Se tomó 25.4 μL de HAuCl_4 0.5 M y se llevó hasta 1 mL de agua ultrapura (UP). La concentración final obtenida fue de 12.7 mM.
- Solución citrato de sodio dihidratado granular ($\text{Na}_3\text{Ct} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): Se pesó 19.9 mg y se disolvió en un volumen de 1 mL de agua UP. La concentración final obtenida fue de 63.6 mM.
- Solución de ácido maleico (10.0 mM): Se pesó 0.0580 g de AM y se disolvió en 40 mL con agua UP. Se adicionó hidróxido de sodio 0.1 M hasta un pH de 6.2 ± 0.1 y se completó el volumen hasta 50 mL con agua UP.
- Solución fosfato monobásico de sodio monohidratado 0.2 M: Se pesó 1.38 g de fosfato monobásico de sodio monohidratado y se disolvió en un volumen de 50 mL de agua UP.
- Solución fosfato dibásico de sodio anhidro 0.2 M: Se pesó 1.44 g de fosfato dibásico de sodio anhidro y se disolvió en un volumen de 50 mL de agua UP.
- Buffer fosfato 0.2 M pH 5.8: Se mezcló 5.5 mL de fosfato monobásico de sodio monohidratado 0.2 M y 0.85 mL de fosfato dibásico de sodio anhidro 0.2 M.

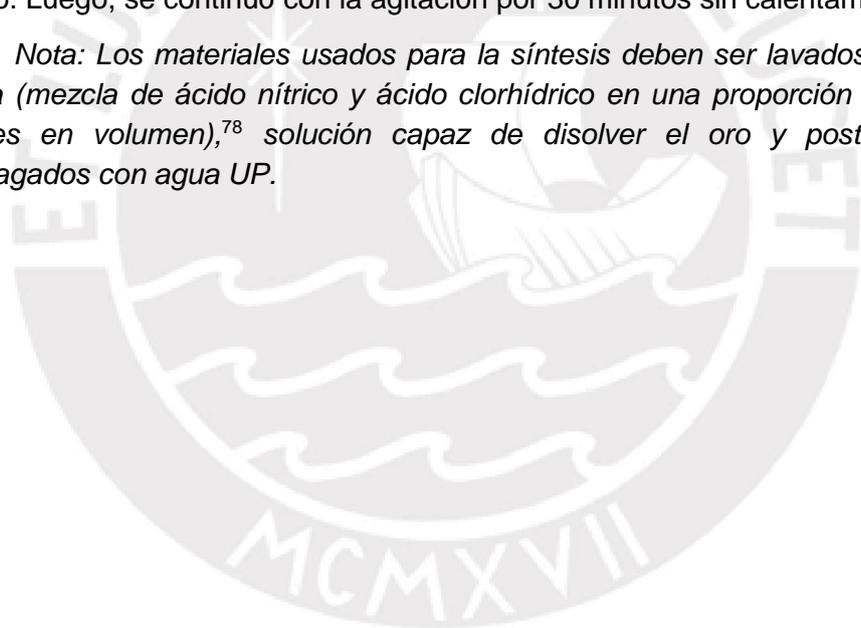
- Estándar de Pb^{+2} 1000 mg/L (4.83 mM): Se pesó 79.9 mg de nitrato de plomo y se disolvió en un volumen de 50 mL de agua UP.
- Solución de trabajo de Pb^{+2} 0.1 mg/L (0.48 μ M): Se tomó 0.5 mL de la solución estándar de Pb^{+2} 1000 mg/L se llevó hasta 50 mL de agua, luego se repitió el proceso de dilución.

5.2. Metodología

5.2.1. Síntesis de nanopartículas de oro

La síntesis de AuNPs de tamaño final de 14 nm se realizó con una metodología basada en el método de Turkevich, mostrada en la figura 12.^{36,38} El proceso consistió en añadir 1 mL de solución de ácido cloroáurico trihidratado ($HAuCl_4 \cdot 3 H_2O$) de 12.7 mM, luego se adicionó un volumen de 48 mL de agua UP en un balón de dos bocas, de capacidad 100 mL, acoplado a un tubo refrigerante y se llevó a ebullición en un baño de silicona líquida. Una vez que la solución se encontró a ebullición constante, se adicionó 1 mL de una solución acuosa de citrato de sodio dihidratado ($Na_3Ct \cdot 2H_2O$) de 63.6 mM. La proporción Au^{3+} : citrato en la mezcla inicial fue 1:5. La mezcla se dejó reaccionar por 15 minutos a ebullición bajo agitación constante hasta observar la aparición de un color rojo ligero. Luego, se continuó con la agitación por 30 minutos sin calentamiento.

Nota: Los materiales usados para la síntesis deben ser lavados con agua regia (mezcla de ácido nítrico y ácido clorhídrico en una proporción una a tres partes en volumen),⁷⁸ solución capaz de disolver el oro y posteriormente enjuagados con agua UP.



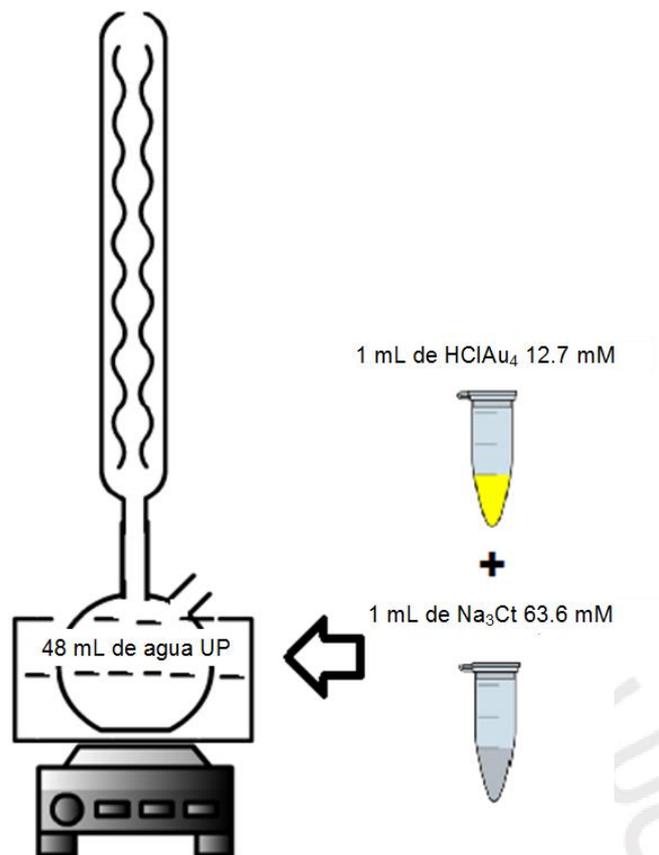


Figura 12. Esquema de la síntesis de nanopartículas de oro para la metodología descrita.

5.2.2. Caracterización de nanopartículas de oro

La determinación del tamaño de las AuNPs se realizó a partir de la máxima absorción de la banda LSPR en el espectro UV-Visible mostrado por las AuNPs. La longitud de onda obtenida se correlacionó con el diámetro promedio y el coeficiente de absorptividad molar de las AuNPs en base a valores reportados.^{42,79}

La determinación del máximo de absorción de la banda LSPR de las AuNPs, se realizó en una proporción 1:5 con agua UP y se midió el espectro de absorbancia en un equipo UV-visible en el rango de 450 - 600 nm.

5.2.3. Protocolo inicial de funcionalización de las nanopartículas.

El proceso de funcionalización se realizó según las referencias de Ratnarathorn.¹ El sensor de AuNPs-AM se preparó en base al principio de auto ensamblaje de los compuestos orgánicos sobre la superficie de AuNPs en el siguiente orden: se agregó 0.1 mL de AM 10.0 mM (sin modificación de pH) a 4.0 mL de AuNPs previamente sintetizadas (5 nM) y 1.9 mL de agua UP para generar AuNPs-AM. Se incubó la solución durante 1 hora a 30°C, luego la solución se centrifugó a 8000 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente, para eliminar el exceso de AM, se descartó el sobrenadante reponiendo el volumen con agua UP y se repitió el ciclo de centrifugado. Después de este paso, las AuNPs se caracterizaron mediante espectrometría UV-visible.

5.2.4. Protocolo optimizado de funcionalización de las nanopartículas.

Se funcionalizó las AuNPs-AM en un volumen fijo de 6 mL por cada lote y en el siguiente orden de adición de reactivos: 1900 μ L de agua UP, 4.0 mL de AuNPs 5 nM y 100 μ L de solución de AM 10.0 mM previamente ajustada a pH 6.2. Esta mezcla fue colocada en una incubadora a 30°C con agitación constante por 1 hora.

5.2.5. Protocolo inicial de detección de Pb⁺²

Para la detección y posterior cuantificación de Pb⁺² en muestras, se tomó como base la referencia.¹ Se mezclaron 0.60 mL de AuNPs-AM en tubos eppendorf de 1.5 mL con 0.10 mL de la solución a analizar (blanco, control o muestra), 0.1 mL de buffer fosfato pH 5.8 a 0.5 M y 0.2 mL de agua UP. Luego, la mezcla se incubó durante 1 hora a 30°C y se midió el espectro UV-Vis. Se registró el espectro de absorción entre 450 nm a 600 nm a los 15 minutos después de adicionadas las AuNPs-AM. Se empleó la razón de absorbancias A600/A520 para cuantificar la presencia de Pb⁺².

5.2.6. Protocolo optimizado de detección y cuantificación de Pb⁺².

En un tubo eppendorf de 1.5 mL, se tomó un volumen de solución que se desea analizar, ya sea un patrón de Pb⁺² o muestra (no mayor a los 330 μ L), se completó el volumen con agua UP hasta los 330 μ L de solución total. Se adicionó 70 μ L de buffer fosfato 0.2 M a pH 5.8 y 600 μ L de la solución de AuNPs-AM. Se agitó por espacio de 5 minutos en un agitador Vortex. Se registró el espectro de absorción entre 450 nm a 600 nm a los 15 minutos después de adicionadas las AuNPs-AM. Se empleó la razón de absorbancias A600/A520 para cuantificar la presencia de Pb⁺².

5.2.7. Muestreo

La metodología de muestreo fue tomada de fuente bibliográfica para la matriz de agua para uso y consumo humano o agua de la red de agua potable.⁸⁰ Se emplearon los siguientes pasos prácticos para el muestreo.

- El volumen de la muestra fue 100 mL.
- Se enjuagó 3 veces el recipiente con la fuente de agua que se iba a muestrear.
- Se recogió la muestra sin dejar espacios con aire y se cerró el envase herméticamente.

Las muestras de matriz usadas en el proceso de validación provinieron de dos fuentes de agua para uso y consumo humano. Para la determinación de los LD y LC se usó agua potable del distrito de la Punta, provincia constitucional del Callao, pasada por un filtro de carbón activo marca Rotoplas modelo PT-01R (muestra tipo 1) que eliminó la mayor cantidad de interferentes en la muestra. Para el resto de los parámetros de validación se usó agua potable de los laboratorios de la Pontificia Universidad Católica del Perú (muestra tipo 2).

5.2.8. Requisitos estadísticos de la validación

Todos los ensayos descritos en esta sección fueron realizados siguiendo los procedimientos optimizados para la funcionalización y cuantificación de Pb⁺² descritos en las secciones 5.2.5 y 5.2.6.

5.2.8.1. Normalidad de datos

Se obtuvo 30 réplicas de medidas de concentración de Pb⁺², bajo condiciones de repetibilidad entre ellas. Se usó un mismo lote de AuNPs, pero en diferentes días de funcionalización y cuantificación. Se usó el programa estadístico Minitab 17 Statistical Software en la prueba de Normalidad con el criterio de normalidad de Anderson-Darling sobre la variable de concentración de Pb⁺². Esta prueba compara la función de distribución acumulada de los datos con la distribución esperada de los datos normales. Si se observa una diferencia suficientemente grande, la prueba rechazará la hipótesis nula de normalidad en la población. El criterio de decisión se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Hipótesis y criterio de decisión para la verificación de la normalidad de datos en la prueba de Anderson-Darling.

HIPÓTESIS NULA (H₀)	: Variable aleatoria observada es normal
HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H_A)	: Variable aleatoria observada no es normal

Nivel de Significación	P-Value	Criterio de decisión	Conclusión
0.05	P	$P \geq 0.05$	Aceptar H ₀ : los datos son normales
		$P < 0.05$	Rechazar H ₀ : los datos no son normales

5.2.8.2. Presencia de datos atípicos

La determinación de puntos atípicos se realizó sobre los 30 datos previamente obtenidos para la prueba de normalidad. El cálculo del valor Z-score se realizó con la fórmula indicada y con el criterio de interpretación se determinó la calificación de los datos según su valor de Z-score. El criterio de decisión se muestra en la tabla 7.

El estadístico de Z-score se calcula con la siguiente fórmula:

$$Z = \frac{(x_i - \bar{x})}{s}$$

donde

x_i: Dato individual obtenido del ensayo

\bar{x} : Media de los datos
 s: Desviación estándar de los datos.

Tabla 7. Hipótesis y criterio de decisión para la detección de datos atípicos en la prueba de Z-score paramétrico.

HIPÓTESIS NULA (H₀)	: No hay datos atípicos en la muestra
HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H_A)	: Hay al menos un dato atípico en la muestra

Z-score	Calificación
$ Z \leq 2$	Satisfactorio
$2 < Z < 3$	Cuestionable
$ Z \geq 3$	No satisfactorio

5.2.8.3. Homogeneidad de varianza

La Prueba de Bartlett se realizó sobre los 30 datos previamente obtenidos para la prueba de normalidad de los datos. Se separaron los datos en 3 grupos de 10 datos cada uno, según el día en que fueron analizados. Se usó el programa estadístico Minitab 17 Statistical Software y se estimó los intervalos de confianza de Bonferroni. Para poder aplicar este test, los datos deben de ser normales y aleatorios. El criterio de decisión se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Hipótesis y criterio de decisión para la verificación de la igualdad de precisión en la prueba de Bartlett.

HIPÓTESIS NULA (H₀)	: No hay diferencia significativa entre las variables.
HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H_A)	: Al menos una de las variables es distinta a las otras.

Criterio de decisión	Conclusión
$P \geq 0.05$	Aceptar H ₀ : resultados con similar precisión
$P < 0.05$	Rechazar H ₀ : resultados con distinta precisión

5.2.8.4. Igualdad de medias

La Prueba de ANOVA de un factor se realizó sobre los 30 datos previamente obtenidos para la prueba de normalidad de los datos. Se separaron los datos en 3 grupos de 10 datos cada uno, según el día en que fueron analizados. Se usó el programa estadístico Minitab 17 Statistical Software y se evaluó la igualdad de medias para los 3 grupos de datos. Así, se tomó la diferencia de los días de lectura como factor para el análisis de igualdad de medias.

Durante la prueba ANOVA, el programa estadístico Minitab 17 Statistical Software almaceno los residuales de los datos y se evaluó la normalidad de los residuales a través de la prueba Anderson-Darling, bajo los mismos criterios descritos en la tabla 6, donde la variable observada corresponde a los residuales obtenidos de la prueba ANOVA de un factor. El criterio de decisión se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. Hipótesis y criterio de decisión para la verificación de la igualdad de las medias en la prueba ANOVA de un factor.

HIPÓTESIS NULA (H_0)	: No hay diferencia significativa entre las medias.
HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H_A)	: Al menos una de las medias es distinta a las otras

Criterio de decisión	Conclusión
$P \geq 0.05$	Aceptar H_0 : resultados con diferencias no significativas
$P < 0.05$	Rechazar H_0 : resultados con diferencias significativas

5.2.9. Parámetros de validación

Todos los ensayos descritos para la validación fueron realizados siguiendo los procedimientos optimizados para la funcionalización y cuantificación de Pb^{+2} descritos en las secciones **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y 5.2.6.

La expresión de los resultados de las concentraciones de Pb^{+2} durante el proceso de validación corresponde a dos tipos de fuente de Pb^{+2} . Para los casos en el cual el Pb^{+2} provino de un patrón estándar (muestras control), el valor reportado corresponde a la concentración de Pb^{+2} en el volumen de lectura (1 mL). En cambio, para los casos donde el Pb^{+2} provino de una muestra de concentración desconocida (muestra de matriz), el volumen de alícuota tomado fue diluido para realizar el ensayo y se reportó la concentración de Pb^{+2} en la alícuota de la muestra. Ambos tipos de muestra son adecuadas para la validación y se usaron en los siguientes parámetros de validación:

Muestras control: Linealidad

Muestras de matriz; LD, LC, veracidad, precisión y selectividad.

5.2.9.1. Linealidad

El estudio de la linealidad se realizó a través del estudio de tres curvas de calibrado obtenidas de forma independiente (días y estándares diferentes) con concentraciones de Pb^{+2} en el rango 2.30 nM a 100 nM.⁶²

Para cada curva, se realizó un análisis de regresión lineal (método de mínimos cuadrados) y se determinaron la pendiente, ordenada al origen (intercepto) y el coeficiente de correlación. El criterio de decisión se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Hipótesis y criterio de decisión para la estimación de la linealidad de la metodología en el rango de trabajo.

HIPÓTESIS NULA (H₀)	: El método es lineal en el rango de trabajo
HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H_A)	: El método no es lineal en el rango de trabajo

Prueba		Criterio de decisión	Conclusión
Estadística de Regresión	Coeficiente de correlación (r)	$r \geq 0.90$	El método es lineal en el rango de trabajo
		$r < 0.90$	El método no es lineal en el rango de trabajo

Nota: El criterio de decisión, coeficiente de correlación (r), sobre la linealidad en la validación se ha tomado como menor al descrito en las fuentes bibliográficas,⁶¹ con la finalidad de no descartar datos que no cumplan con este criterio y puedan ser útiles durante todo el proceso de validación.

5.2.9.2. Límite de detección

La determinación del LD, se realizó a partir de la lectura de blancos matriz, es decir, muestras de la matriz a validar que no contengan el analito de interés o lo esté por debajo del LD. La muestra escogida para la detección del LD para la matriz de agua de uso y consumo correspondió a agua potable del servicio público pasada por un filtro comercial de carbón activado, muestra tipo 1 descrita en la sección 5.2.7. El procedimiento consistió en cuantificar 10 réplicas de blancos matriz bajo condiciones de repetibilidad, el LD se calculó por la multiplicación del valor de desviación estándar de blancos de matriz por un valor constante de 3.⁶² Dicho resultado se redondeó al máximo posible teniendo en cuenta las cifras significativas.

5.2.9.3. Límite de cuantificación

La determinación del LC se calculó multiplicando la desviación estándar de blancos matriz por 10, tal como recomienda la IUPAC.⁶⁵

5.2.9.4. Veracidad

Se realizó el estudio de veracidad con 10 réplicas de muestras reales fortificadas con 10 nM Pb⁺². Las muestras fortificadas se analizaron y se calcularon los niveles de recuperación en términos de porcentaje.⁶²

Se usó el programa estadístico Minitab 17 Statistical Software para la prueba de t de una muestra para una media hipotética del 100% de recuperación. El criterio de decisión se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Hipótesis y criterio de decisión para la verificación de la veracidad de la metodología a través de la recuperación de la adición estándar.

HIPÓTESIS NULA (H₀):	No existe diferencia significativa con el 100% de recuperación
HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H_A):	Existe diferencia significativa con el 100% de recuperación.

Criterio de decisión α=0.05; n-1 grados de libertad	Conclusión
t exp < t tabla	Aceptar H ₀ : El método es veraz
t exp ≥ t tabla	Rechazar H ₀ : El método no es veraz

El valor t tabla del criterio de decisión se calcula a partir de tablas estadísticas, t-Student con un nivel de significancia de 95% y n-1 grados de libertad (t-Student 0.05; 9)⁸¹ y el valor de t experimental (t exp) está descrito por la siguiente ecuación:

$$t_{exp} = \frac{|\%R-100| \times \sqrt{n}}{s} \quad \text{Ecuación 9}$$

donde

%R: Media de la recuperación porcentual

s: Desviación estándar de los datos fortificados

n: Número de datos de repeticiones de muestras fortificadas

5.2.9.5. Precisión

En la evaluación de la precisión se usaron 10 réplicas de blancos matriz fortificados a 2 niveles de concentración de Pb⁺², específicamente a 10 nM y 100 nM. Para la evaluación de la precisión se utilizaron condiciones de precisión intermedia⁶²(resultados del mismo laboratorio, pero en días distintos y equipos de lectura diferentes).

Adicionalmente, se determinó los límites de repetibilidad y reproducibilidad para las concentraciones de 10 nM y 100 nM de Pb⁺².

La verificación de la precisión del método se realizó con la aplicación del RSD de Horwitz descrito en la sección 3.4.2, y el criterio de decisión se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Hipótesis y criterio de decisión en la estimación de la precisión de la metodología a través de la estimación del RSD.

HIPÓTESIS NULA (H_0)	: La desviación experimental es menor a la desviación teórica
HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H_A)	: La desviación experimental es mayor a la desviación teórica

Criterio de decisión	Conclusión
$RSD_{EXP} < RSD_{HORWITZ}$	Metodología precisa
$RSD_{EXP} \geq RSD_{HORWITZ}$	Metodología no precisa

5.2.9.6. Selectividad

La prueba de selectividad o evaluación de interferentes, consistió en analizar muestras a las cuales se le agregaron intencionalmente interferencias a concentraciones específicas (aquellas que se considere probable de encontrar en muestras reales).⁶² Se usó muestras tipo 1, descrita en la sección 5.2.7, de matriz de agua para uso y consumo humano sin presencia de analito (blanco matriz) que se fortificaron con Pb^{+2} a una concentración de 10 nM.

Se usaron 12 sales inorgánicas mostradas a continuación como interferentes:

- Cloruro de potasio (KCl)
- Cloruro de estroncio ($SrCl_2 \cdot 6H_2O$)
- Sulfato ferroso ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)
- Cloruro férrico ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3)
- Bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$)
- Fluoruro de sodio (NaF)
- Nitrito de sodio ($NaNO_2$)
- Nitrate de sodio ($NaNO_3$)
- Sulfato de sodio ($NaSO_4$)
- Cloruro de calcio ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)
- Cloruro de magnesio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)

Se siguió el procedimiento para la cuantificación de Pb^{+2} descrito en la sección 5.2.6 con algunos cambios como un volumen de muestra de 230 μL y volumen de interferente de 100 μL para una concentración final de 2000 mg/L. Cuando dicha concentración de interferente alteraba la señal del sensor, se disminuyó la concentración de interferente hasta encontrar la máxima concentración que no alterara la señal del sensor (1600, 1200, 800 o 400 mg/L, según se indique).

5.2.10. Estimación de la incertidumbre

El cálculo de la incertidumbre asociado a una concentración de Pb^{+2} no requiere análisis químicos adicionales a los obtenidos durante la validación.

5.2.10.1. Incertidumbre del analista

Se determinó a partir de los 30 datos previamente obtenidos para la prueba de normalidad de los datos. El cálculo de la incertidumbre se expresó mediante la siguiente fórmula:⁷⁰

$$U^2_{analista} = S^2_{analista} \quad \text{Ecuación 10}$$

5.2.10.2. Incertidumbre del sesgo

Al igual que en el paso anterior, se usaron los 30 datos previamente obtenidos para la prueba de normalidad de los datos. La incertidumbre del sesgo se determinó mediante la siguiente fórmula:⁷⁰

$$U_{sesgo} = |\bar{x}_{Analista} - \text{valor de referencia}| \quad \text{Ecuación 11}$$

5.2.10.3. Incertidumbre la metodología

La incertidumbre de la metodología se determinó a partir de la ecuación de cuantificación de Pb^{+2} , empleando la ecuación general de propagación de errores para el cálculo de la incertidumbre:⁶⁹

$$U_{Metodología}^2 = \sum_{i=1}^{i=n} \left(\frac{\partial z}{\partial X_i} \right)^2 (U_{X_i})^2 \quad \text{Ecuación 12}$$

donde

z: Función dependiente de x

X_i : Componentes individuales de la función z, asociados a la metodología

5.2.10.4. Combinación de las incertidumbres parciales

Las incertidumbres parciales obtenidas en los pasos previos se combinaron en una sola, denominada incertidumbre combinada, a partir de la siguiente fórmula:

$$U_{combinada} = \sqrt{U^2_{metodología} + U^2_{analista} + U^2_{sesgo}} \quad \text{Ecuación 13}$$

5.2.10.5. Incertidumbre expandida

La incertidumbre expandida es una expresión global de la incertidumbre combinada y se calculó según la siguiente fórmula:

$$U_{expandida} = U_{combinada} \times 2 \quad \text{Ecuación 14}$$

5.3. Resultados experimentales

5.3.1. Síntesis y caracterización de las nanopartículas de oro

Las AuNPs se sintetizaron según 5.2.1 y se caracterizaron mediante espectroscopía UV-Vis tal como se indica en 5.2.2. Se obtuvo un máximo de absorbancia a 519 nm correspondiente a su LSPR, tal como se muestra en la figura 13. Según bibliografía reportada, esta longitud de onda corresponde a AuNPs (cubiertas con citrato) con un diámetro promedio de 14 nm.^{34,44} Para cálculos de la concentración de los diferentes lotes de AuNPs sintetizadas, se empleó el coeficiente de absortividad molar reportado para AuNPs de 14 nm, $\epsilon_{450} = 1.76 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.⁴²

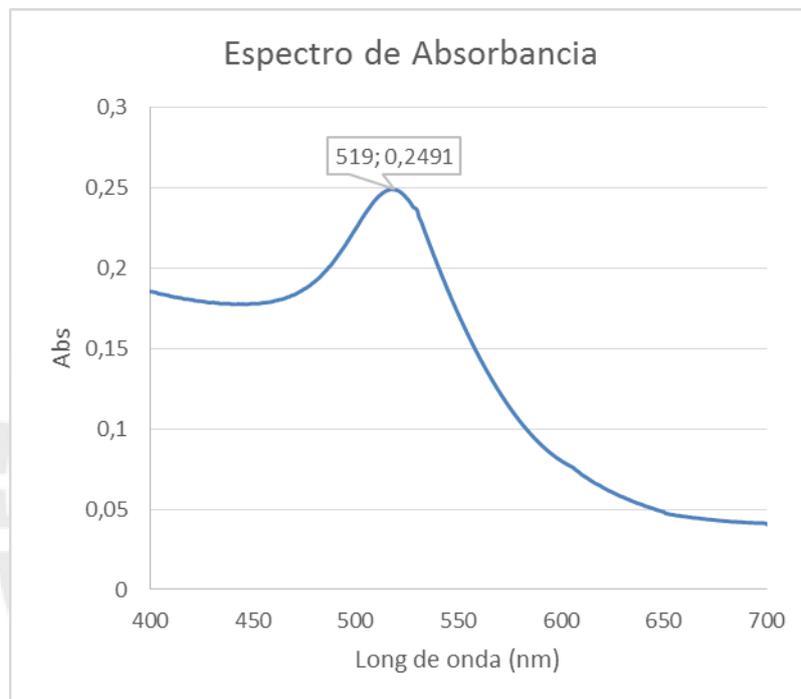


Figura 13. Espectro de absorbancia en el rango de 400 a 700 nm de las nanopartículas de oro.

5.3.2. Proceso de optimización de la metodología

El estado de agregación de las AuNPs fue la característica usada para detectar y cuantificar el analito Pb^{+2} . Se usó el ratio de intensidades entre dos longitudes de onda específicas, (A_{600}/A_{520}), que ha mostrado una dependencia lineal con la concentración de Pb^{+2} en la muestra.¹ El mecanismo de este fenómeno se puede describir por el aumento del estado de agregación de las AuNPs-AM ante la presencia del analito Pb^{+2} ,⁵⁰ que produce un desplazamiento de la banda LSPR hacia mayores longitudes de onda, tal como ilustra la figura 14.

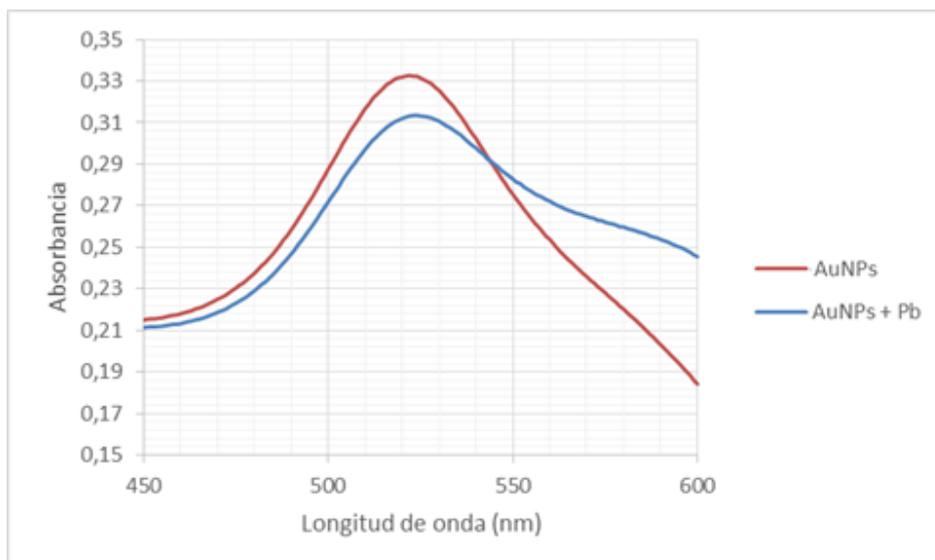


Figura 14. Espectro de absorción en el rango de 450 a 600 nm del sensor en ausencia y presencia de Pb^{2+} .

La optimización fue realizada sobre siete parámetros de los protocolos iniciales de funcionalización de las AuNPs-AM y detección de Pb^{2+} descritos en las secciones 5.2.3 y 5.2.5 respectivamente, el proceso de optimización se llevó a cabo en el orden mostrado a continuación, donde únicamente el parámetro estudiado fue modificado mientras los demás permanecían invariables, además la modificación propuesta escogida como óptima fue mantenida en los siguientes pasos de optimización.

Optimización en la funcionalización de AuNPs-AM

- pH de la funcionalización de las AuNPs
- pH de la solución de lavado
- Concentración del AM durante la funcionalización de las AuNPs

Optimización en la detección de Pb^{2+}

- Concentración de las AuNPs durante la cuantificación de Pb^{2+}
- Concentración de buffer durante la cuantificación de Pb^{2+}
- Tiempo de reacción durante la cuantificación de Pb^{2+}
- pH del ensayo durante la cuantificación de Pb^{2+}

Se realizó una primera optimización en el orden de $\mu M Pb^{2+}$, se tomó 3 puntos de concentraciones de 0, 1 y 5 $\mu M Pb^{2+}$ (1.036 mg/L). Las modificaciones propuestas se muestran en tabla 13.

Tabla 13. Variables de optimización de la metodología, para un rango de trabajo de 0 a 5 μM de Pb^{+2} .

Variables de optimización	Condiciones iniciales	Modificaciones propuestas		
pH de la funcionalización	pH 1.6	5.2	6.2	7.2
pH de la solución de lavado	pH \approx 7.5	5.8	7.0	7.5
Concentración de AM en la funcionalización	167 μM	83.3 μM	167 μM	250 μM
Concentración de AuNPs en el ensayo	2 nM	1 nM	2 nM	3 nM
Concentración de buffer	50 mM	10 mM	30 mM	50 mM
Tiempo de reacción del ensayo	15 minutos	15 min	20 min	30 min
pH del buffer fosfato	pH 5.8	5.6	5.8	6.0

pH del ácido maleico durante la funcionalización de las AuNPs

Durante este paso se modificó el pH de la solución de AM usada en el protocolo inicial descrito en la sección 5.2.3 de la funcionalización de las AuNPs, con una solución de hidróxido de sodio 0.1 M.

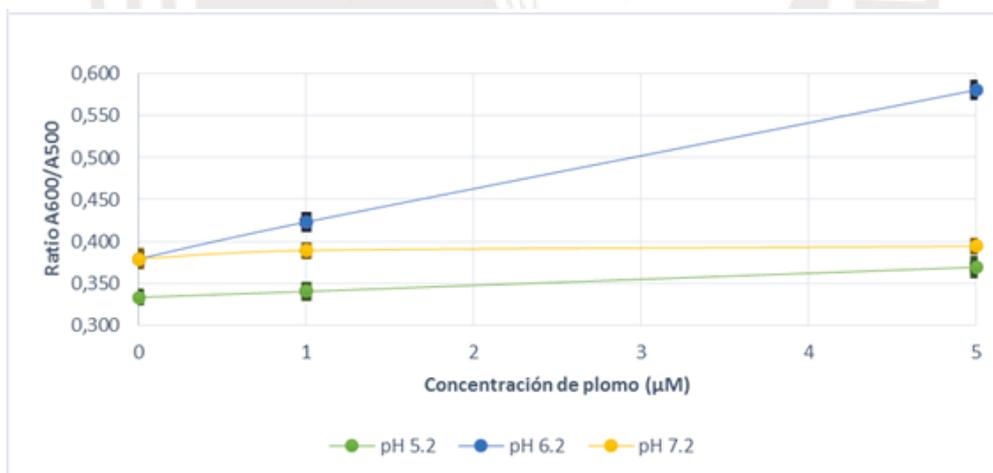


Figura 15. Curvas de calibración para diferentes valores de pH de ácido maleico durante la funcionalización, las barras representan los errores estándar.

Tabla 14. Parámetros de optimización para diferentes valores de pH de ácido maleico durante la funcionalización de las nanopartículas de oro con ácido maleico.

Condición de optimización	Coefficiente de determinación (r^2)	Pendiente de curva de calibrado
pH 5.2	1.000	0.007
pH 6.2	1.000	0.040
pH 7.2	0.750	0.003

El valor de pH del ácido maleico durante la funcionalización de las AuNPs mostró ser una variable de optimización relevante, dado que cambios en este producen cambios de comportamiento en el sensor, pérdida de linealidad y/o sensibilidad, los resultados están explicados en detalle en la sección 6.1.

Para un pH de 6.2 de la solución de AM 10.0 mM la respuesta del sensor fue lineal al aumento de concentración mostrado en la figura 15 y la pendiente de la curva de calibrado fue la mayor, tal como se muestra en la tabla 14. Por tanto, este pH fue escogido como el óptimo durante la funcionalización de las AuNPs.

pH de la solución de lavado, durante la funcionalización de las AuNPs

Durante este paso se modificó el pH del agua UP del protocolo inicial descrito en la sección 5.2.3 empleada durante el proceso de centrifugación y lavado de las AuNPs añadiendo HCl 0.1 M al agua UP.

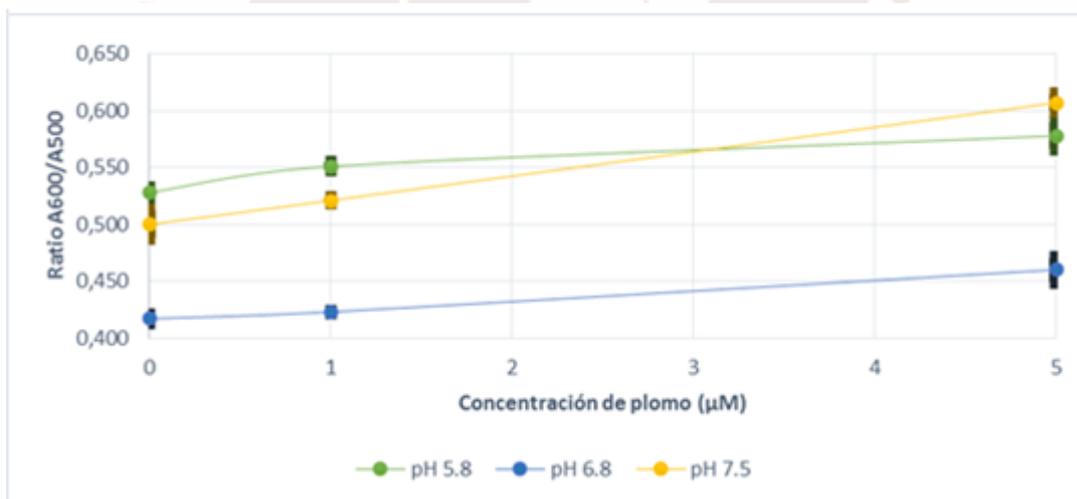


Figura 16. Curvas de calibración para diferentes valores de pH de la solución de lavado durante la funcionalización de las nanopartículas de oro, las barras representan los errores estándar.

Tabla 15. Parámetros de optimización para diferentes valores de pH de la solución de lavado después de la funcionalización de las nanopartículas de oro con ácido maleico.

Condición de optimización	Coefficiente de determinación (r^2)	Pendiente de curva de calibrado
pH 5.8	0.920	0.009
pH 6.8	0.996	0.009
pH 7.5	1.000	0.021

El valor de pH de la solución de lavado fue modificado hacia valores levemente ácidos y básicos, esperando eliminar el exceso de AM usado durante la funcionalización de las AuNPs, para las tres condiciones se conserva la linealidad de la metodología, por lo tanto la condición inicial (sin modificación de pH de la solución de lavado) es escogida por no tener que tamponar el agua UP.

Para un pH agua UP de 7.5 la respuesta del sensor fue lineal al aumento de concentración mostrado en la figura 16 y la pendiente de la curva de calibrado fue la mayor de las condiciones de optimización, tal como se muestra en la tabla 15. Por tanto, este pH fue escogido como el óptimo durante la funcionalización de las AuNPs.

Concentración del AM durante la funcionalización de las AuNPs

Durante este paso se modificó la concentración de la solución de AM del protocolo inicial descrito en la sección 5.2.3 durante la funcionalización con las AuNPs.

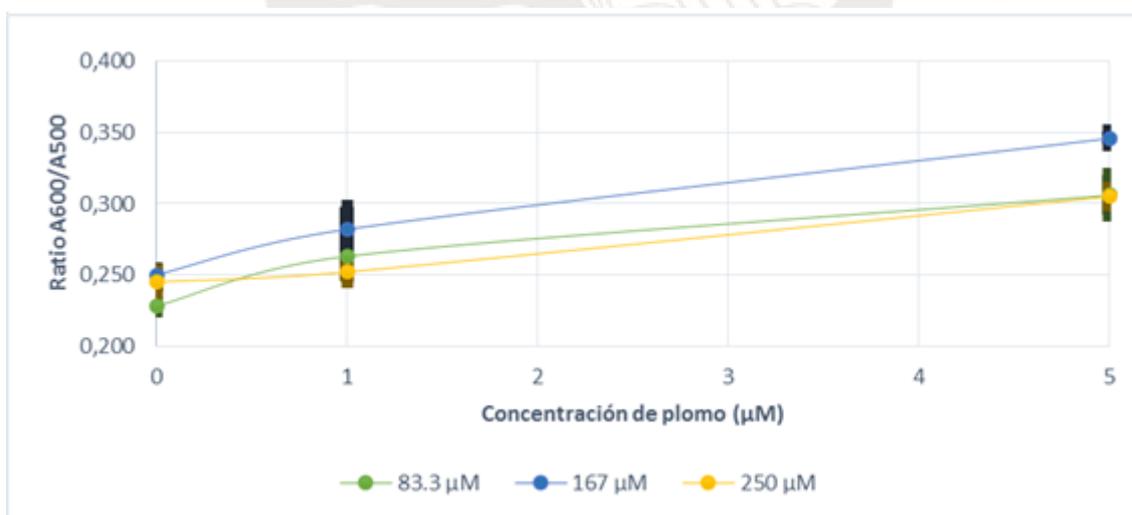


Figura 17. Curvas de calibración para diferentes valores de concentración del ácido maleico durante la funcionalización de las nanopartículas de oro, las barras representan los errores estándar.

Tabla 16. Parámetros de optimización para diferentes valores de concentraciones de ácido maleico durante la funcionalización de las nanopartículas de oro con ácido maleico.

Condición de optimización	Coefficiente de determinación (r^2)	Pendiente de curva de calibrado
83.3 μM	0.927	0.014
167 μM	0.980	0.018
250 μM	0.993	0.012

La concentración del AM durante la funcionalización de las AuNPs fue modificado hacia valores superiores e inferiores, para las tres condiciones se conserva la linealidad de la metodología.

Para una concentración de AM de 167 μM en la funcionalización de las AuNPs-AM, la respuesta del sensor fue lineal al aumento de concentración mostrado en la figura 17 y la pendiente de la curva de calibrado fue la mayor de las condiciones de optimización, tal como se muestra en tabla 16. Por tanto, esta concentración fue escogida como la óptima durante la funcionalización de las AuNPs.

Concentración de las AuNPs durante la cuantificación de Pb^{+2}

Durante este paso se modificó la concentración de las AuNPs del protocolo inicial descrito en la sección 5.2.5 manteniendo fijas las otras variables.

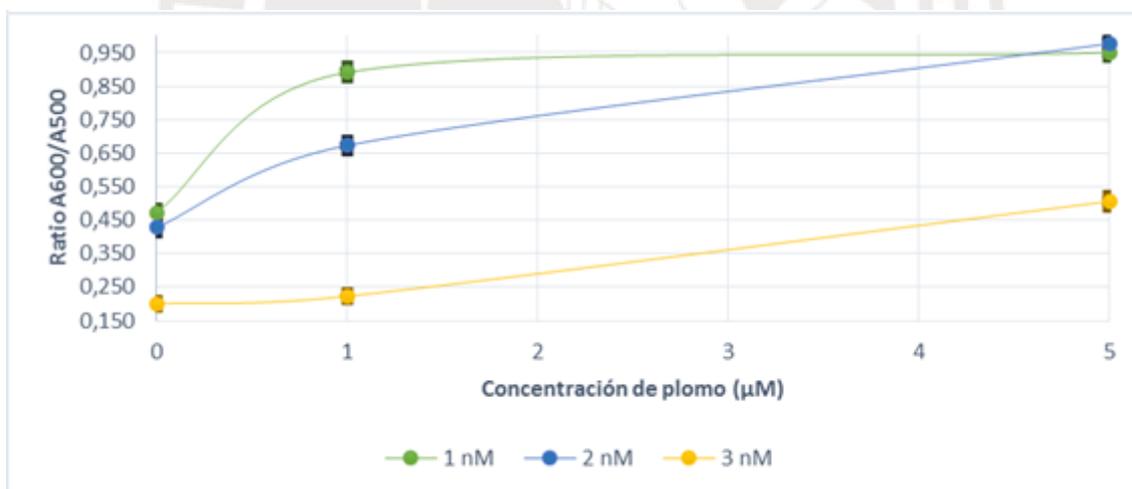


Figura 18. Curvas de calibración para diferentes valores de Concentración de las nanopartículas de oro durante la cuantificación de Pb^{+2} , las barras representan los errores estándar.

Tabla 17. Parámetros de optimización para diferentes valores de concentraciones de nanopartículas de oro en la funcionalización de las nanopartículas de oro con ácido maleico.

Condición de optimización	Coefficiente de determinación (r^2)	Pendiente de curva de calibrado
1 nM	0.542	0.072
2 nM	0.928	0.100
3 nM	0.984	0.064

La concentración de las AuNPs durante la cuantificación de Pb^{+2} mostro ser una variable de optimización relevante, dado que cambios en este producen cambios de comportamiento en el sensor, pérdida de linealidad y/o sensibilidad, los resultados están explicados en detalle en la sección 6.1.

Para una concentración de AuNPs durante la cuantificación de Pb^{+2} de 2 nM, la respuesta del sensor fue lineal al aumento de concentración mostrado en la figura 18 y la pendiente de la curva de calibrado fue la mayor de las condiciones de optimización en tabla 17. Por tanto, esta concentración fue escogida como la óptima durante la cuantificación de Pb^{+2} .

Concentración de buffer durante la cuantificación de Pb^{+2}

Durante este paso se modificó la concentración del buffer de fosfato pH 5.8 del protocolo inicial descrito en la sección 5.2.5 en la cuantificación de Pb^{+2} .

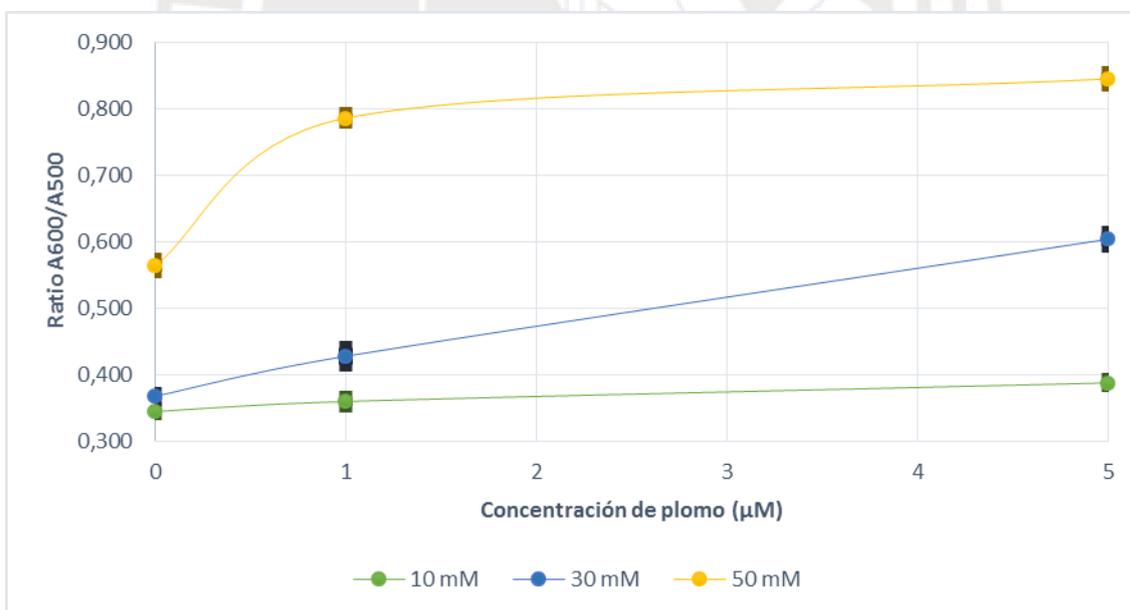


Figura 19. Curvas de calibración para diferentes valores de la concentración del buffer durante la cuantificación de Pb^{+2} , las barras representan los errores estándar.

Tabla 18. Parámetros de optimización a diferentes valores de concentración del buffer fosfato del ensayo en la cuantificación de Pb^{+2} .

Condición de optimización	Coefficiente de determinación (r^2)	Pendiente de curva de calibrado
10 mM	0.974	0.008
30 mM	0.997	0.046
50 mM	0.627	0.044

La concentración de buffer durante la cuantificación de Pb^{+2} mostro ser una variable de optimización relevante, dado que cambios en este producen cambios de comportamiento en el sensor, perdida de linealidad y/o sensibilidad, los resultados están explicados en detalle en la sección 6.1.

Para una concentración de buffer fosfato pH 5.8 durante la cuantificación de Pb^{+2} de 30 mM, la respuesta del sensor fue lineal al aumento de concentración mostrado en la figura 19 y la pendiente de la curva de calibrado fue la mayor de las condiciones de optimización en la tabla 18. Por tanto, esta concentración fue escogida como la óptima durante la cuantificación de Pb^{+2} .

Tiempo de reacción para la lectura del ensayo durante la cuantificación de Pb^{+2}

Durante este paso se modificó el tiempo de reacción del protocolo inicial descrito en la sección 5.2.5 en la cuantificación de Pb^{+2} . Estos ensayos se realizaron monitoreando las mismas muestras a los diferentes tiempos de reacción.

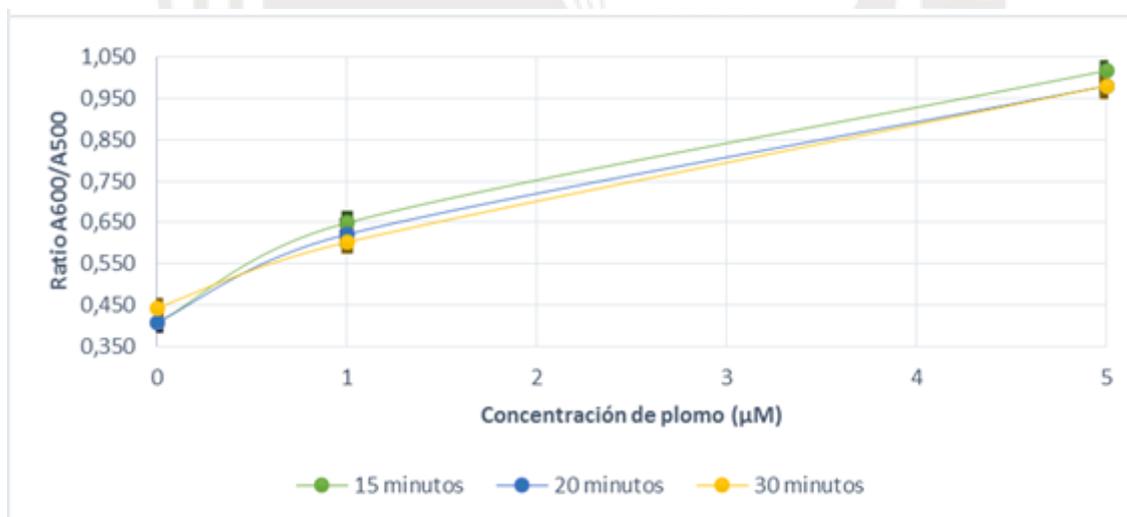


Figura 20. Curvas de calibración para diferentes valores de tiempo de espera de estabilización para la lectura del ensayo durante la cuantificación de Pb^{+2} , las barras representan los errores estándar.

Tabla 19. Parámetros de optimización a diferentes tiempos de lectura durante el ensayo en la cuantificación de Pb^{+2} .

Condición de optimización	Coefficiente de determinación (r^2)	Pendiente de curva de calibrado
15 min	0.954	0.114
20 min	0.966	0.108
30 min	0.990	0.104

El tiempo de reacción para la lectura del ensayo durante la cuantificación de Pb^{+2} fue modificado hacia valores superiores, evaluando la estabilidad del tiempo de reacción después del contacto del sensor con Pb^{+2} , para las tres condiciones se conserva la linealidad de la metodología.

Para 15 min de tiempo de reacción, la respuesta del sensor fue lineal al aumento de concentración mostrado en figura 20 y la pendiente de la curva de calibrado fue la mayor de las condiciones de optimización en la tabla 19. Por tanto, este tiempo fue escogido como la óptima durante la cuantificación de Pb^{+2} .

pH del buffer fosfato durante la cuantificación de Pb^{+2}

Durante este paso se modificó el pH del buffer de fosfato del protocolo inicial descrito en la sección 5.2.5 en la cuantificación de Pb^{+2} y se monitoreó el valor de pH final de la mezcla.

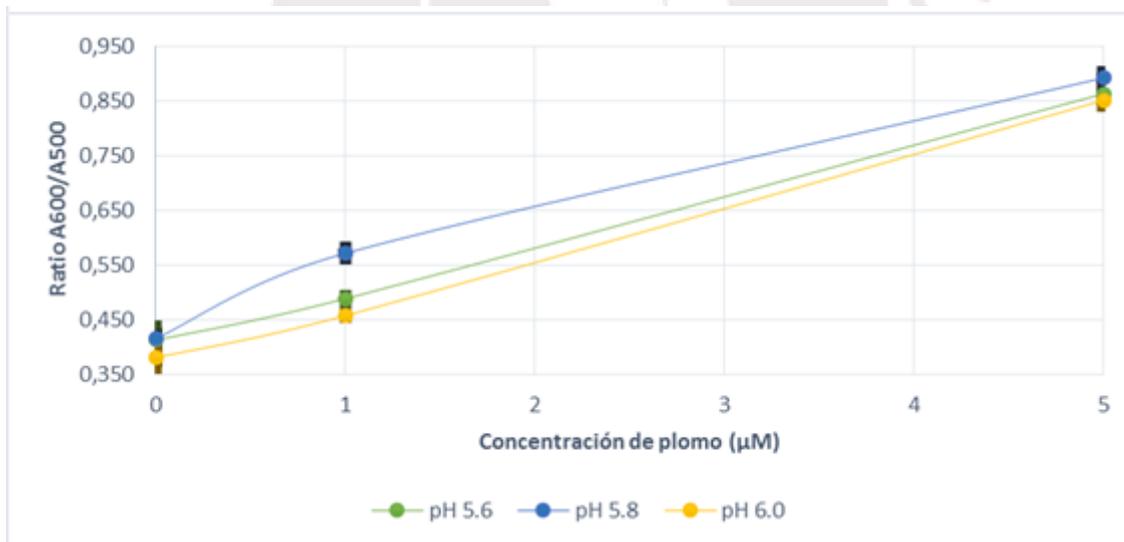


Figura 21. Curvas de calibración para diferentes valores de pH del buffer fosfato durante la cuantificación de Pb^{+2} , las barras representan los errores estándar.

Tabla 20. Parámetros de optimización a diferentes valores de pH de buffer fosfato durante el ensayo en la cuantificación de Pb^{+2} .

Condición de optimización	Coefficiente de determinación (r^2)	Pendiente de curva de calibrado
pH 5.6	0.999	0.091
pH 5.8	0.982	0.091
pH 6.0	0.999	0.095

Tabla 21. Valores de pH finales para las muestras de lectura a diferentes valores de pH de buffer fosfato durante el ensayo en la cuantificación de Pb^{+2} .

Condición de optimización	pH de la muestra de lectura (muestra + reactivos)
pH 5.6	5.92
pH 5.8	6.04
pH 6.0	6.12

El valor de pH del buffer fosfato durante la cuantificación de Pb^{+2} fue modificado hacia valores superiores e inferiores, para las tres condiciones se conserva la linealidad de la metodología.

Para un pH 6.0 del buffer fosfato, la respuesta del sensor fue lineal al aumento de concentración mostrada en la figura 21 y la pendiente de la curva de calibrado fue la mayor de las condiciones de optimización en tabla 20. Por tanto, este pH fue escogido como el óptimo durante la cuantificación de Pb^{+2} . Adicionalmente la tabla 21 muestra los valores de pH finales obtenidos sobre la totalidad de la muestra después de la en la cuantificación de Pb^{+2} .

La tabla 22 muestra las condiciones óptimas obtenidas para un rango de trabajo de 0 a $5 \mu M$ de Pb^{+2} .

Tabla 22. Variables de optimización finales para un rango de trabajo de 0 a 5 μM Pb^{+2} .

Variables de optimización	Iniciales	Condiciones finales
pH de la funcionalización	pH 1.6	6.2
pH de la solución de lavado	pH 7.5	7.5
Concentración de AM en la funcionalización	167 μM	167 μM
Concentración de AuNPs en el ensayo	2 nM	2 nM
Concentración de buffer	50 mM	30 mM
Tiempo de reacción del ensayo	15 minutos	15 min
pH del buffer fosfato	pH 5.8	5.8

Debido a que el rango esperado de concentraciones de Pb^{2+} en muestras de agua para uso y consumo humano son del orden de $\mu\text{g}/\text{mL}$,^{1,82} la metodología fue optimizada para alcanzar estos niveles de concentración en la validación, con niveles de precisión aceptables. Por ello, se realizó una optimización en el orden de concentración de nM Pb^{+2} , se tomó 3 puntos de concentración de 0, 20 y 100 nM Pb^{+2} . Experimentalmente no se observó diferencia significativa en las diferentes condiciones de optimización a este nivel de concentración, a excepción de la concentración del buffer, tal como se describe a continuación. La tabla 23 muestra las modificaciones evaluadas para este factor.

Tabla 23. Variables de optimización, para un rango de trabajo de 0 a 100 nM Pb^{+2} .

Variables de optimización	Iniciales	Modificaciones propuestas		
Concentración de buffer	30 mM	10 mM	14 mM	20 mM

Concentración del buffer para un rango de trabajo de 0 a 100 nM Pb^{+2} .

La concentración del buffer fosfato pH 5.8 del ensayo mostrado en la tabla 22, fue modificada para el rango de trabajo de 0 a 100 nM Pb^{+2} . Se encontró que la disminución de la concentración del buffer del ensayo aumenta la estabilidad de las AuNPs y sensibilidad a bajas concentraciones.

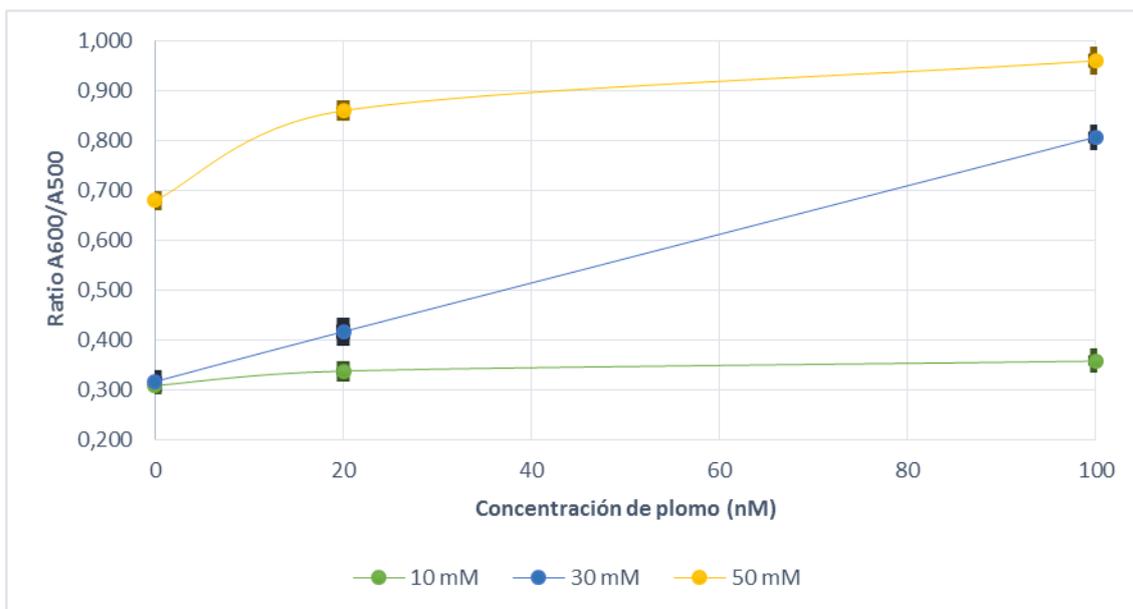


Figura 22. Curvas de calibración para diferentes valores de concentración del buffer del ensayo durante la cuantificación de Pb^{+2} , las barras representan los errores estándar.

Tabla 24. Parámetros de optimización a diferentes valores de concentración del buffer fosfato en la cuantificación de Pb^{+2} , para un rango de trabajo de 0 a 100 nM Pb^{+2} .

Condición de optimización	Coefficiente de determinación (r^2)	Pendiente de curva de calibrado
10 mM	0.819	0.008
14 mM	1.000	0.098
20 mM	0.773	0.047

Para una concentración del buffer del ensayo durante la cuantificación de Pb^{+2} de 4.67 mM, la respuesta del sensor fue lineal al aumento de concentración mostrado en la figura 22 y la pendiente de la curva de calibrado fue la mayor de las condiciones de optimización en la tabla 24. Por tanto, esta concentración fue escogida como la óptima durante la cuantificación de Pb^{+2} .

5.3.3. Requisitos estadísticos de la validación

5.3.3.1. Normalidad de datos

En este trabajo se tomaron 30 datos de concentración mostrados en la tabla 25 de una misma muestra control de 20 nM de Pb^{+2} . En la figura 23 se muestran los resultados de la prueba de Anderson-Darling y la figura 24 muestra el histograma de distribución de datos, donde la línea roja corresponde a la distribución normal para los datos. La prueba de Anderson-Darling arrojó un p -value = 0.949, mayor que el nivel de significancia (alfa = 0.05). Entonces, se puede concluir que la distribución de los datos es normal y los datos son paramétricos.

Tabla 25. Datos para evaluar normalidad de los resultados y la estadística descriptiva. Las columnas A1, A2 y A3 denotan los grupos de datos de muestras control de Pb^{+2} en diferentes días de análisis.

Nº de Ensayos	Plomo (nM)		
	A1	A2	A3
1	20.07	20.15	20.01
2	20.02	19.41	19.87
3	20.28	19.99	20.43
4	19.41	19.77	19.52
5	20.07	19.59	19.80
6	20.19	20.10	19.95
7	19.86	19.93	19.65
8	19.86	20.15	19.66
9	20.27	19.71	19.79
10	19.62	19.90	20.15
Promedio	19.96	19.87	19.88
Destv. Std	0.283	0.249	0.266
Prom. General	19.91		

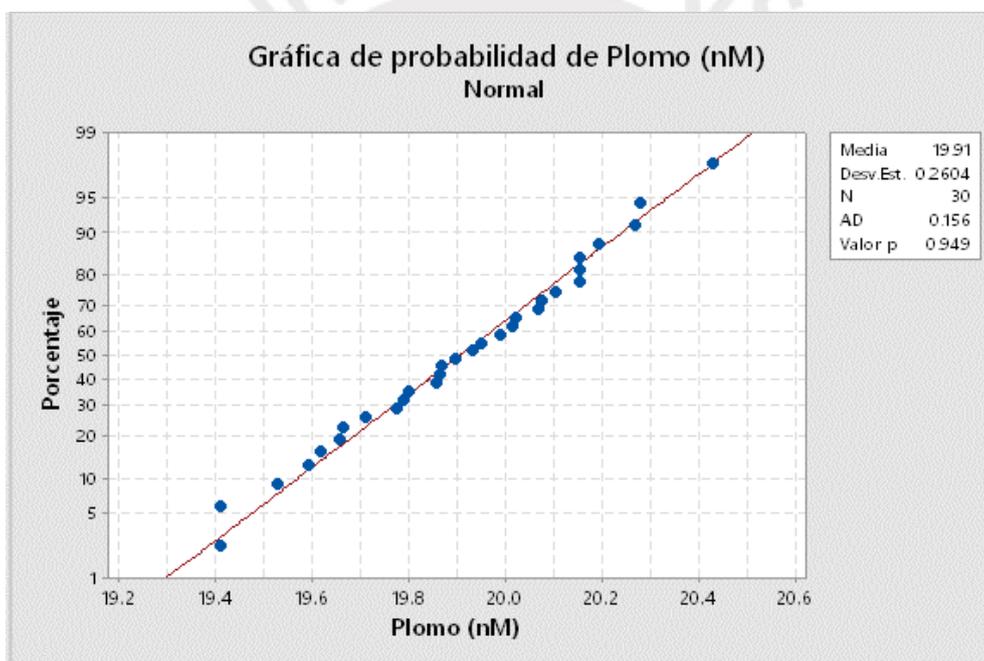


Figura 23. Resultados de la prueba de Anderson-Darling. Los ejes x e y representan la distribución para los datos de concentración de Pb^{+2} y el porcentaje de distribución acumulada de la probabilidad normal, respectivamente. La línea central de referencia denota la línea de normalidad de los datos.

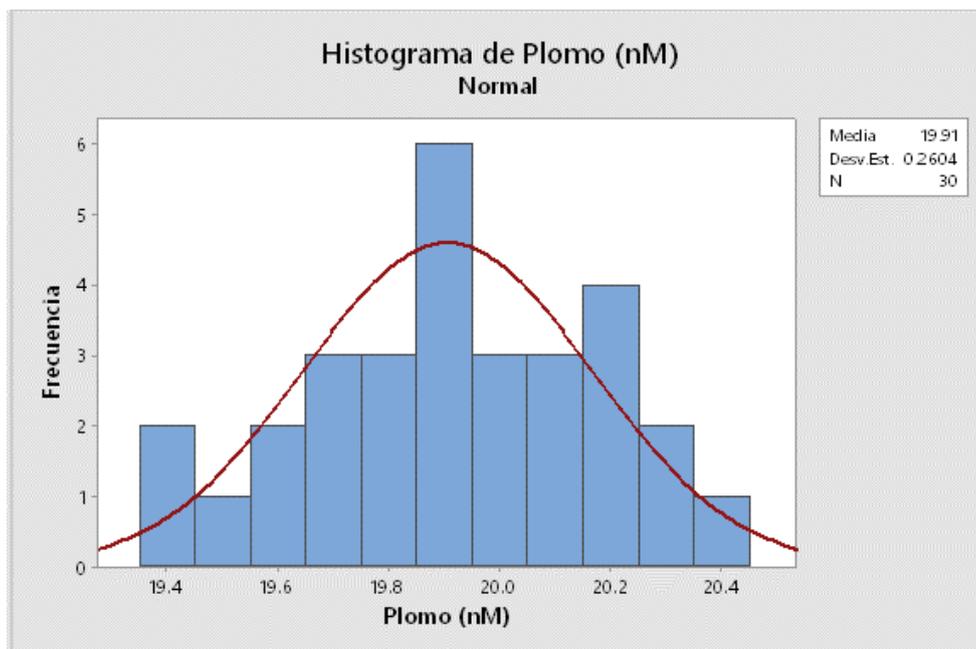


Figura 24. Histograma de los datos de las concentraciones de Pb^{+2} , donde la línea roja representa la distribución normal.

Prueba de puntos atípicos

Se calculó el estadístico de Z-score a partir de los 30 datos usados en la evaluación de la normalidad de los datos. La tabla 26 muestra los valores de Z-score calculados sobre los datos de partida.

Los resultados son considerados satisfactorios, excepto el dato N° 23 que entra en el rango cuestionable. En general, un dato calificado como cuestionable es aceptado en la prueba de datos atípicos.

Tabla 26. Datos para la evaluación de los datos atípicos y determinación del valor de Z-score.

Nº de Ensayos	Concentración de Pb ⁺² (nM)	Valor (Z-score)	Resultado
1	20.07	0.65	Satisfactorio
2	20.02	0.48	Satisfactorio
3	20.28	1.46	Satisfactorio
4	19.41	1.88	Satisfactorio
5	20.07	0.67	Satisfactorio
6	20.19	1.13	Satisfactorio
7	19.86	0.16	Satisfactorio
8	19.86	0.14	Satisfactorio
9	20.27	1.42	Satisfactorio
10	19.62	1.08	Satisfactorio
11	20.15	0.97	Satisfactorio
12	19.41	1.88	Satisfactorio
13	19.99	0.35	Satisfactorio
14	19.77	0.48	Satisfactorio
15	19.59	1.17	Satisfactorio
16	20.10	0.79	Satisfactorio
17	19.93	0.13	Satisfactorio
18	20.15	0.98	Satisfactorio
19	19.71	0.72	Satisfactorio
20	19.90	0.01	Satisfactorio
21	20.01	0.44	Satisfactorio
22	19.87	0.11	Satisfactorio
23	20.43	2.03	Cuestionable
24	19.52	1.43	Satisfactorio
25	19.80	0.38	Satisfactorio
26	19.95	0.19	Satisfactorio
27	19.65	0.93	Satisfactorio
28	19.66	0.91	Satisfactorio
29	19.79	0.43	Satisfactorio
30	20.15	0.97	Satisfactorio

5.3.3.2. Homogeneidad de varianza

Esta prueba estadística Bartlett, se toma como requisito para la determinación de la veracidad. La prueba es específica para datos con distribución normal.

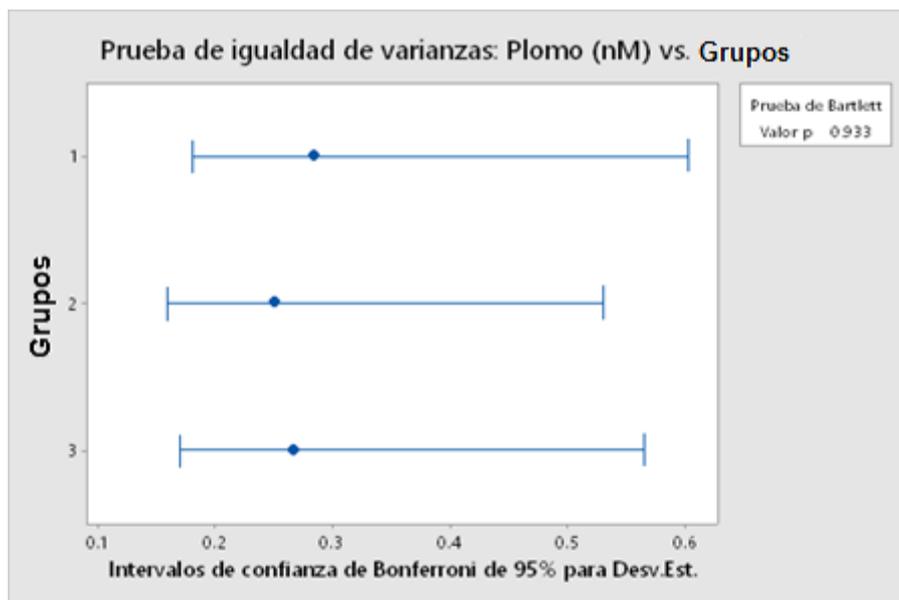


Figura 25. Prueba de Bartlett, grafica de la distribución de las varianzas de los tres grupos, donde se muestra los límites de confianza de Bonferroni. Los puntos azules corresponden a las desviaciones estándar de los grupos.

Los resultados de la prueba de Bartlett aplicada a los 30 datos previamente descritos se muestran en la figura 25. Se obtuvo un $p\text{-value} = 0.933$, que es mayor que el nivel de significancia (0.05). Por tanto, podemos concluir que los grupos de datos obtenidos en días diferentes tienen similar precisión.

5.3.3.3. Igualdad de medias

Esta prueba estadística se toma como requisito para la determinación de la veracidad.

En la figura 26 se muestran las distribuciones de concentración de Pb^{+2} entre los 3 grupos y se comparan las medias. Se efectuó la prueba ANOVA de un solo factor, en este caso el factor que podía provocar la variación corresponde a los diferentes días de lecturas entre los grupos. Se obtuvo un $p\text{-value} = 0.696$, mayor que el nivel de significancia (0.05). Por tanto, podemos concluir que los analistas tienen promedios similares.

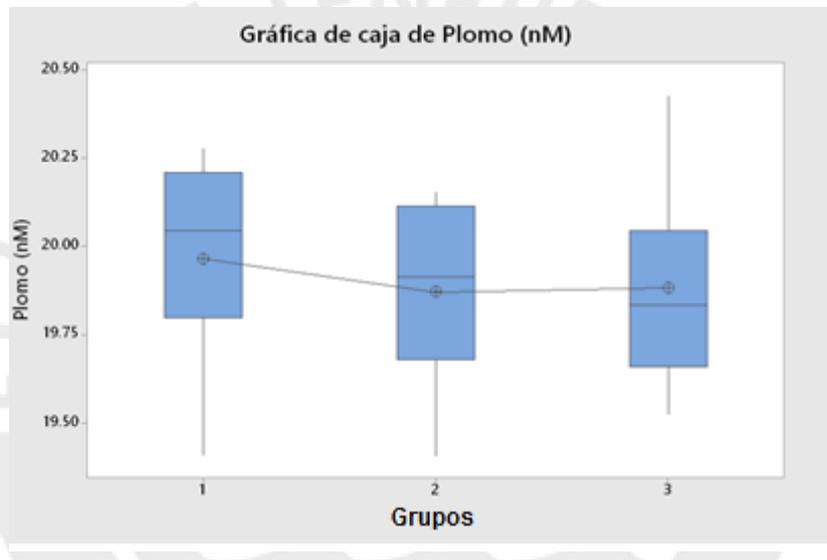
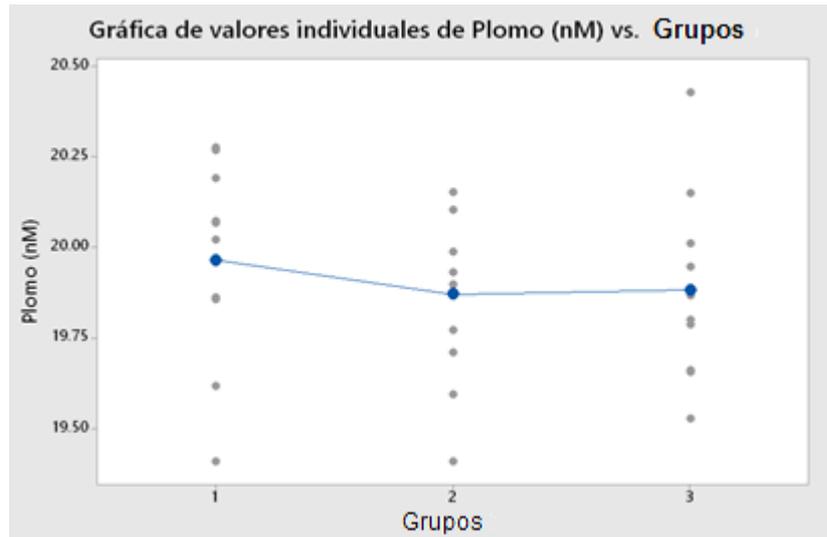


Figura 26. Gráficos de distribución de datos concentración de Pb^{+2} , Arriba: Grafica de distribución de los valores individuales de concentración de Pb^{+2} en los 3 grupos. Abajo: Grafica de cajas y distribución de las medias entre los grupos.

La distribución normal de los residuales se comprobó a través de una prueba de normalidad Anderson Darling, tal como se muestra en la figura 27 un p -value de 0.745. Así, se confirmó que la distribución de residuales es aleatoria y normal.

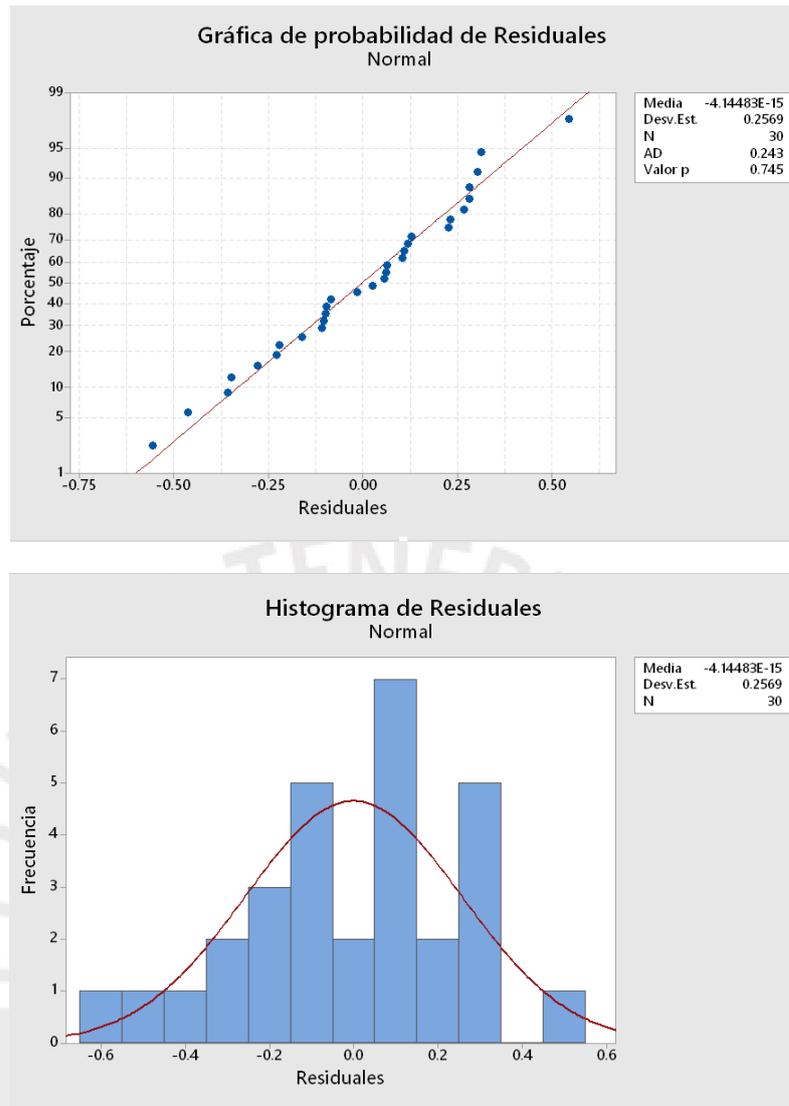


Figura 27. Prueba de Anderson Darling para los residuales. Arriba: Grafica de probabilidad de distribución de los residuales, donde la línea central de referencia representa la línea de normalidad de los datos. Abajo: Grafica de histograma de la distribución de residuales, donde la línea roja representa la distribución normal.

5.3.4. Parámetros de validación y tratamiento estadístico

5.3.4.1. Linealidad

Se obtuvieron 3 curvas de calibrado, cada una compuesta de un blanco y 6 patrones de calibrado, descritas en la sección 5.2.9.1. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 27 con sus respectivos estadísticos descriptivos y los estimadores de linealidad en la tabla 28.

Tabla 27. Absorbancias y ratio de A520/A600 de las 3 curvas de calibrado con su estadística descriptiva.

Concentración de Pb ⁺² (nM)	Abs 520	Abs 600	A600/A520	Promedio	Desviación estándar
Blanco	0.3223	0.0633	0.20	0.22	0.02
	0.2975	0.0711	0.24		
	0.3356	0.0744	0.22		
10	0.3105	0.0955	0.31	0.30	0.01
	0.2977	0.0890	0.30		
	0.3165	0.0935	0.30		
20	0.2750	0.0980	0.36	0.36	0.01
	0.2820	0.0990	0.35		
	0.2785	0.1035	0.37		
40	0.2979	0.1333	0.45	0.47	0.02
	0.2977	0.1402	0.47		
	0.2939	0.1430	0.49		
60	0.3004	0.1692	0.56	0.57	0.03
	0.3001	0.1647	0.55		
	0.2844	0.1735	0.61		
80	0.2959	0.2004	0.68	0.68	0.01
	0.2852	0.1977	0.69		
	0.2738	0.1840	0.67		
100	0.2452	0.2040	0.83	0.83	0.01
	0.2534	0.2142	0.85		
	0.2663	0.2191	0.82		

Tabla 28. Coeficiente de determinación de las 3 curvas de calibrado.

Curva	Pendiente	Intersecto	Coeficiente de determinación (r^2)
1	0.0059	0.2206	0.9913
2	0.0059	0.2327	0.9926
3	0.0058	0.2413	0.9918
Promedio	0.0059	0.2315	0.9919

A partir de los datos obtenidos en la tabla 28 se obtuvo valores de coeficiente de determinación (r^2) superiores a 0.99, valor propuesto en la literatura,⁶¹ demostrando la linealidad de la metodología en el rango de trabajo. Se evaluó la curva resultante de promediar las 3 curvas de calibrado y se estimaron las desviaciones estándar para cada concentración de Pb⁺², tal como se muestra en la figura 28.

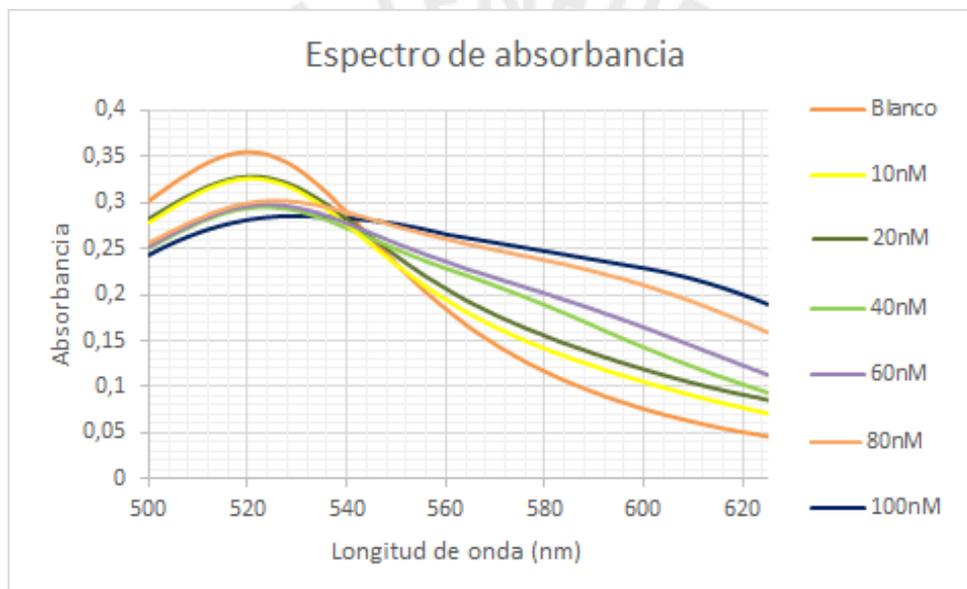
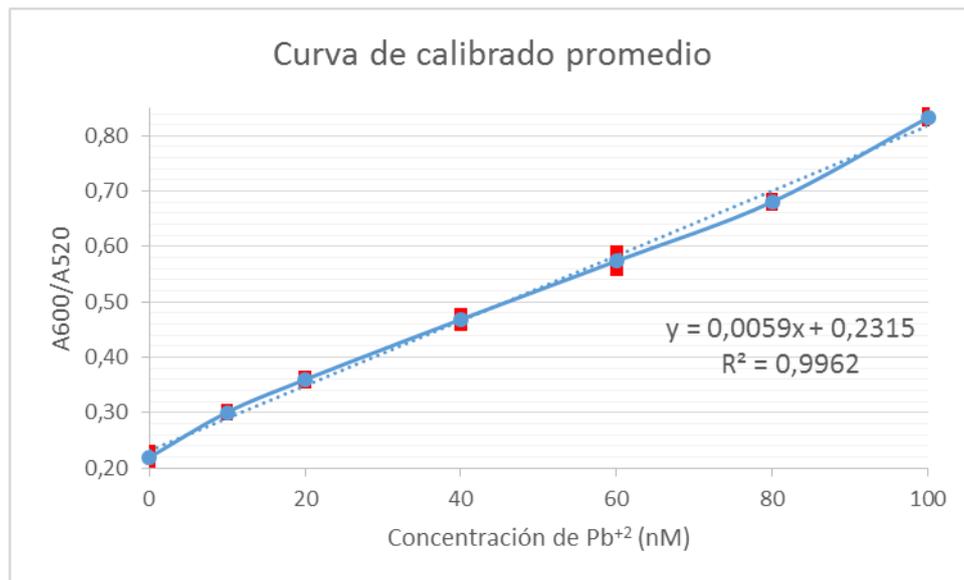


Figura 28. Curva de calibración de Pb²⁺, Arriba: curva de calibración promedio a partir de las medias de las 3 curvas de calibrado, donde las barras rojas representan la desviación estándar. Abajo: Espectros de absorbancia en el rango de 500 a 625 nm de los puntos de concentración de Pb²⁺ de la curva de calibración.

5.3.4.2. Límite de detección (LD)

Se analizaron 10 réplicas de blancos matriz, escogida para este ensayo según la sección 5.2.9.2, empleando la metodología propuesta en las secciones **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y 5.2.6. Los resultados son mostrados en la tabla 29.

Tabla 29. Datos de blancos matriz para determinación de límites de detección y cuantificación.

Blancos	Concentración de Pb ⁺² (nM)
Bk-1	0.013
Bk-2	0.625
Bk-3	0.092
Bk-4	0.426
Bk-5	0.078
Bk-6	0.089
Bk-7	0.379
Bk-8	0.090
Bk-9	0.484
Bk-10	0.531
Desviación estándar	0.229
LD = 3*s	0.688

LD Plomo	0.70	nM
-----------------	-------------	-----------

El límite de detección se calculó según la sección 5.2.9.2 y se redondeó a un valor superior tomando en cuenta las cifras significativas, es decir LD 0.70 nM.

5.3.4.3. Límite de cuantificación (LC)

El límite de cuantificación se obtiene a través de la multiplicación de la desviación estándar de blancos obtenida en la tabla 29 por una constante numérica de 10 descrita en la sección 5.2.9.3.

LC Plomo	2.30	nM
-----------------	-------------	-----------

Además, se prepararon blancos matriz fortificado con la concentración experimental del LC calculado, valor que se comprobó a través del análisis de 3 réplicas mostradas en la tabla 30, donde el promedio de las réplicas es cercano al LC.

Tabla 30. Datos de blancos matriz fortificados para la verificación del límite de cuantificación.

Blanco matriz fortificado	Concentración de Pb ⁺² (nM)
Bk-F1	2.29
Bk-F2	2.67
Bk-F3	2.12
Promedio	2.36

5.3.4.4. Veracidad

La veracidad del método se determinó en términos de recuperación, es decir, por adición de una alícuota del estándar de Pb⁺² de 10 nM a una muestra de agua

para uso y consumo humano de concentración previamente cuantificada, para verificar si el porcentaje de recuperación obtenido es aceptable. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 31.

Tabla 31. Datos de muestras fortificadas y porcentajes de recuperación de la adición estándar con la estadística descriptiva.

No	Concentración Inicial de muestra matriz (nM)	Concentración Obtenida (nM)	Concentración recuperada (nM)	Porcentaje de Recuperación (%)
1	6.51	17.49	10.98	109.7
2	6.75	16.98	10.23	102.3
3	6.75	16.84	10.09	100.9
4	6.82	16.85	10.03	100.3
5	6.14	15.89	9.75	97.5
6	6.21	15.65	9.45	94.5
7	6.60	16.39	9.79	97.9
8	6.78	16.84	10.05	100.5
9	6.62	17.32	10.70	107.0
10	6.44	16.42	9.98	99.8
Promedio				101.0
Desviación estándar				4.48

Los valores de recuperación de concentración de Pb^{+2} obtenidos en la tabla 31 representan la correcta cuantificación de fortificaciones sobre muestras. La tabla 32 muestra el resultado de la prueba estadística del t-Student de una muestra para el promedio de porcentaje de recuperaciones de Pb^{+2} , donde se obtuvo un valor de $t = 0.73$ para los datos de la tabla 31.

Tabla 32. Estimación de t-Student 1 muestra experimental, sobre el promedio de los porcentajes de recuperación.

Variable	Nº de replicas	Media	Desviación estándar	Error estándar de la media	Intervalos al 95%	t-exp	P
Recuperación	10	101.04	4.48	1.42	(97.83, 104.24)	0.73	0.483

La veracidad se evaluó siguiendo el procedimiento descrito en la sección 5.2.9.5. Se obtuvo que el t -tabla $(9, 0.05) = 1.83$ y t -exp=0.73. Como t -exp> t -tabla, entonces podemos concluir que la media de la recuperación es semejante al 100%.

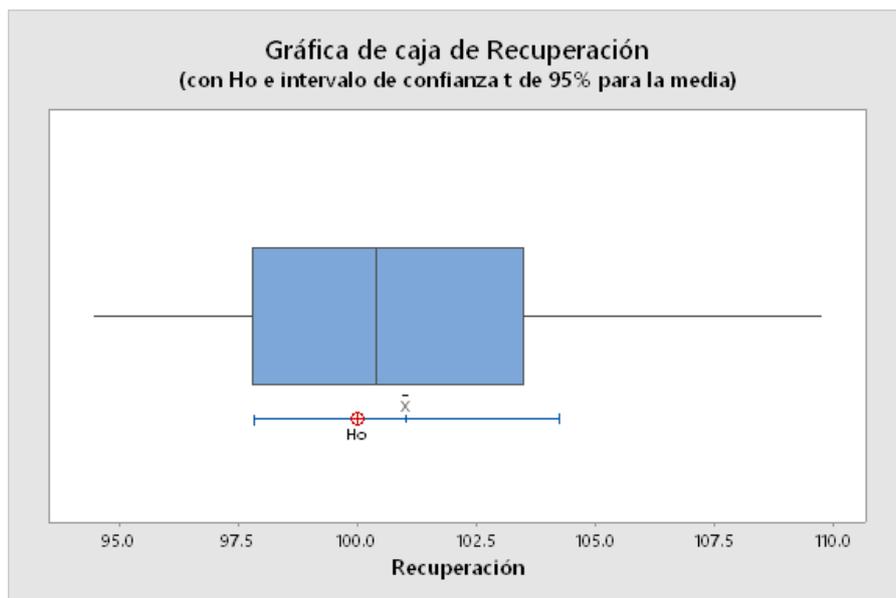


Figura 29. Gráfico de cajas de la recuperación por el método de adición estándar, donde la barra azul representa el intervalo de confianza a 95% de confiabilidad.

En la figura 29, podemos observar que el valor de hipotético de recuperación, 100 % (H_0) se encuentra dentro del intervalo de confianza (intervalo azul) y además es cercano al promedio de recuperaciones (\bar{x}).

5.3.4.5. Precisión

Se siguió el procedimiento descrito en la sección 5.2.9.5 basado en el RSD Horwitz a 2 niveles de concentración (10 y 100 nM, menor y mayor valor de concentración en la curva de calibrado de Pb^{+2}).

La tabla 33 muestra las concentraciones de Pb^{+2} obtenidas a ambos niveles.

Tabla 33. Datos de concentración de Pb^{+2} a nivel bajo y alto para determinar la precisión.

Concentración de Pb^{+2}	
Nivel bajo	Nivel alto
10nM	100nM
9.46	98.1
10.2	100
9.78	100
9.73	99.4
10.3	102
10.6	94.3
10.4	102
9.27	97.0
10.0	91.1
9.40	97.0

Tabla 34. Estimación de límites de repetibilidad y reproducibilidad para el nivel bajo y alto de concentración de Pb^{+2} .

	Nivel bajo	Nivel alto
	10nM	100nM
Límite r	0.70	5.25
Límite R	16.0	159

Tabla 35. Estimación del RSD experimental y Horwitz para la precisión de la metodología.

	ANALITO	% RSD Experiment.	% RSD Horwitz
Nivel bajo	Plomo	4.52	32.0
Nivel alto		3.43	22.7

La tabla 34 muestra los límites máximos de desviación de concentración de Pb^{+2} aceptada en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, que representan las tolerancias aceptadas dentro de la metodología de validación para los niveles de concentración de Pb^{+2} .

Adicionalmente, la comparación entre el RSD teórico o RSD de Horwitz y el RSD experimental, mostrada en la tabla 35 indica que la desviación experimental es menor a la desviación máxima esperada dentro de la metodología, por lo tanto, la precisión del método aceptable para los niveles de concentración estudiados.

5.3.4.6. Selectividad

El estudio de selectividad o estimación de interferentes se realizó sobre una muestra de 10 nM de Pb^{+2} . Se determinó la máxima concentración de interferentes que no alterara la cuantificación de Pb^{+2} . Los interferentes empleados se muestran en la tabla 36.

Tabla 36. Lista de iones interferentes estudiados y los valores de LMP para la matriz de agua para uso y consumo según MINSA.⁸³

Ion Interferente		Límite máximo permisible	Unidades
		MINSA ⁽¹⁾	
Cloruro	Cl ⁻¹	250	mg/L
Potasio	K ⁺¹	-	-
Estroncio	Sr ⁺²	-	-
Hierro	Fe ⁺²	0,3 ⁽²⁾	mg/L
Sulfato	SO ₄ ⁻²	250 ⁽²⁾	mg/L
Carbonato	CO ₃ ⁻²	-	-
Sodio	Na ⁺¹	200 ⁽²⁾	mg/L
Fluoruro	F ⁻¹	1	mg/L
Nitrito	NO ₂ ⁻¹	3,00 Exposición corta	mg/L
		0,20 Exposición larga	
Nitrato	NO ₃ ⁻¹	50	mg/L
Calcio	Ca ^{+2 (3)}	120	mg/L
Magnesio	Mg ^{+2 (3)}	50	mg/L

(1) Extraído de DS N° 031-2010-SA.

(2) Valores establecidos solo en calidad organoléptica

(3) Expresado como dureza

Como criterio de aceptación para estimar las concentraciones máximas de interferentes que no alteraran la respuesta del sensor, se usó el límite r para el nivel de concentración de 10 nM de Pb⁺² es 0.70 nM, según la tabla 34.

La tabla 37 muestra que las máximas concentraciones de interferentes permitidas por la metodología, sin ocasionar un error significativo, son superiores a los LMP descritos por el MINSA para la matriz de agua para uso y consumo humano.

Tabla 37. Estudio de interferencias.

Fuente de interferencia	Concentración de Pb ⁺² 10 nM con presencia de interferencia	Concentración máxima permitida de la sal interferente mg/L	Ion interferente	Concentración máxima permitida por cada ion interferente mg/L
Cloruro de potasio (KCl)	10.68	800	Cl ⁻¹	380
			K ⁺¹	420
Cloruro de estroncio (SrCl ₂ .6H ₂ O)	9.37	40.0	Cl ⁻¹	8.94
			Sr ⁺²	22.1
Sulfato ferroso (FeSO ₄ .7H ₂ O)	9.62	2.00	Fe ⁺²	0.735
			SO ₄ ⁻²	1.26
Cloruro férrico (FeCl ₃ .6H ₂ O)	10.00	2.00	Fe ⁺³	0.689
			Cl ⁻¹	0.437
Carbonato de sodio (Na ₂ CO ₃)	9.88	1600	CO ₃ ⁻²	906
			Na ⁺¹	347
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	9.52	1200	HCO ₃ ⁻¹	871
			Na ⁺¹	328
Fluoruro de sodio (NaF)	10.38	400	F ⁻¹	181
			Na ⁺¹	219
Nitrito de sodio (NaNO ₂)	9.85	800	NO ₂ ⁻¹	533
			Na ⁺¹	267
Nitrato de sodio (NaNO ₃)	9.36	1200	NO ₃ ⁻¹	875
			Na ⁺¹	325
Sulfato de sodio (NaSO ₄)	9.66	1600	SO ₄ ⁻²	1291
			Na ⁺¹	309
Cloruro de calcio (CaCl ₂ .2H ₂ O)	10.44	1600	Cl ⁻¹	511
			Ca ⁺²	578
Cloruro de magnesio (MgCl ₂ .6H ₂ O)	10.52	1200	Cl ⁻¹	447
			Mg ⁺²	306

5.3.5. Estimación de la incertidumbre

Para la estimación de la incertidumbre se tomó como datos los valores obtenidos en la determinación de la normalidad de datos en la tabla 25.

Debido a que este trabajo fue realizado por un solo analista, los cálculos de incertidumbre de analista, sesgo y metodología, fueron realizados sobre los datos únicos del analista. Cuando el método sea desarrollado por diferentes analistas, se deberá determinar sus propios valores de incertidumbre.

Nota: Para expresar la incertidumbre de los pasos metodológicos parciales, como U_{sesgo} , $U_{analista}$ o $U_{metodología}$, no se usa las unidades del analito, sino que se considera adimensional. Solo a la incertidumbre total se le asigna las mismas unidades que el resultado del cual va acompañado.

5.3.5.1. Identificación de las fuentes de incertidumbre

Las fuentes de incertidumbre fueron tomadas como provenientes del trabajo del analista, del sesgo sobre un valor de referencia establecido y de los pasos metodológicos que afectan directamente a los resultados. La incertidumbre se combina en una única incertidumbre según la siguiente ecuación:

$$U_{combinada} = \sqrt{U^2_{metodología} + U^2_{analista} + U^2_{sesgo}} \quad \text{Ecuación 15}$$

5.3.5.2. Incertidumbre del analista

Para la determinación de la incertidumbre de los analistas se tomó como referencia las desviaciones estándar de la tabla 25. La incertidumbre de analista se muestra en la tabla 38, valor numéricamente igual al promedio de las desviaciones estándar para cada analista.

Tabla 38. Estimación de la incertidumbre del analista a partir de las desviaciones estándar.

Secuencia	Desviación estándar	Promedio	U analista	U ² analista
1	0.283	0.28	0.28	0.08
2	0.249			
3	0.266			

5.3.5.3. Incertidumbre del sesgo

La incertidumbre del sesgo, se determinó para cada analista al comparar el promedio respecto del valor de referencia, provenientes de muestra control. Los valores se obtuvieron de la tabla 25, el cálculo de la incertidumbre de sesgo se muestra en la tabla 39.

Tabla 39. Estimación de la incertidumbre de sesgo a partir del valor de referencia de Pb²⁺.

Secuencia	Concentración de plomo (nM)	Promedio	Valor de referencia	U sesgo	U ² sesgo
1	19.96	19.91	20.00	0.09	0.008
2	19.87				
3	19.88				

5.3.5.4. Incertidumbre de la metodología

Para la estimación de incertidumbre se tomó como ejemplo la concentración de 100 nM de Pb²⁺ en muestra. Esta incertidumbre se determinó a partir de la ecuación de cuantificación de Pb²⁺ de la fórmula siguiente:

$$C_{\text{Muestra}} = C \times Fd, \quad \text{Ecuación 16}$$

donde

C_{Muestra} : Concentración de Pb^{+2} en la muestra [nM]

C: Concentración de Pb^{+2} en el volumen de lectura [nM]

Fd: Factor de dilución, razón entre el volumen total de lectura y el volumen de alícuota de la muestra.

La incertidumbre para la metodología se determinó mediante la correspondiente ecuación de propagación de incertidumbres de la ecuación 16, desarrollada por las derivadas parciales, obteniendo la ecuación 18, en la que se expresa la incertidumbre de la metodología como una función dependiente de las incertidumbres de concentración (U_C) e incertidumbre del factor de dilución (U_{Fd}). Por lo tanto, antes se debe estimar estas incertidumbres por separado.

$$U_{\text{Met}}^2 = \left(\frac{\partial (C \times Fd)}{\partial C} \times U_C \right)^2 + \left(\frac{\partial (C \times Fd)}{\partial Fd} \times U_{Fd} \right)^2 \quad \text{Ecuación 17}$$

$$U_{\text{Met}}^2 = (Fd \times U_C)^2 + (C \times U_{Fd})^2 \quad \text{Ecuación 18}$$

Incertidumbre del factor de dilución

El parámetro Fd describe una relación entre el volumen total de lectura y el volumen de muestra, representado en la siguiente ecuación:

$$Fd = \frac{V_t}{V_{Al}} \quad \text{Ecuación 19}$$

donde a su vez el volumen total está dado por su propia ecuación:

$$V_t = V_{\text{AuNP-AM}} + V_{\text{Buf}} + V_{\text{H}_2\text{O}} + V_{Al} \quad \text{Ecuación 20}$$

donde

V_{Al} : Volumen de alícuota de muestra (250 μL)

V_t : Volumen total de lectura de muestra (1000 μL)

$V_{\text{AuNPs-AM}}$: Volumen de las nanopartículas funcionalizadas (600 μL)

V_{Buf} : Volumen del buffer 0.2 M pH 5.8 (70 μL)

$V_{\text{H}_2\text{O}}$: Volumen de agua UP (80 μL)

La incertidumbre del factor de dilución se determinó mediante la correspondiente ecuación de propagación de incertidumbres de la ecuación 19 y 20, desarrollada por las derivadas parciales, obteniendo la ecuación 22.

$$U_{Fd}^2 = \left(\frac{\partial \left(\frac{V_t}{V_{Al}} \right)}{\partial V_{Al}} \times U_{V_{Al}} \right)^2 + \left(\frac{\partial \left(\frac{V_t}{V_{Al}} \right)}{\partial V_t} \times U_{V_t} \right)^2 \quad \text{Ecuación 21}$$

$$U_{Fd}^2 = \left(\frac{-V_t}{V_{Al}^2} \times U_{V_{Al}} \right)^2 + \left(\frac{1}{V_{Al}} \times U_{V_t} \right)^2 \quad \text{Ecuación 22}$$

Para resolver la ecuación 21 se necesita estimar la incertidumbre del volumen total (U_{V_t}) que está dada por la siguiente ecuación:

$$U_{Vt}^2 = U_{V_{AuNP-AM}}^2 + U_{V_{Buf}}^2 + U_{V_{H2O}}^2 + U_{V_{Al}}^2 \quad \text{Ecuación 23}$$

La tabla 40 muestra las incertidumbres parciales de los volúmenes involucrados en la ecuación 22. Las incertidumbres resueltas del volumen total y factor de dilución (ecuaciones 23 y 22 respectivamente), se muestra en la tabla 41.

Tabla 40. Estimación de las incertidumbres parciales de los pasos metodológicos para la determinación de la Incertidumbre de la metodología.

Proceso	Volumen	Tolerancia (μl)	Factor de cobertura (K)	Incertidumbres parciales
V AuNP-AM	600 μl	8.00	2.45	3.27
V Buf	70 μl	0.80	2.45	0.33
V H2O	80 μl	0.80	2.45	0.33
V Al	250 μl	4.00	2.45	1.63

Tabla 41. Estimación de las incertidumbres combinadas de los pasos metodológicos para la determinación de la Incertidumbre de la metodología.

$U^2 Vt$	13.55
$U Vt$	3.68
$U^2 Fd$	0.005
$U Fd$	0.02

Incertidumbre de la concentración

La incertidumbre de la concentración es el error asociado con la curva de calibrado del analito y se estimó en base a los datos de las tres curvas de calibrado de la tabla 27 mediante la fórmula siguiente.^{69,84}

$$U_C = \frac{S_e}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{n S_x^2}} \quad \text{Ecuación 24}$$

donde

S_e : Promedio de cuadrados de los residuales de la curva de calibrado

b : Pendiente de la curva de calibrado

m : Número de repeticiones por cada punto de la curva de calibración

n : Número de estándares en la curva de calibrado

x_0 : Concentración de la muestra de Pb^{+2}

\bar{x} : Promedio de las concentraciones de todos los estándares en la curva de calibrado

S_x^2 : Varianza de las concentraciones de todos los estándares en la curva de calibrado

Los valores definidos en la ecuación de incertidumbre de concentración (ecuación 24) fueron obtenidos de las curvas de calibración descritas en la de la

tabla 27 y se muestran en la tabla 42 y la incertidumbre resultante, calculada según la ecuación 24 y se muestra en la tabla 43.

Tabla 42. Valores de los parámetros requeridos para la determinación de la incertidumbre de la concentración.

m	3
n	7
\bar{X}	44.3 nM
S_x^2	1395 nM ²
b	0.006
S_e	0.0003
X_o	100 nM

Tabla 43. Estimación de la incertidumbre de la concentración.

U_c^2	0.05
U_c	0.22

A partir de los valores de incertidumbre de factor de dilución e incertidumbre de concentración (tablas 41 y 43), se calculó la incertidumbre de la metodología empleando la ecuación 18, para valores de $F_d=4$ y $C=100$ nM, valores usados para el ejemplo de tomar 250 μ L de muestra y 100 nM de concentración de Pb^{+2} . El resultado se muestra en la tabla 44.

Tabla 44. Estimación de la incertidumbre de la metodología.

$U_{\text{Metodología}}^2$	5.37
$U_{\text{metodología}}$	2.32

5.3.5.5. Combinación de las Incertidumbres parciales

Luego de resueltas las incertidumbres parciales de todos elementos anteriores, se determinó la incertidumbre combinada. La tabla 45 muestra los valores numéricos relevantes para el cálculo correspondiente al ejemplo tratado. Los coeficientes de sensibilidad se refieren a la contribución de cada factor a la incertidumbre combinada. Los coeficientes de sensibilidad correspondientes a U_{Analista} , U_{Sesgo} y $U_{\text{Metodología}}$ se asumen iguales a 1.⁷⁰ La incertidumbre de la metodología incluye las incertidumbres de concentración (U_c) e incertidumbre del factor de dilución (U_{F_d}). Para esos casos, los coeficientes de sensibilidad representan su grado de contribución a $U_{\text{Metodología}}$ y se obtienen de las derivadas parciales mostradas en la ecuación 18.

Una manera fácil de interpretar las incertidumbres parciales es la gráfica de Kragten, mostrada en figura 30 en la cual se muestra el valor de incertidumbre al cuadrado (U^2) de la tabla 45. Se observa que el mayor factor de contribución de las incertidumbres es la metodología (98.6%), afectada principalmente por el factor de dilución F_d (84.8%) seguida por la concentración (13.6%).

Tabla 45. Estimación de las incertidumbres parciales por factores.

Factores	Valores numéricos	Incertidumbre parcial (U)	Coefficiente de sensibilidad	Valor de incertidumbre al cuadrado (U) ²	Contribución porcentual
Analistas		0.28	1	0.08	1.4%
Sesgo		0.09	1	0.009	0.2%
Metodología		2.32	1	5.37	98.4%
Fd	4	0.02	100	4.63	84.8%
C	100	0.22	4	0.74	13.6%

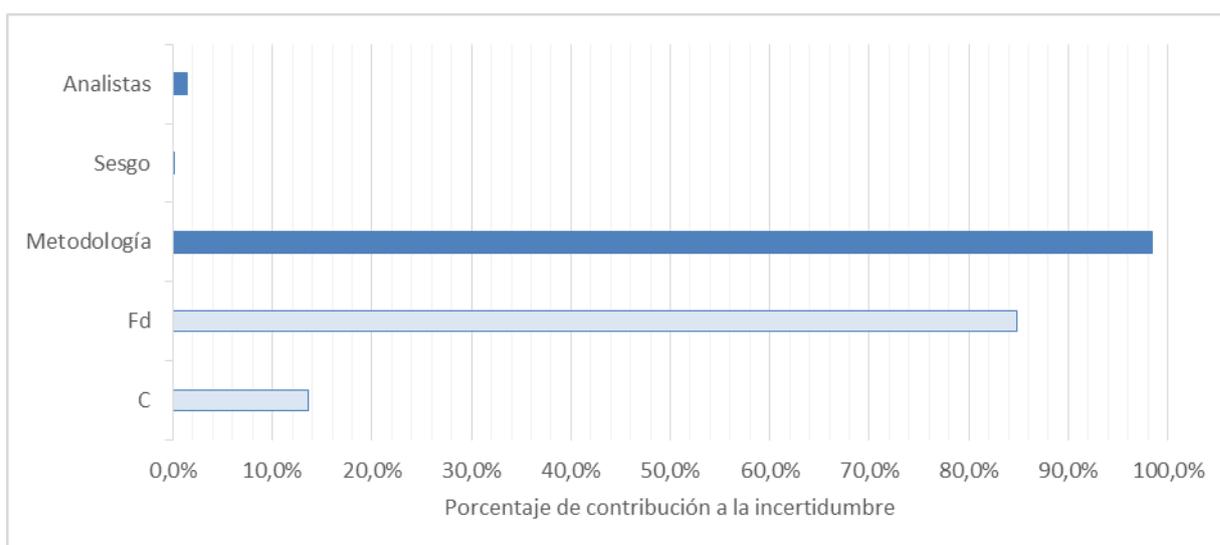


Figura 30. Diagrama de Kragten de las fuentes de incertidumbre y su contribución de la metodología propuesta. Las barras de Fd y C corresponden a su contribución dentro de la metodología.

Las incertidumbres parciales por si solas no aportan mucha información sobre el resultado final. La incertidumbre combinada, calculada según la ecuación 15, se muestra en la tabla 46.

Tabla 46. Estimación de la incertidumbre combinada para la metodología propuesta.

Ucombinada ² Plomo	5.45
Ucombinada Plomo	2.34

5.3.5.6. Incertidumbre expandida

La incertidumbre expandida es la que acompaña al resultado final de concentración de Pb²⁺. A partir de los datos obtenidos se expresa la concentración de Pb²⁺ asociada a la incertidumbre total. La tabla 47 muestra las incertidumbres expandidas para el ejemplo inicial de 100 nM de Pb²⁺, obtenida a partir de la incertidumbre combinada multiplicada por 2, según la sección 5.2.10.5. Adicionalmente, se muestran valores de incertidumbres para diferentes

concentraciones de Pb^{+2} a lo largo del rango de trabajo, obtenidos de manera análoga. Para valores bajos de concentración de Pb^{+2} la incertidumbre no decrece proporcionalmente, debido a que las incertidumbres de sesgo y analista son fijas y no dependen del valor de la concentración, solo la incertidumbre de la metodología depende del valor de concentración que la acompaña.

Tabla 47. Estimación de la incertidumbre expandida de las diferentes concentraciones de Pb^{+2} en la curva de calibrado para la metodología propuesta.

		Incertidumbre
Concentración obtenida de Pb^{+2} (nM)	100	± 5 nM
	80.0	± 3.9 nM
	60.0	± 3.1 nM
	40.0	± 2.4 nM
	20.0	± 1.9 nM
	10.0	± 1.8 nM

5.3.6. Informe de validación

Esta sección resume la validación del método colorimétrico basado en AuNPs funcionalizadas con AM para la determinación de Pb^{+2} en muestras de agua para uso y consumo humano a niveles trazas (concentraciones menores a 0.01%).⁷⁷ El principio de la metodología se basa en el desplazamiento hacia el rojo de la banda de absorción LSPR en presencia de Pb^{+2} . Para la cuantificación del analito, se empleó el criterio de A_{520}/A_{600} , medido con un espectrofotómetro de UV-Vis.

Alcance

Este método de ensayo abarcó la matriz de agua para uso y consumo humano^{64,83} en el rango de trabajo de 2.30 nM a 100 nM de Pb^{+2} (0.48 $\mu\text{g/L}$ a 20.72 $\mu\text{g/L}$).

Muestreo

Se emplearon los siguientes pasos para el recojo de muestras de agua para uso y consumo humano o agua de la red de agua potable.⁸⁰

- Se aseguró la rotulación correcta del envase plástico
- Se enjuagó el recipiente 3 veces con la fuente de agua a muestrear.
- Se colectaron 100 mL de muestra sin dejar espacios con aire.
- Se cerró el envase herméticamente.

Curva de calibración y cálculos

La curva de calibración se realizó a partir de un estándar sólido, nitrato de plomo ($Pb(NO_3)_2$). Se preparó una solución estándar de una concentración final de 4.83 μM (1000 mg/L). A partir del cual se realizaron estándares intermedios con diluciones correspondientes con agua UP.

La concentración de Pb^{+2} en la solución muestra fue calculada por medio de la recta de calibrado. Se tomó un volumen de muestra de 250 μL , tomando en cuenta el volumen total del ensayo de 1000 μL , equivalente a una dilución de cuatro veces. El volumen tomado como muestra fue usado a 250 μL por la concentración de iones inherente a la matriz de estudio (agua para uso y consumo humano). Este valor de muestra puede tomarse como menor, en caso no se presente interferencia o alteración de señal en el resultado final. La concentración final de Pb^{+2} en la muestra se expresa según las unidades que se necesite:

$$C_{Muestra} = 4 * C \quad \text{Ecuación 25}$$

$$C_{Muestra(\mu g/L)} = 0.8288 * C \quad \text{Ecuación 26}$$

Parámetros de validación

Se determinó la linealidad con 3 curvas de calibrado estudiadas en el rango de trabajo de 2.3 nM a 100 nM de Pb^{+2} , en términos de r^2 con valores de 0.9913, 0.9926 y 0.9918 (tabla 28); donde todos los valores fueron superiores a 0.99.

Se obtuvieron un LD y un LC altamente sensibles, en el cual el LD es de 0.70 nM (sección 5.3.4.2) y el LC de 2.3 nM (sección 5.3.4.3).

Se calculó la veracidad de la metodología en términos de recuperación sobre muestras reales de agua para uso y consumo que fueron fortificadas con un estándar de Pb^{+2} de 10 nM. Se obtuvo una recuperación promedio del 101.0% (tabla 31). Este valor es cercano al 100% de recuperación y fue contrastado con la prueba t-Student, por lo que se concluyó que el método es veraz.

La precisión fue descrita en términos de RSD de Pb^{+2} donde se obtuvieron RSD experimentales de 4.52% y 3.43% para 10 nM y 100 nM respectivamente. Estos fueron menores que los RSD Horwitz de 32.0% y 22.7% (tabla 35) para 10 nM y 100 nM de Pb^{+2} . Por lo tanto, el método es preciso.

Los límites de variabilidad de Pb^{+2} en condiciones de repetibilidad para las concentraciones de 10 nM y 100 nM de Pb^{+2} fueron de 0.70 nM y 5.25 nM, respectivamente; y para condiciones de reproducibilidad fueron de 16 nM y 159 nM, respectivamente (tabla 34).

6. Discusión de resultados

6.1. Optimización del ensayo analítico

El proceso de optimización se llevó a cabo escogiendo algunos parámetros que podrían afectar el ensayo de manera importante. Se propusieron condiciones superiores e inferiores para dichos parámetros (mostrados en las tabla 13 para un rango de trabajo de 0 a $5 \mu\text{M}$ de Pb^{+2} y en la tabla 23 para un rango de trabajo de 0 a 100 nM Pb^{+2}) y se evaluó su impacto en el resultado final mostrado en la sección 5.3.2.

Se encontraron 3 parámetros relevantes para la metodología propuesta, en términos de sensibilidad y linealidad de la respuesta.

- pH del ácido maleico durante la funcionalización de las AuNPs.

El pH de la solución de AM empleada durante la funcionalización afecta fuertemente los resultados obtenidos. Dado que la solución de AM naturalmente es bastante ácida (solución de AM 10.0 mM tiene pH 1.13), fue necesario modificar el pH de la solución. Se obtuvo una respuesta óptima empleando un pH a 6.2 para la solución de AM. Este pH es cercano al segundo pKa del AM ($\text{pKa}_2=6.33$).⁸⁵ En contraste, valores por encima o por debajo de dicho pH (5.2 o 7.2), impidieron la correcta funcionalización de las AuNPs con AM. Esto se debe a que el pH modula la carga y, por tanto, las fuerzas electrostáticas entre AuNPs y moléculas de AM.

- Concentración de AuNPs en el ensayo

Se encontró que con una concentración muy baja de AuNPs, (1 nM) el sensor se satura a concentraciones bajas de Pb^{2+} , mientras que para una concentración muy alta de AuNPs (3 nM), el sensor pierde sensibilidad. Una concentración intermedia (2 nM) resultó óptima. Esto puede entenderse en base a la proporción AuNPs: Pb^{+2} . Cuando la proporción es muy alta, se impide la adecuada detección de Pb^{+2} , mientras que si la proporción es muy baja las AuNPs se saturan y cambian bruscamente su estado de agregación perdiendo linealidad.

- Concentración del buffer del ensayo.

La fuerza iónica del medio es una limitante importante en la estabilidad de las AuNPs y ha sido descrita como interferente importante en varios métodos que utilizan las AuNPs como base para sensores químicos^{7,33,44}. La estabilidad de las AuNPs es afectada por los iones del medio, que apantallan la repulsión entre las AuNPs y favorecen su agregación.³³

En el ensayo de cuantificación, para una concentración muy baja de buffer (10 mM) se observó pérdida de sensibilidad en la metodología ya que el medio no tenía la suficiente fuerza iónica para disminuir la repulsión interpartícula. En contraste, para una concentración muy alta de buffer (20 mM), el sensor se saturó rápidamente debido a una excesiva fuerza iónica del medio. Una concentración intermedia (14 mM) resultó óptima.

6.2. Validación metodológica

El proceso de validación fue establecido a través de hipótesis estadísticas iniciales, criterios de aceptación y diseños experimentales según la sección 5.2.9, donde se establecieron requisitos de validación y parámetros de validación respectivamente. Para todas las pruebas estadísticas, se tomó un nivel de significancia del 95%. Un *p-value* mayor a 0.05 indica que las pruebas estadísticas son significativas y las hipótesis iniciales planteadas son aceptadas.

Tanto los requisitos como los parámetros de la validación fueron necesarios para desarrollar una metodología válida y capaz de entregar resultados confiables. Todos los resultados descritos en las secciones 5.3.3 y 5.3.4 fueron obtenidos de diseños experimentales a partir de normas internacionales producidas por organizaciones como Eurachem^{62,70} y guías de validación emitidas por instituciones oficiales de países como Chile⁶¹ y Brasil.⁷⁷ Todos los documentos mencionados están basados en la norma internacional ISO/IEC 17025: 2006 "Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayos y calibración".⁶³

La metodología optimizada demostró ser lineal en el rango de trabajo (2.3 a 100 nM Pb⁺²) y alcanzó límites de sensibilidad altamente competitivos al ser comparado con los LD de diferentes sensores para la cuantificación de Pb⁺² como los mostrados en la tabla 1.

Las interferencias de la metodología fueron determinadas a partir de la matriz de la cual procede la validación y en concentraciones relacionadas a los valores tomados como LMP. Para la cantidad de alícuota de muestra tomada durante la validación fue de 250 µL (volumen total del ensayo de 1000 µL), los LMP para la matriz de agua para uso y consumo humano (tabla 36) resultaron adecuados para la metodología al compararlos con las máximas concentraciones de interferentes permitidas por la metodología (tabla 37).

7. Conclusiones y recomendaciones

7.1. Conclusiones

- Se sintetizaron las AuNPs con la metodología Turkevich-Frens, en base a una reducción con citrato de sodio dihidratado y se caracterizaron mediante espectroscopía UV-Vis. La metodología de síntesis empleada mostró buena reproducibilidad en cuanto a concentración (según su coeficiente de absortividad molar) y tamaño de las AuNPs de 14 nm de diámetro promedio (estimado según su banda LSPR a 519 nm).

- Las variables dentro de la metodología fueron optimizadas una a la vez, manteniendo fijas las demás y tomando las variables optimizadas como predeterminadas para la siguiente variable de optimización, el orden escogido para la optimización es según el orden del análisis.

- Las variaciones metodológicas propuestas en la sección 5.3.2 para el sensor lograron la optimización del método colorimétrico en términos de sensibilidad, al disminuir los LD y LC, y simplificación de la metodología, al lograr eliminar el paso metodológico de centrifugación posterior a la funcionalización de las AuNPs-AM.

- La validación se condujo de manera exitosa al comprobar experimentalmente los parámetros de validación sobre el protocolo optimizado descritos en las secciones **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y 5.2.6 para la matriz de agua para uso y consumo humano. La metodología desarrollada fue lineal en el rango de 2.3 a 100 nM de Pb^{+2} , fue veraz y precisa, y por ende exacta. Los LD y LC fueron altamente sensibles según la sección 5.3.6. La selectividad de la metodología se comprobó empleando 12 sales inorgánicas tomadas como fuentes de interferente descritos en la sección 5.3.4.6.

- Se realizó el cálculo de la incertidumbre asociada a todos los elementos relacionados con la metodología y con el analista a partir de los datos obtenidos en la validación mostrados en la sección 5.3.4. La incertidumbre obtenida para los niveles de concentración traza de Pb^{+2} en la metodología desarrollada determina la máxima variabilidad posible, que es atribuible a errores aleatorios inherentes en la cuantificación de Pb^{+2} .

7.2. Recomendaciones

- Se recomienda mantener las variables de optimización descritas en la sección 5.3.2 como las óptimas obtenidas. En caso de modificarlas, para ampliar el alcance del método, se necesitará una revalidación.

- Los factores como pH de la muestra matriz también pueden afectar el resultado final. Sería recomendable controlar el pH de la muestra para extender la validación a otro tipo de matriz en la cual la variabilidad en términos de pH sea amplia.

- La metodología descrita como espectrofotometría colorimétrica puede tener interferentes como la presencia de sólidos disueltos en la muestra. Para la matriz de agua para uso y consumo humano, la concentración de sólidos disueltos es mínima, pero en caso de ser necesario se debe filtrar la muestra con un filtro de nylon de 0.22 μm de diámetro de poro.



8. Bibliografía

1. Ratnarathorn N, Chailapakul O, Dungchai W. Highly sensitive colorimetric detection of lead using maleic acid functionalized gold nanoparticles. *Talanta*. 2015; 132: 613-618.
2. Ubilla C, Yohannessen K. Contaminación atmosférica efectos en la salud respiratoria en el niño. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2017; 28(1): 111-118.
3. Chen M, Cai H-H, Yang F, Lin D, Yang P-H & Cai J. Highly sensitive detection of chromium (III) ions by resonance Rayleigh scattering enhanced by gold nanoparticles. *Spectrochimica Acta - Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2014; 118: 776-781.
4. Lopez F. Estudio de la adsorción de arsénico presente en soluciones acuosas empleando materiales adsorbentes a base de quitosano modificado. Tesis de magister en Química. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú, Escuela de posgrado, 2017.
5. Rey de Castro R. Recuperación de cromo (III) de efluentes de curtido para control ambiental y optimización del proceso productivo. Tesis de licenciatura de Química. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú, Facultad de ciencias e ingeniería, 2013.
6. Melipillan P. Pre concentración de los metales Cd (II), Cu (II), Ni (II) y Pb (II) en muestras de agua con la resina poli(acido-2-acrilamidoglicólico) (PAAG) y determinación de la concentración por espectrometría de absorción atómica. Tesis de licenciatura de Químico Farmacéutico. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias, 2009.
Consultada: junio 2018.
<<http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2014/bmfciu.41i/doc/bmfciu.41i.pdf>>.
7. Tancredi P. Desarrollo de un sensor colorimétrico para detectar plomo. Tesis de licenciatura de Bioquímica. Universidad de la republica de Uruguay, Facultad de Ciencias. 2011.
8. Flores B. Diseño y validación de un método de análisis por espectrofotometría UV-VIS para cinc (II) y mercurio (II) en muestras acuosas. Tesis de licenciatura de Química. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú, Facultad de ciencias e ingeniería, 2011.
9. Scientific Committee on Health and Environmental Risks (SCHER) EC. *Lead Standard in Drinking Water*, 2011.
10. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Agency for toxic substances and disease registry Case Studies in Environmental Medicine (CSEM) lead toxicity. *U.S. Department of Health and Human Services Agency for Toxic Substances and Disease Registry Division of Toxicology and Environmental Medicine Environmental Medicine and Educational Services Branch*, 2010
11. Prüss-Üstün A, Fewtrell L, Landrigan PJ, Ayuso-Mateos JL. Comparative quantification of health risks. Global and regional burden of disease attributable to selected major risk factors Volume 2 Chapter 19 Lead exposure. World Health Organization Geneva; 2004:1497-1505.
12. Llop S, Porta M, Martínez MD, et al. Estudio de la evolución de la exposición a plomo en la población infantil española en los últimos 20 años. ¿Un ejemplo no reconocido de salud en todas las políticas? *Gaceta Sanitaria*. 2013, 27(2): 149-155.
13. Mora H. *Migración de plomo a travez de faces hidroquímicas del agua subterránea*. Tesis doctoral. Madrid. Universidad politécnica de Madrid Escuela, Departamento de Ingeniería civil, 2002.
14. Needleman H. Lead Poisoning. *Annual Review of Medicine*. 2004; 55(1): 209-222.

15. Zhong WS, Ren T, Zhao LJ. Determination of Pb (Lead), Cd (Cadmium), Cr (Chromium), Cu (Copper), and Ni (Nickel) in Chinese tea with high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2016; 24(1) 46-55.
16. Choleva TG, Kappi FA, Tsogas GZ, Vlessidis AG, Giokas DL. In-situ suspended aggregate microextraction of gold nanoparticles from water samples and determination by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta*. 2016; 151: 91-99.
17. Bakkali K, Martos NR, Souhail B, Ballesteros E. Characterization of trace metals in vegetables by graphite furnace atomic absorption spectrometry after closed vessel microwave digestion. *Food Chemistry*. 2009; 116(2): 590-594.
18. Liu H-W, Jiang S-J, Liu S-H. Determination of cadmium, mercury and lead in seawater by electrothermal vaporization isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy*. 1999, 54(9): 1367-1375.
19. Aslan K, Geddes CD. Wavelength-ratiometric plasmon light scattering-based immunoassays. *Plasmonics*. 2009; 4(4): 267-272.
20. Saha K, Agasti SS, Kim C, Li X, Rotello VM. Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. *Chemical Reviews*. 2012, 112(5), 2739-2779.
21. Criado Luna C, Castañeda Rodríguez D, Rosas Torres RA, Sánchez Juárez BP. Fenómenos físicos de las nanopartículas de oro. *Universidad Autonoma de Nuevo Leon Celerinet*. 2018; 1(1): 97-103.
22. International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC). *¿Razones Por Las Cuales Debería Emplearse Un Laboratorio Acreditado?*. Global Trust, Australia 2011.
23. Oficina de las naciones unidas contra la droga y el delito (UNODC). *Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos*. Naciones Unidas, Nueva York. 2010: 1-5.
24. Huayhua L. La respuesta estatal para solucionar el problema de contaminación ambiental por plomo en el Callao y sus efectos en la protección del derecho a gozar de un ambiente equilibrado y adecuado al desarrollo de la vida y a la salud de la población afectada. Tesis de magister en Derechos Humanos. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú, Escuela de posgrado, 2013..
25. González Balaguer DA, Rojas Farias WA. Relación entre la exposición crónica ocupacional al plomo y los efectos neurocomportamentales revisión documental. Tesis de licenciatura de Especialista en salud ocupacional. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de enfermería, 2008.
Consultada: septiembre de 2017
<<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/enfermeria/tesis36.pdf>>.
26. Hall S. Lead Pollution and poisoning. *Environmental Science & Technology*. 1972; 6(1): 30-35.
27. Chen K, Huang L, Yan B, Li H, Sun H, Bi J. Effect of lead pollution control on environmental and childhood blood lead level in Nantong, China: An interventional study. *Environmental Science & Technology*. 2014; 48(21): 12930-12936.
28. Wolfe PJ, Giang A, Ashok A, Selin NE, Barrett SRH. Costs of IQ loss from leaded aviation gasoline emissions. *Environmental Science & Technology*. 2016; 50(17): 9026-9033.
29. Organización de Estados Americanos (OEA). *Primera Cumbre de las Américas, Plan de Acción*. Miami, Florida, 1994.
Consultada Julio 2018
<http://www.summit-americas.org/i_summit/i_summit_poa_sp.pdf>
30. Betts KS. CDC Updates guidelines for children's lead exposure. *Environmental Health Perspectives*. 2012; 120(7): a268.

31. Mingos DMP. *Gold Clusters, Colloids and Nanoparticles*. Series Structure and Bonding. Editorial Springer International Publishing. University of Oxford, Oxford, United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland. 2014; 1-8.
32. Long NN, Vu L Van, Kiem CD, et al. Synthesis and optical properties of colloidal gold nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series*. 2009; 187(1): 12026.
33. Requejo K. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro con quitosana como agente reductor y estabilizador. Tesis de licenciatura de Química. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú, Facultad de ciencias e ingeniería, 2014.
34. Chen F, Wang Y, Ma J, Yang G. A biocompatible synthesis of gold nanoparticles by tris (hydroxymethyl) aminomethane. *Nanoscale Research Letters*. 2014; 9(1): 220
35. Ji-Young K and Jae-Seung L. Synthesis and Thermally Reversible Assembly of DNA–Gold Nanoparticle Cluster Conjugates. *Nano Letters*. 2009; 9(12): 4564-4569.
36. Zhao P, Li N, Astruc D. State of the art in gold nanoparticle synthesis. *Coordination Chemistry Reviews*. 2013; 257 (s 3-4): 638-665.
37. Nguyen DT, Kim D, Kim K. Controlled synthesis and biomolecular probe application of gold nanoparticles. *Micron*. 2011; 42(3): 207-227.
38. Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006; 110(32): 15700-15707
39. Pierre AC. *Introduction to Sol-Gel Processing*. The Kluwer International Series in Sol-Gel Processing: Technology and Applications 1. Publisher Springer US; 1998: 101-102.
40. Pong BK, Elim HI, Chong JX, Ji W, Trout BL, Lee JY. New insights on the nanoparticle growth mechanism in the citrate reduction of gold(III) salt: Formation of the Au nanowire intermediate and its nonlinear optical properties. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2007; 111(17): 6281-6287.
41. Link S, El-Sayed M a. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*. 1999; 103(21): 4212.
42. Haiss W, Thanh NTK, Aveyard J, Fernig DG. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Analytical Chemistry*. 2007; 79(11): 4215-4221.
43. Myers D. *Surfaces, Interfaces, and Colloids. Principles and Applications*. Vol 4.; Second edition, Editorial. John Wiley & Sons Inc. 1999: 84-85; 244-247.
44. Vasquez G. Desarrollo de un sensor químico a base de nanopartículas de oro para la determinación de Hg²⁺ en muestras de agua utilizando dispersión Rayleigh de resonancia. Tesis de magister en Química. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú, Escuela de posgrado, 2016.
45. Hernández Y, Coello Y, Fratila RM, de la Fuente JM, Lionberger TA. Highly sensitive ratiometric quantification of cyanide in water with gold nanoparticles via Resonance Rayleigh Scattering. *Talanta*. 2017; 167: 51-58.
46. Miao X, Ling L, Shuai X. Ultrasensitive detection of lead(II) with DNAzyme and gold nanoparticles probes by using a dynamic light scattering technique. *Chemical Communications*. 2011; 47(14): 4192.
47. Wu YS, Huang FF, Lin YW. Fluorescent detection of lead in environmental water and urine samples using enzyme mimics of catechin-synthesized Au nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2013; 5(4): 1503-1509.
48. Lin Y-W, Huang C-C, Chang H-T. Gold nanoparticle probes for the detection of mercury, lead and copper ions. *Analyst*. 2011; 136(5): 863-871.
49. Kim Y, Johnson RC, Hupp JT. Gold Nanoparticle-Based Sensing of Spectroscopically Silent Heavy Metal Ions. *Nano Letters*. 2001; 1(4): 165-167.
50. Chen Z, Wang Z, Chen J, Wang S, Huang X. Sensitive and selective detection of glutathione based on resonance light scattering using sensitive gold nanoparticles as colorimetric probes. *Analyst*. 2012; 137(13): 3132.

51. Yoosaf K, Itty Ipe B, Suresh CH, George Thomas K. In situ synthesis of metal nanoparticles and selective naked-eye detection of lead ions from aqueous media. *The Journal of Physical Chemistry C*.2007; 111(34): 12839-12847.
52. Annadhasan M, Muthukumarasamyvel T, Sankar Babu VR, Rajendiran N. Green Synthesized Silver and Gold Nanoparticles for Colorimetric Detection of Hg²⁺, Pb²⁺, and Mn²⁺ in Aqueous Medium. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2014; 2(4): 887-896.
53. Chen Y-Y, Chang H-T, Shiang Y-C, Hung Y-L, Chiang C-K, Huang C-C. Colorimetric assay for lead ions based on the leaching of gold nanoparticles. *Analytical Chemistry*. 2009; 81(22): 9433-9439.
54. Wei H, Li B, Li J, Dong S, Wang E. DNAzyme-based colorimetric sensing of lead (Pb²⁺) using unmodified gold nanoparticle probes. *Nanotechnology*. 2008; 19(9): 095501.
55. Ding N, Cao Q, Zhao H, et al. Colorimetric assay for determination of lead (II) based on its incorporation into gold nanoparticles during their synthesis. *Sensors*. 2010; 10(12): 11144-11155.
56. Liu J, Lu Y. A colorimetric lead biosensor using DNAzyme- directed assembly of gold nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*. 2003; 125(22): 6642-6643.
57. Wang Z, Lee JH, Lu Y. Label-free colorimetric detection of lead ions with a nanomolar detection limit and tunable dynamic range by using gold nanoparticles and DNAzyme. *Advanced Materials*. 2008; 20(17): 3263-3267.
58. Kim SK, Kim S, Hong EJ, Han MS. Alkyl phosphate functionalized gold nanoparticles-based colorimetric probe for Pb²⁺ ions. *Bulletin- Korean Chemical Society*. 2010; 31(12): 3806 - 3808.
59. Guo Y, Wang Z, Qu W, Shao H, Jiang X. Colorimetric detection of mercury, lead and copper ions simultaneously using protein-functionalized gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011; 26(10): 4064-4069.
60. Huang KW, Yu CJ, Tseng WL. Sensitivity enhancement in the colorimetric detection of lead (II) ion using gallic acid-capped gold nanoparticles: Improving size distribution and minimizing interparticle repulsion. *Biosensors and Bioelectronics*. 2010; 25(5): 984-989.
61. Instituto de salud Pública de Chile. Guía Técnica: Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición "Aspectos generales sobre la validación de métodos." *Instituto de salud pública Chile*. 2010: 37-47.
Consultada mayo 2017:
<[http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia Técnica 1 validación de Métodos y determinación de la incertidumbre de la medición_1.pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia_Técnica_1_validación_de_Métodos_y_determinación_de_la_incertidumbre_de_la_medición_1.pdf).>
62. Eurolab España Eurachem. *La Adecuación Al Uso de Los Métodos Analíticos Una Guía de Laboratorio Para Validación de Métodos y Temas*, primera edición española; 2016: 8-12; 19-36.
63. Standard International Organization. *ISO/IEC 17025 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. 2005*. 2005: 1-2; 14-20.
64. Fernandez G. Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, *Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización*. Última reforma publicada. 1994. 1-7.
65. Comité conjunto para las guías en metrología (JCGM). Vocabulario Internacional de Metrología - Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM). *International Organization for Standardization*. Tercera edición (VIM). Genova 2012: 104.
66. Pérez L, Gallegos L, Gabriel A. Verificación del método analítico de determinación de dióxido de azufre en fuentes fijas de combustión por fluorescencia pulsada. *Revista Digital de Medio Ambiente*. 2017: 75-87.

67. Minitab Inc. Meet Minitab 16. Ed. Minitab, Incorporated, 2010: 8-14; 26-30.
Consultada Febrero 2018:
<http://www.minitab.com/uploadedFiles/Documents/meet-minitab/ES-ES16_MeetMinitab.pdf>
68. Burns DT, Danzer K, Townshend A. Use of the terms "Recovery" and "Apparent Recovery" in Analytical Procedures. *Pure and Applied Chemistry*. 2002; 74(11): 2201-2205.
69. Puglisi C, Kornblit F. *Incertidumbre de medición en química analítica. Recta de calibración*. Departamento de Patrones Nacionales de Medida, Centro de Investigación y Desarrollo en Física, Instituto Nacional de Tecnología Industrial Buenos Aires- Argentina; Jornadas de desarrollo e innovación, Parque Tecnológico Miguelete; Instrumentación, control y metrología, precompetitivo, desarrollo tecnológico; 2000: 12,18.
70. Ellison SLR, Williams A. Cuantificación de la incertidumbre en medidas analíticas. *Eurachem/Citac*.; Primera edición española, Editorial. EURACHEM/CITAC: 2012: 2-8; 25-28.
Consulta noviembre 2017:
<http://www.citac.cc/QUAM2012_P1_ES.pdf>.
71. Committee for guides in metrology. Evaluation of measurement data - Guide to the expression of Uncertainty in Measurement. *Clinical Chemistry*.2004; 50(4): 977-978.
72. Ramírez A V, Cam Paucar J, Medina JM. Plomo sanguíneo en los habitantes de cuatro localidades peruanas. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 1997; 1(5): 344-348.
73. Jiménez C, Romieu I, Palazuelos E, et al. Factores de exposición ambiental y concentraciones de plomo en sangre en niños de la Ciudad de México. Instituto Nacional de Salud Pública. *Salud Pública de México*. Cuernavaca, México. 1993; 35(6); 599-606.
74. Lanphear BP, Hornung R, Khoury J, et al. Low-level environmental lead exposure and children's intellectual function: An international pooled analysis. *Environ Health Perspect*. 2005; 113(7): 894-899.
75. Instituto Nacional de la Calidad INACAL. *Directorio de organismos de acreditación. Directorio de Laboratorios de Ensayo Acreditados*.
Página web consultada mayo del 2017
<https://www.inacal.gob.pe/acreditacion/categoria/acreditados>>.
76. García JEB. *Investigación científica en el Perú: factor crítico de éxito para el desarrollo del país*. Máster en Gerencia y Administración Escuela de Negocios EOI de España 2014: 1-17.
77. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia INMETRO *Coordenação Geral de Acreditação. Orientação sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008*. Revisão 03. Brasil, 2010.
78. Davis PH, Morrissey CP, Tuley SM V, Bingham CI. Synthesis and stabilization of colloidal gold nanoparticle suspensions for SERS. *Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization* Chapter 2. *Americla Chemical Society Symposium Series*, Vol. 996. 2008; 996:16-30.
79. Khlebtsov NG. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from extinction spectra. *Analytical Chemistry*. 2008; 80(17): 6620-6625.
80. Gallo Mendoza L, Rosas D, Zamar S, Basán Nickisch M. Protocolo de muestreo, transporte y conservación de muestras de agua con fines múltiples (consumo humano, abrevado animal y riego). *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca*; 2011: 1-11.
Consultada febrero 2018
<https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-protocolo_de_muestreo_de_aguas_inta.pdf>
81. Wiley J. *Fundamentals of Probability and Statistics for Engineers*. Vol 29.; Ed. T. T.

- Soong; 2004: 370.
82. World Health Organization (WHO). Guidelines for drinking-water quality. *World Health Organization Chronical*. 2008; 38(3): 564.
83. Dirección General de Salud. Reglamento de la Calidad del Agua para Consumo Humano. *Dirección General de Salud Ambiental del Ministerio de Salud*. Lima – Perú DS N° 031-2010-SA. 2009.
Consultada febrero 2018
<http://www.digesa.minsa.gob.pe/publicaciones/descargas/reglamento_calidad_agua.pdf.>
84. Yenisoý-Karakaş S. Estimation of uncertainties of the method to determine the concentrations of Cd, Cu, Fe, Pb, Sn and Zn in tomato paste samples analysed by high resolution ICP-MS. *Food Chemical*. 2012; 132(3): 1555-1561.
85. Harris D. *Análisis Químico Cuantitativo*. Tercera edición. (Sexta original) Michelson Laboratory China Lake, California, Editorial Reverte; 2007. Apéndice G AP13

