

**TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO**  
**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE AGUASCALIENTES**



**TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO** (69)

**Ciencia y  
Tecnología**

Secretaría de Ciencia, Humanidades,  
Tecnología e Innovación



**Instituto Tecnológico**®  
de Aguascalientes

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL**

**TESIS**

**Determinación de la Afinidad Tintórea de  
Diferentes Microplásticos al Colorante Rojo  
Nilo**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL**

**Presenta:**

***Alejandra Melgar García***

**Directora de Tesis:**

**Dra. Ma. Rosario González Mota**

**Co-director de tesis:**

**Dr. Juan José Soto Bernal**

Aguascalientes, Ags. 19 de junio de 2025

*El hombre es una breve aventura química sin sentido.*

Manuel Vicent



Instituto Tecnológico de Aguascalientes  
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Aguascalientes, Ags., **25/junio/2025**  
Oficio No. DEPI 494/2025  
Asunto: Autorización impresión tesis

**C. ALEJANDRA MELGAR GARCÍA**  
**PRESENTE**

Los abajo firmantes, Miembros del Jurado para Examen de Grado de Maestría, hacemos **constar** que, habiendo revisado el Trabajo de Tesis desarrollado por Usted, bajo el título: **"Determinación de la Afinidad Tintórea de Diferentes Microplásticos al Colorante Rojo Nilo"**, hemos dictaminado que éste es de aceptarse, por lo que se autoriza su impresión.

**ATENTAMENTE**

*Excelencia en Educación Tecnológica®*  
*Ingenio, Cultura y Saber, que conducen a la Excelencia®*

**PRESIDENTE**

**DRA. MA. ROSARIO GONZÁLEZ MOTA**

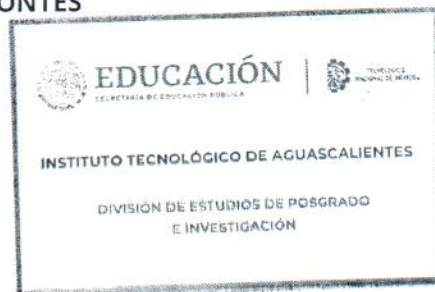
**SECRETARIO**

**DR. JUAN JOSÉ SOTO BERNAL**

**VOCAL**

**DR. J. ASCENCIÓN GUERRERO VIRAMONTES**

ccp. Archivo  
JFLH/yevo



**2025**  
Año de  
**La Mujer  
Indígena**

Av. Adolfo López Mateos #1801. Fracc. Bona Gens  
C.P. 20256 Aguascalientes, Ags. Tel. 449 910 5002 ext. 127  
e-mail: [jefatura.depi@aguascalientes.tecnm.mx](mailto:jefatura.depi@aguascalientes.tecnm.mx)  
[tecnm.mx](http://tecnm.mx) | [www.aguascalientes.tecnm.mx](http://www.aguascalientes.tecnm.mx)





**Instituto Tecnológico de Aguascalientes**  
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Aguascalientes, Ags., **25/junio/2025**  
Asunto: Oficio de originalidad

**CONSEJO DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL  
PRESENTE**

El director de tesis de la **Alejandra Melgar García**, estudiante de **Maestra en Ciencias en Ingeniería Ambiental** con número de control **G23153202**, hace constar que, después de haber realizado la revisión del informe de originalidad generado con la herramienta Turnitin, el trabajo **"Determinación de la Afinidad Tintórea de Diferentes Microplásticos al Colorante Rojo Nilo"** es original conforme a los criterios establecidos. El porcentaje de similitud es de **21 %** y se adjunta resumen del reporte.

**ATENTAMENTE**

*Excelencia en Educación Tecnológica®*  
*Ingenio, Cultura y Saber, que conducen a la Excelencia®*

**DRA. MA. ROSARIO GONZÁLEZ MOTA**  
**DIRECTOR DE TESIS**  
**PROFESORA**  
**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA**  
**Y BIOQUÍMICA**

**Vo.Bo.**

**DR. SERGIO FRAUSTO HERNÁNDEZ**  
**COORDINADOR**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA**  
**AMBIENTAL**

ccp. Archivo



**2025**  
Año de  
**La Mujer**  
**Indígena**

Av. Adolfo López Mateos #1801. Fracc. Bona Gens  
C.P. 20256 Aguascalientes, Ags. Tel. 449 910 5002 ext. 127  
e-mail: [jefatura.depi@aguascalientes.tecnm.mx](mailto:jefatura.depi@aguascalientes.tecnm.mx)  
[tecnm.mx](http://tecnm.mx) | [www.aguascalientes.tecnm.mx](http://www.aguascalientes.tecnm.mx)





**Instituto Tecnológico de Aguascalientes**  
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Aguascalientes, Ags., **17/junio/2025**  
Asunto: Autorización de uso de derechos

**ALEJANDRA MELGAR GARCÍA**, mayor de edad, con domicilio ubicado en **Cerro del Picacho No. 137, FOVISSSTE OJOCALIENTE II**, en mi calidad de titular y autor de la tesis denominada **"DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD TINTÓREA DE DIFERENTES MICROPLÁSTICOS AL COLORANTE ROJO NILO"** quien para todos los fines del presente documento se denominará **EL AUTOR Y/O TITULAR**, suscribo el presente documento de autorización de uso de derechos patrimoniales de autor a favor del Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Aguascalientes el cual se registrará por las cláusulas siguientes:

**PRIMERA – AUTORIZACIÓN:** **EL AUTOR Y/O TITULAR**, mediante el presente documento autoriza la utilización de los derechos patrimoniales de autor al Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Aguascalientes, de la tesis denominada **"DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD TINTÓREA DE DIFERENTES MICROPLÁSTICOS AL COLORANTE ROJO NILO"**, a través del Repositorio Institucional del Tecnológico Nacional de México (en lo sucesivo TecNM) y en el Repositorio Nacional, que puede ser consultado en la liga electrónica: ([www.repositorionacionalcti.mx/](http://www.repositorionacionalcti.mx/)).

**SEGUNDA – OBJETO:** Por medio del presente escrito, **EL AUTOR Y/O TITULAR** autoriza al Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Aguascalientes, a través del Repositorio Institucional del TecNM y en el Repositorio Nacional para que de conformidad con la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, use los derechos del documento antes referido, con fines exclusivamente académicos.

**TERCERA – TERRITORIO:** Los derechos aquí autorizados se dan sin limitación geográfica o territorial alguna.

**CUARTA – ALCANCE:** La presente autorización se da tanto para formato o soporte material, y se extiende a la utilización en medio óptico, magnético, electrónico, en red, mensajes de datos o similar conocido o por conocer, del ejemplar o número respectivo de la publicación.

**QUINTA – EXCLUSIVIDAD:** La autorización de uso aquí establecida no implica exclusividad en favor del Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Aguascalientes. Por lo tanto, **EL AUTOR Y/O TITULAR** en su carácter de autor de la obra objeto del presente documento se reserva el derecho de publicar directamente, u otorgar a cualquier tercero, autorizaciones de uso similares o en los mismos términos aquí acordados.



**2025**  
Año de  
La Mujer  
Indígena

Av. Adolfo López Mateos #1801. Fracc. Bona Gens  
C.P. 20256 Aguascalientes, Ags. Tel. 449 910 5002 ext. 127  
e-mail: [jefatura.depi@aguascalientes.tecnm.mx](mailto:jefatura.depi@aguascalientes.tecnm.mx)  
[tecnm.mx](http://tecnm.mx) | [www.aguascalientes.tecnm.mx](http://www.aguascalientes.tecnm.mx)





**Instituto Tecnológico de Aguascalientes**  
División de Estudios de Posgrado e Investigación

**SEXTA – DERECHOS MORALES (Créditos y mención):** La Autorización de los derechos antes mencionados no implica la cesión de los derechos morales sobre los mismos por cuanto en conformidad con lo establecido en los artículos 18, 19, 20, 21, 22 y 23 de la Ley Federal de Derechos de Autor, dada la cuenta que estos derechos son inalienables, imprescriptibles, irrenunciables e inembargables. Por lo tanto, los mencionados derechos seguirán radicados en cabeza de EL AUTOR Y/O TITULAR, y siempre deberá mencionarse su nombre cuando se utilice la obra.

**SÉPTIMA – AUTORÍA: EL AUTOR Y/O TITULAR,** declara y ratifica que el material objeto de la presente fue realizada por él o por ella sin violar o usurpar derechos de Propiedad Intelectual de terceros.

**ATENTAMENTE**

*Excelencia en Educación Tecnológica®*

*Ingenio, Cultura y Saber, que conducen a la Excelencia*

**Vo.Bo.**

**ALEJANDRA MELGAR GARCÍA**  
**AUTOR DE LA TESIS**

**DRA. MA. ROSARIO GONZÁLEZ MOTA**  
**DIRECTOR DE LA TESIS**

ccp. Archivo



**2025**  
Año de  
**La Mujer  
Indígena**

Av. Adolfo López Mateos #1801. Fracc. Bona Gens  
C.P. 20256 Aguascalientes, Ags. Tel. 449 910 5002 ext. 127  
e-mail: [jefatura.depi@aguascalientes.tecnm.mx](mailto:jefatura.depi@aguascalientes.tecnm.mx)  
[tecnm.mx](http://tecnm.mx) | [www.aguascalientes.tecnm.mx](http://www.aguascalientes.tecnm.mx)





## ***AGRADECIMIENTOS***

A lo largo de este camino académico, han sido muchas las adversidades que he tenido que superar. No hubiera sido posible el desarrollo de esta tesis sin la fuerza que me ha brindado Dios para seguir adelante y culminar el día de hoy con un logro más en mi vida.

Han sido muchas las personas que, con su apoyo, sabiduría y aliento, han contribuido al desarrollo y término de esta tesis. Por ello, deseo expresar mi más sincero reconocimiento a quienes acompañaron cada etapa de este proceso.

A mi familia, pilar fundamental de mi vida:

A mis padres, Guillermo Melgar Mendoza y Elba Leticia García Figueroa, por su amor incondicional, por los sacrificios silenciosos y por creer en mí incluso en los momentos de mayor incertidumbre y alguna que otra locura. A mi hermana, Consuelo Melgar García, por su complicidad y ánimo constante. A toda mi familia, mis tíos, tías, primos y primas, por ser mi red de apoyo y recordarme siempre de dónde vengo y lo que soy.

A mis maestros y asesores, faros de conocimiento:

A mi directora de tesis, la doctora Ma. Rosario González Mota, por su paciencia, tiempo, dedicación y valiosas críticas que enriquecieron este trabajo y mi formación académica. A mi codirector de tesis, el doctor Juan José Soto Bernal, por su paciencia, conocimiento y apoyo en la solución de problemas. Agradezco que, a lo largo de mi formación, sembraron en mí la curiosidad intelectual y el rigor científico. Su ejemplo ha dejado una huella imborrable en mi vocación.

A aquellos compañeros, maestros y doctores que fueron cómplices en este viaje, que de una forma u otra me aportaron conocimiento, sugerencias y/o críticas.

Al Instituto Tecnológico de Aguascalientes por darme esta oportunidad y a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca otorgada (CVU: 1315391) para la realización de mis estudios de maestría.

## RESUMEN

A nivel mundial, se ha visto un aumento en la fabricación y consumo de los materiales plásticos, tanto en los procesos de manufactura como en la vida diaria. Este incremento está generando cada vez más residuos presentes tanto en ecosistemas terrestres, marinos e incluso aéreos los cuales se van degradando o fragmentando en partículas muy pequeñas conocidas como microplásticos, lo que representa una grave problemática de contaminación ambiental y un reto científico para su detección.

Por esta razón, es necesario desarrollar un método estandarizado para facilitar la detección de estas partículas plásticas y, hasta la fecha, la técnica de tinción de microplásticos con colorantes del tipo lipofílico fluorescente ha contribuido con buenos resultados, siendo el colorante Rojo Nilo el que mejores resultados ha mostrado. Dentro de los conceptos importantes en esta técnica es la afinidad tintórea, pues si no existiera esta capacidad de absorción y unión entre el microplástico y el colorante no se podría lograr una tinción homogénea. No obstante, este tipo de colorantes poseen una característica principal, la fluorescencia. Este fenómeno facilita la visibilidad de los microplásticos, sin embargo, el hecho de ser de naturaleza lipofílica también se tiene la desventaja de teñir aquellas partículas en su composición contengan grasas, representando una dificultad y posible confusión al momento de querer detectar solo los microplásticos.

Aun cuando existen diferentes métodos para cuantificar la fluorescencia, en este proyecto se diseñó un sistema óptico para determinarla a través de los voltajes generados por la radiación transmitida a través de las muestras de plásticos teñidos a diferentes concentraciones de Rojo Nilo. Sin embargo, aunque el uso del colorante Rojo Nilo representa una opción viable para la mayoría de los polímeros, los resultados dependen de la afinidad tintórea de cada polímero.



## ÍNDICE

|                                                        |           |
|--------------------------------------------------------|-----------|
| <b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN .....</b>                  | <b>14</b> |
| 1.1 Planteamiento del problema .....                   | 14        |
| 1.2 Justificación.....                                 | 15        |
| 1.3 Objetivos .....                                    | 15        |
| 1.3.1 Objetivo general .....                           | 15        |
| 1.3.2 Objetivos específicos.....                       | 16        |
| <b>CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO .....</b>                 | <b>17</b> |
| 2.1 Microplásticos.....                                | 17        |
| 2.1.2 Contaminación por microplásticos .....           | 19        |
| 2.2 Colorantes .....                                   | 20        |
| 2.2.1 Clasificación de colorantes .....                | 21        |
| 2.2.2 Colorantes lipofílicos fluorescentes.....        | 21        |
| 2.3 Afinidad tintórea .....                            | 24        |
| 2.4 Fluorescencia .....                                | 24        |
| 2.4.1 Características.....                             | 27        |
| 2.4.3 Factores que afectan la fluorescencia .....      | 30        |
| <b>CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA.....</b>                    | <b>32</b> |
| 3.1 Preparación de muestras, MP.....                   | 32        |
| 3.2 Preparación de la solución stock de RN .....       | 32        |
| 3.3 Tinción de MP.....                                 | 33        |
| 3.4 Tratamiento de muestras después de la tinción..... | 34        |



|                                                |                                                                          |           |
|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.5                                            | Sistema Óptico (SO) para la medición de la fluorescencia de los MP. .... | 35        |
| <b>CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b> |                                                                          | <b>37</b> |
| 4.1                                            | Tinción de MP.....                                                       | 37        |
| 4.2                                            | Voltajes para cuantificar la fluorescencia .....                         | 39        |
| 4.3                                            | Modelado de voltajes de los polímeros teñidos .....                      | 41        |
| 4.3.1                                          | PLA.....                                                                 | 44        |
| 4.3.2                                          | PVC .....                                                                | 47        |
| 4.3.3                                          | Tygon™ B-44-4X.....                                                      | 51        |
| 4.3.4                                          | PET .....                                                                | 55        |
| 4.4                                            | Análisis con técnica espectroscópica Raman.....                          | 58        |
| <b>CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO .....</b>   |                                                                          | <b>63</b> |
| Conclusiones.....                              |                                                                          | 63        |
| Trabajo a futuro.....                          |                                                                          | 64        |
| <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>                       |                                                                          | <b>66</b> |

## INDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Estructura química del colorante Rosa de Bengala.....                                                                                                                                                                                              | 22 |
| Figura 2. Estructura química del colorante Safranina T.....                                                                                                                                                                                                  | 22 |
| Figura 3. Estructura química del colorante Rodamina B.....                                                                                                                                                                                                   | 23 |
| Figura 4. Estructura química del colorante Rojo Nilo.....                                                                                                                                                                                                    | 23 |
| Figura 5. Estados de excitación del electrón [22].....                                                                                                                                                                                                       | 25 |
| Figura 6. Diagrama de Jabłoński o diagrama de energía electrónica [22]. ....                                                                                                                                                                                 | 27 |
| Figura 7. Filtrado al vacío de la solución de colorante RN. ....                                                                                                                                                                                             | 33 |
| Figura 8. (a) Matrices Erlenmeyer con MP de soluciones de RN a diversas concentraciones; (b) Proceso de tinción de MP en baño ultrasónico.....                                                                                                               | 34 |
| Figura 9. Proceso de lavado de muestras teñidas mediante agitación magnética.....                                                                                                                                                                            | 34 |
| Figura 10 Diseño del Sistema Óptico en SolidWorks. Consta de a) Caja base, b) compartimento para fuente de radiación, c) montura para filtros, d) cabina para fotodiodo y portamuestras, e) tapa de caja base y f) portamuestras. ....                       | 35 |
| Figura 11. Sistema Óptico para realizar lecturas de fluorescencia para la determinación de afinidad tintórea de microplásticos. Consta de a) Láser azul, b) par de atenuadores para potencia de láser c) fotodiodo, d) tarjeta de adquisición de datos. .... | 36 |
| Figura 12 Muestras de PLA teñidas con colorante Rojo Nilo a diferentes concentraciones (0, 1, 2, 4, 6 y 8 ppm) observadas bajo (a) luz blanca y (b) radiación ultravioleta con filtro naranja. ....                                                          | 37 |
| Figura 13 Muestras de PVC teñidas con colorante Rojo Nilo a diferentes concentraciones (0, 1, 2, 4, 6 y 8 ppm) observadas bajo (a) luz blanca y (b) radiación ultravioleta con filtro naranja. ....                                                          | 38 |
| Figura 14 Muestras de Tygon™ B-44-4X teñidas con colorante Rojo Nilo a diferentes concentraciones (0, 1, 2, 4, 6 y 8 ppm) observadas bajo (a) luz ambiental y (b) radiación ultravioleta con filtro naranja. ....                                            | 38 |
| Figura 15 Muestras de PET teñidas con colorante Rojo Nilo a diferentes concentraciones (0, 1, 2, 4, 6 y 8 ppm) observadas bajo (a) luz ambiental y (b) radiación ultravioleta con filtro naranja. ....                                                       | 39 |

|                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 16. Comportamiento de los valores de voltajes del PLA obtenidos con el modelo polinómico cuadrático. ....           | 44 |
| Figura 17. Voltajes obtenidos con el modelo óptico del PLA, Ec. 11.....                                                    | 46 |
| Figura 18. Comportamiento de los valores de voltajes del PVC obtenidos con el modelo polinómico cuadrático. ....           | 48 |
| Figura 19. Voltajes obtenidos con el modelo óptico del PVC, Ec. 15. ....                                                   | 50 |
| Figura 20. Comportamiento de los valores de voltaje del Tygon™ B-44-4X obtenidos con el modelo polinómico cuadrático. .... | 52 |
| Figura 21. Voltajes obtenidos con el modelo óptico del Tygon™ B-44-4X, Ec.21.....                                          | 54 |
| Figura 22. Comportamiento de los valores de voltaje del PET obtenidos con el modelo polinómico cuadrático. ....            | 56 |
| Figura 23. Voltajes obtenidos con el modelo óptico del PET, Ec. 23 .....                                                   | 57 |
| Figura 25. Espectro Raman del polímero PLA teñido con RN a diferentes concentraciones. ..                                  | 59 |
| Figura 26. Espectro Raman del polímero PVC teñido con RN a diferentes concentraciones. ....                                | 60 |
| Figura 27. Espectro Raman del polímero Tygon™ B-44-4X teñido con RN a diferentes concentraciones .....                     | 61 |
| Figura 28. Espectro Raman del polímero PET teñido con RN a diferentes concentraciones. ..                                  | 62 |



## INDICE DE TABLAS

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Características físicas y químicas de polímeros sintéticos más comunes. .... | 19 |
| Tabla 2. Voltaje promedio para cada polímero teñido a distintas concentraciones. .... | 40 |
| Tabla 3. Variables de los Modelos Polinomial y Óptico Ajustado. ....                  | 43 |
| Tabla 4. Valores de los coeficientes del modelo óptico del PLA. ....                  | 47 |
| Tabla 5. Valores de los coeficientes del modelo óptico del PVC. ....                  | 51 |
| Tabla 6. Valores de los coeficientes del modelo óptico del Tygon™ B-44-4X. ....       | 55 |
| Tabla 7. Valores de los coeficientes del modelo óptico del PET. ....                  | 58 |

---

## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCIÓN

#### 1.1 Planteamiento del problema

Actualmente, el ser humano le ha dado una gran importancia al uso de plásticos, particularmente a los plásticos de un solo uso. En consecuencia, la gran cantidad de residuos plásticos generada no solo está afectando a los ecosistemas acuáticos y terrestres, sino también al propio ser humano, siendo el principal vehículo de ingesta la estructura de la cadena alimenticia [1].

Desde la década de los años 60 la producción mundial de plásticos ha crecido en un 9 % anual, reportándose en el Inventario Nacional de Fuentes de Contaminación Plástica (INFCP) de México que en el año 2023 se ha estimado un consumo de 66 kg por habitante [2]. No obstante, se estima que aproximadamente 8 millones de toneladas de dicha producción se vierten en los ecosistemas marinos. Debido a las diferentes dimensiones y densidades de las partículas plásticas, solo el 1 % del plástico en el mar se puede observar como materia flotante, generándose así una gran cantidad de sedimento marino [3].

Ahora bien, cuando estos residuos plásticos se encuentran en lugares donde actúan como contaminantes, con el tiempo comienzan a degradarse y fragmentarse como resultados de diversas interacciones, dando lugar a partículas denominadas como micro y nanoplásticos [4]. Un campo de interés para la comunidad científica son las partículas plásticas con un tamaño menor a 5 mm, denominados microplásticos (MP). Sin embargo, no existe una metodología estandarizada que permita su detección y cuantificación en un único procedimiento, atribuyendo dicha limitación a la diversidad de tipos y composiciones químicas de MP que existen, así como a las dificultades inherentes a su diminuto tamaño [5]. En este sentido, una de las técnicas comúnmente reportada para su detección es la tinción empleando colorantes lipofílicos, la cual se lleva a cabo dependiendo de la afinidad tintórea de cada MP con el colorante. La afinidad tintórea es definida como la capacidad que tiene un MP para unirse a algún colorante. Entre los

colorantes lipofílicos que se han utilizado destaca el Rojo Nilo (RN), ya que es el que mejores resultados ha proporcionado [6, 7].

### **1.2 Justificación**

El desarrollo de una metodología basada en el empleo de técnicas previamente reportadas, como lo es la técnica de tinción de MP, y empleando tecnologías de bajo costo y que no requieren de una capacitación extensa, permitirá la determinación de la afinidad tintórea de los MP con el colorante Rojo Nilo (RN). Además, ofrecerá una herramienta para complementar todos aquellos procedimientos que requieren como primer paso la identificación de MP para una posterior cuantificación o incluso su posible remoción para mitigar la contaminación causada por la presencia de estas partículas. De este modo, la propuesta representará un aporte significativo al campo de estudio enfocado en los MP y a la mejora de la gestión medioambiental.

Por otra parte, con la elaboración del presente proyecto se pretende contribuir en el ámbito social, específicamente en el área de la salud pública, ya que la detección de los MP en el medio ambiente evitará que las nuevas generaciones mantengan un contacto crítico con estas partículas. Por consiguiente, se podrán implementar metodologías eficaces para su remoción y/o control, por lo que se podrá prevenir o disminuir la ingesta de MP en los organismos. Como resultado, se favorecerá un mejor estado de salud y un entorno favorable para la realización de sus actividades.

La presente propuesta de tesis abarca como propósito determinar la afinidad tintórea de diversos tipos de MP, como el ácido poliláctico (PLA), Tygon™ B-44-4X (TY), producto modificado de cloruro de polivinilo, y tereftalato de polietileno (PET), con el colorante lipofílico fluorescente RN para su identificación visual. Aunado a enriquecer al preámbulo para el estudio de la afinidad tintórea de los MP con otros colorantes de la misma naturaleza que el RN para generar posibles alternativas de procedimientos de tinción para la detección de MP.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo general**

Determinar la afinidad tintórea de diferentes tipos de microplásticos presentes en distintos tipos de muestras empleando el colorante lipofílico fluorescente Rojo Nilo.

### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Definir el método de tinción de diferentes tipos de microplásticos con el colorante Rojo Nilo.
- Desarrollar un sistema óptico para medir el voltaje de fluorescencia de microplásticos teñidos.
- Detectar y cuantificar la fluorescencia de los microplásticos mediante un sistema óptico y un algoritmo desarrollado en conjunto con el programa *LabVIEW* para el procesamiento de datos.
- Procesar los datos y ajustarlos a modelos ópticos para observar su comportamiento.

---

## CAPÍTULO 2

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Microplásticos

Cuando se habla de materiales plásticos se habla de compuestos sintéticos, denominados polímeros, que cuentan con una gran variedad de formas, tamaños, texturas, colores, entre otras, las cuales varían según sea el fin al que estén destinados [1]. El uso de plásticos en el mundo se ha incrementado de manera exponencial en los últimos años y la problemática existente es evidente [1,8]. Concretamente, los plásticos más usados por la sociedad son los de un solo uso, llegando a estimarse que el 50 % de los productos plásticos que se fabrican actualmente están destinados a ello [1].

Con el primer plástico sintetizado químicamente, la baquelita, en 1907 por el químico belga Leo Hendrick Baekeland y el nailon, primer polímero plástico patentado por la empresa DuPont, en 1938 se da inicio a la producción global de productos plásticos, dando origen a “la era del plástico” [1, 5]. En aquella época se afirmaba que los plásticos serían desintegrados completamente por medio de procesos como la oxidación y fotodegradación, sin embargo, a inicios del año 1970 se reportan por primera vez desechos plásticos en la superficie de océano Atlántico y Pacífico, y pronto se probó que lo único que sucedía era que se fragmentaban en fracciones más pequeñas, llamadas más tarde nano y microplásticos [1, 5, 8].

Los MP son partículas pequeñas de polímeros sintéticos con un tamaño de entre 5 mm y 1  $\mu$ m, considerados como un contaminante emergente, que presenta una baja tasa de biodegradación, gran durabilidad y un potencial tóxico alto [5, 9].

##### 2.1.1 Clasificación de los microplásticos

Los MP se pueden clasificar de acuerdo a su origen:

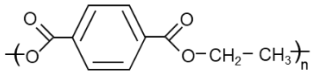
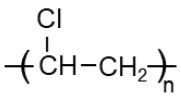
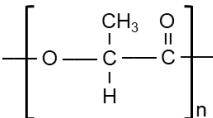
- a) Primarios. Son fabricados con un tamaño microscópico para aplicaciones específicas, ya sea con forma de microesferas para destinarse a productos de limpieza, pinturas, pasta de dientes, exfoliantes, cosméticos, o bien, como pellets para procesos de extrusión y

moldeado, entre otros, para posteriormente ser fundidos y adquirir la forma de cualquier objeto plástico que se desee. Aunado a lo anterior, los MP también se presentan en forma de filamentos para la impresión en 3D o como espumas, escamas o fragmentos, o fibras [1, 5, 10]. El uso de este tipo de MP radica en su bajo costo para la sustitución de ingredientes naturales y su gran versatilidad para diversos usos [5].

- b) Secundarios. Son generados a partir de la degradación selectiva y/o fragmentación de plásticos de un mayor tamaño por degradación mecánica, como el efecto sinérgico entre la acción de las olas y el viento o la abrasión de MP en sedimentos y arena, por fotodegradación, biodegradación, o termodegradación. De igual forma se incluyen a las fibras sintéticas provenientes de las aguas de lavado de textiles, las partículas provenientes del desgaste de neumáticos, las partículas generadas por el manejo de envases, entre otros [1, 5, 8, 10].

En la Tabla 1 se muestran las características físicas y químicas de los polímeros sintéticos más comunes y por ende de mayor uso.

Tabla 1. Características físicas y químicas de polímeros sintéticos más comunes.

| Polímero                   | Acrónimo | Formula                                                                             | Polaridad | Características físicas                                                                                                                                                                                                                                                         |
|----------------------------|----------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tereftalato de polietileno | PET      |    | No polar  | Es un polímero termoplástico, tiene alta resistencia al desgaste y la corrosión, buen coeficiente de deslizamiento presenta alta rigidez y dureza, y es totalmente reciclable [11-13].                                                                                          |
| Cloruro de Polivinilo      | PVC      |    | Polar     | Se trata de un polímero termoplástico, tiene resistencia a la corrosión por agua, soporta el desgaste y el impacto, es considerado como aislante eléctrico y tiene gran versatilidad pues con él se pueden fabricar objetos de gran rigidez así como objetos flexibles [14-16]. |
|                            |          | Tygon™ B-44-4X                                                                      | Polar     | De la familia de los vinilos, se trata de un material del PVC modificado, resistente a diversos productos químicos, flexible y no tóxico para su uso en el área alimenticia y farmacéutica [17, 18].                                                                            |
| Ácido poliláctico          | PLA      |  | Polar     | Polímero termoplástico de alta resistencia y alto módulo, incompatible con agentes oxidantes y bases fuertes. De naturaleza biodegradable, pues se puede fabricar a partir de recursos como la caña de azúcar o el almidón de maíz [19, 20].                                    |

### 2.1.2 Contaminación por microplásticos

La contaminación por MP comenzó en el ambiente marino, no obstante, en la actualidad se ha convertido en un problema de salud pública, pues se ha reportado su presencia en arena de playa, aire, aguas superficiales, suelo, sedimentos, sedimentos de aguas profundas e incluso en zonas

remotas como regiones polares y glaciares. La contaminación por MP ha llegado a tal grado que se ha afirmado que, sin importar el lugar y la fecha en que se toma una muestra siempre se encontrarán MP e incluso pellets de plásticos [5].

En el año 2021, se reportó que la producción mundial de plásticos fue de alrededor de 390.7 millones de toneladas, de las cuales alrededor de 125 millones fueron fabricadas en China. Esta producción consistió en 19.3 % de polipropileno, 14.4% de polietileno de baja densidad, 12.5% de alta densidad, 12.9% de PVC, 6.2% de PET, 5.5% de poliuretano y 5.3% de poliestireno [9]. Sin embargo, en años posteriores se han fabricado otro tipo de MP, dando como resultado que en muestras ambientales examinadas se encontraran, además de los plásticos anteriormente mencionados, la presencia de ácido poliacrílico, PLA, policarbonato/acrilonitrilo-butadieno-estireno, cloruro de polivinilidina, fenol formaldehído, melamina-formaldehído, nailon, policarbonato, poliéter éter cetona, polietilenimina, polimetacrilato de metilo, polioximetileno, politetrafluoroetileno y urea-formaldehído [5].

Por otro lado es importante mencionar que los MP no se encuentran *per se* en el ambiente, sino que pueden interactuar y sorber fácilmente sustancias tóxicas en su superficie como aditivos químicos, monómeros residuales y sustancias como retardadores de flama, biocidas, hidrocarburos poliaromáticos, entre otros, para luego liberarlos. Además, se consideran como un vector de transporte de contaminantes y patógenos, ya que también pueden generar un hábitat microbiano distinto pues actúan como sustrato para parásitos patógenos y microorganismos, e incluso tienen la capacidad de sorber metales pesados como  $Pb^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ . Estos mecanismos de afinidad se encuentran influenciados por diversos factores externos como el envejecimiento por radiación ultravioleta (UV) [5].

### 2.2 Colorantes

Un colorante es una sustancia de naturaleza orgánica o inorgánica que transfiera su color a otras sustancias o materiales, ya sea que se experimente o no con modificaciones en su estructura química, dando matices de intensidad variable [21]. La estructura química de los colorantes consta de dos grupos, el grupo cromóforo y el grupo auxócromo. El grupo cromóforo es la estructura responsable del tinte o tono principal y se clasifica en varios subgrupos como por ejemplo el grupo nitroso ( $N=O$ ), nitro ( $O-N=O$ ), tiocarbonilo ( $C=S$ ), carbonilo, ( $C=O$ ), azo

(N=N), azoxi (N=N-O), ciano (C≡N), imino (C=N) y etinilo (C≡C). Por otro lado, el grupo auxóchromo es la estructura responsable de la intensidad del color y presenta la capacidad de la sustentividad, es decir, la capacidad de un colorante para fijarse a un sustrato. Algunos ejemplos de los grupos auxóchromos son los grupos hidróxi (OH), alcoxi (OR), metilamino (NHMe) dimetilamino (NHMe<sub>2</sub>) o los halógenos cloro (Cl), bromo (Br) o yodo (I) [22].

Sin embargo, en ocasiones se requiere transferir el color a la superficie deseada y el color no puede ser cedido por sí solo, por lo tanto, se han desarrollado preparaciones que contienen al colorante y otras sustancias auxiliares que sirven para transferir el color conocidas como sustancias cromogénicas [22].

En el caso de la aplicación de color a los plásticos es importante considerar el tipo de solvente utilizado para preparar al colorante, ya que puede reaccionar de manera agresiva con el plástico causando su reblandecimiento o su degradación. Por lo que existen diferentes métodos para aplicar el color sobre el plástico, como por ejemplo los métodos electrostáticos o aerográficos [23].

### 2.2.1 Clasificación de colorantes

La clasificación principal de los colorantes radica en su naturaleza, existen los colorantes naturales, que pueden ser de origen animal como el carmín de la cochinilla de nopal, o de origen vegetal como la safranina o la hematoxilina. Por otro lado, se encuentran los colorantes sintéticos de origen mineral y derivados de compuestos orgánicos como las anilinas y cianinas [21]. Sin embargo, otra de las clasificaciones principales de los colorantes es con base a su estructura química y al método de aplicación [21, 22].

### 2.2.2 Colorantes lipofílicos fluorescentes

Los colorantes lipofílicos son compuestos químicos que presentan afinidad por las grasas y los lípidos, y son solubles en solventes orgánicos como el cloroformo, el éter y el benceno. Generalmente estos colorantes son empleados para teñir estructuras celulares y tejidos que contienen lípidos o para el marcaje retrógrado/anterógrado de las neuronas [24-26].

Por otro lado, cuando se habla de colorantes fluorescentes no se habla propiamente de un colorante, ya que este tipo de colorantes solo producen un efecto óptico, conocido como efecto de blanqueo, el cual consiste en que los colorantes absorben radiación ultravioleta y la reflejen

en la región visible (azul o azul-violeta), provocando que el objeto o la sustancia reflejen más luz que la luz incidente [22]. Algunos colorantes fluorescentes son:

- \* Rosa de Bengala (RB) fue patentada en 1882 y se utilizó para teñir textiles y alimentos, y posteriormente para la superficie ocular dañada con fines médicos. Más tarde, entre los años de 1920 y 1945 se convirtió en la tinción vital más usada para detectar lesiones en la superficie ocular [27]. La RB (Figura 2.1) es un tinte violáceo derivado de la fluoresceína dianiónico muy soluble en agua que pertenece a la clase de los colorantes xanteno, cuyo anillo halogenado presente en su estructura es el principal responsable de sus propiedades fotoquímicas [28]. Uno de los usos más frecuentes del colorante RB es como colorante vital diferencial para

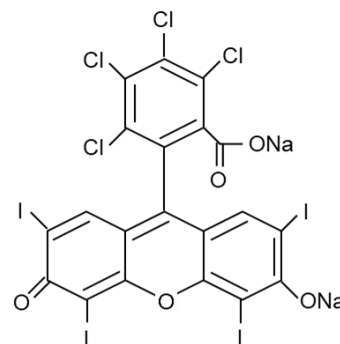


Figura 1. Estructura química del colorante Rosa de Bengala.

- espermatozoides, bacterias y cultivos bacterianos, además de usarse como fluorocromo para evidenciar grasas y tejidos adiposos o para la coloración contraste para las hematoxilinas y el azul de toluidina [21]. En el área de plásticos se ha empleado en el estudio de muestras ambientales de aguas contaminadas con MP para teñir la materia orgánica que acompañan a los MP para diferenciarlos y así realizar una cuantificación posterior [29].
- \* El colorante Safranina T, también conocido como T rojo tibetano o rojo azafrán O, es un tipo de tinte industrial alcalino de amina aromática de color marrón rojizo soluble en agua y fotosensible [30]. Este colorante se puede utilizar para la tinción de fibras sintéticas, acrílico, cuero, teñido de papel y telas de algodón, impresión de telas de seda, tinta y acuarela, además de ser un colorante contraste para micrografía, tinciones plasmáticas y colorantes vegetales de rutina, y cumplir la función como colorante de contraste [21, 31].

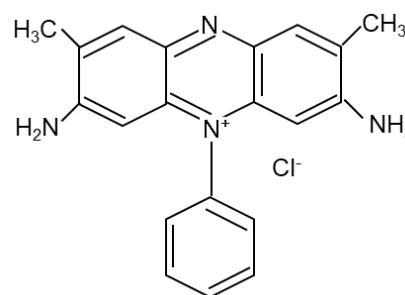


Figura 2. Estructura química del colorante Safranina T.

- \* La Rodamina B (RDB), también conocida como Rosa brillante o B Rodamina O, es un colorante fluorescente (Figura 2.3) que proporciona una fluorescencia amarillo verdoso, es poco soluble en acetona y muy soluble en cellsolve (2-etoxietanol). La RDB es usada para detectar bacterias resistentes al ácido y al alcohol, en particular micobacterias,

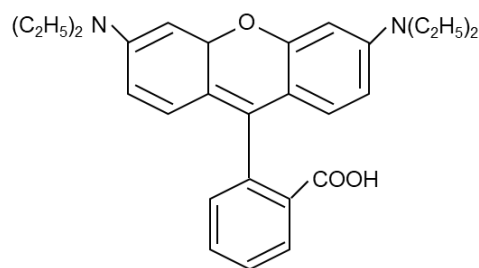


Figura 3. Estructura química del colorante Rodamina B.

además de ser usado también como biomarcador para animales y vegetales, así como colorante de seguimiento [21]. Por otro lado, también es usada en la coloración de polímeros y resinas durante la producción de productos plásticos como envases, juguetes y productos de consumo [32].

- \* El RN (Figura 2.4), es el colorante comúnmente utilizado de esta categoría, ya que se ha reportado que presenta una buena afinidad para una amplia gama de polímeros [7]. El nombre químico del RN es 9-etilamino-5H-benzo[ $\alpha$ ]fenoxazina5-ona y es un colorante fuertemente fluorescente que se

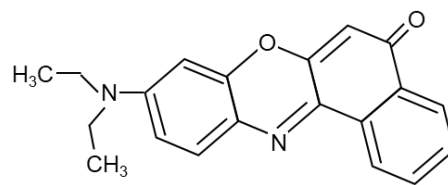


Figura 4. Estructura química del colorante Rojo Nilo.

sintetiza a partir del Azul Nilo, y está presente en pequeñas cantidades de preparaciones comerciales de la tinción lipídica azul del Nilo y en la forma de polvo rojo púrpura oscuro [33, 34]. Aunque es insoluble en agua, presenta solubilidad en una amplia gama de disolventes orgánicos como el xileno, el cloroformo o la acetona; así como también presenta una solubilidad preferencial en lípidos [34]. A su vez, es ampliamente fluorescente en dichas sustancias, ya que el RN presenta la característica de ser solvatocromático, es decir, su fluorescencia varía espectralmente según la polaridad del medio en el que se encuentre, pues se ha encontrado que, dependiendo de la hidrofobicidad relativa del disolvente los máximos de excitación y emisión de la fluorescencia del RN pueden variar en un rango de 60 nm [26, 34-36]. Algunos autores que han reportado que el RN emite fluorescencia en diferentes longitudes de onda, desde el amarillo dorado intenso hasta el rojo intenso, dependiendo de la fuente de excitación

[35]. Según diversos estudios, las longitudes de onda de excitación utilizadas para los MP teñidos con RN varían entre 254 y 580 nm, mientras que la longitud de onda de emisión se sitúa entre 430 y 630 nm [36, 37]. Debido a la naturaleza y a las características que presenta el RN se puede emplear para tinción de células, cuantificar MP en muestras de aguas marinas, sedimentos y muestras biológicas [38, 39].

### 2.3 Afinidad tintórea

Es la capacidad de los materiales poliméricos para absorber un colorante y formar un enlace químico permanente y que depende de la estructura de la molécula del colorante. Además es fuertemente influenciada por la concentración del colorante, por lo que se puede decir que cuanto mayor sea la Afinidad Tintórea (AT) del colorante hacia el material polimérico más difícil será que dicho material pierda su color [40, 41].

Una de las causas por las que se pueden observar diferencias de color en los materiales poliméricos es por el mecanismo de interacción colorante-material polimérico de manera superficial, como es el caso de los MP en donde se adsorbe en su superficie; sin embargo, el colorante también puede llegar a penetrar el material polimérico, como sucede en el caso de las fibras textiles y llegar a formar enlaces químicos [40, 42].

La AT puede ser medida con el factor de afinidad tintórea, parámetro que depende de la naturaleza del colorante, de la estructura y propiedades del material polimérico, y de las características del sistema de tinción (electrolitos, pH, temperatura, entre otros), que deben determinarse para cada caso particular. El factor de afinidad tintórea cambia con la presencia de agentes hidrotópicos, electrolitos, etc. en la solución tintórea por lo que, de manera general, cuanto mayor sea el factor de afinidad de un colorante mayor será su AT con diversos materiales poliméricos [40].

### 2.4 Fluorescencia

Los procesos fotoluminiscentes que se generan de la excitación electrónica mediante mecanismos físicos, mecánicos o químicos, se pueden subdividir en fosforescencia y fluorescencia [43].

La fluorescencia es un fenómeno en el que las moléculas en su estado fundamental absorben radiación electromagnética pasando a un estado de excitación electrónica y posteriormente se relajan regresando a su estado basal liberando el exceso de energía en forma de fotones, de manera que físicamente se observa que el sustrato refleja más luz que la radiación incidente [44].

A nivel molecular, el fenómeno de fluorescencia se experimenta cuando una molécula se encuentra en su estado fundamental  $S_0$  (Figura 5) y absorbe un fotón con suficiente energía para excitar a un electrón a un estado singlete de mayor energía,  $S_1$  o  $S_2$ ; si el electrón sigue una vía de relajación vibracional hacia su estado basal y durante ese proceso emite un fotón, se habla de fotoluminiscencia (Figura 6) [45]. La fluorescencia se desarrolla mediante transiciones electrónicas y da como resultado la emisión de un fotón con una longitud de onda más larga que la radiación incidente, este proceso se explica en el inciso *b* del diagrama de Jabloński (Figura 6).

El intercambio físico-químico de energía para generar la fluorescencia comienza cuando la luz de una longitud de onda particular incide en un fluoróforo de una molécula para absorber un cuanto específico de luz, que excita un electrón de valencia desde su estado fundamental  $S_0$ , incrementando su nivel energético y tardando un tiempo aproximado de  $10^{-15}$  seg. Posteriormente, existe una disipación parcial de energía, es decir, el electrón se relaja rápidamente a un subnivel excitado de menor energía posible, tardando aproximadamente  $10^{-12}$  seg. Finalmente, la energía absorbida se disipa en menos de  $10^{-6}$  seg como luz de menor energía y, por lo tanto, de mayor longitud de onda, provocando que el material polimérico tenga la apariencia de una fuente de radiación. Sin embargo, el color de la fluorescencia puede coincidir o no con el reflejo coloreado intrínseco del objeto [43, 45-47].

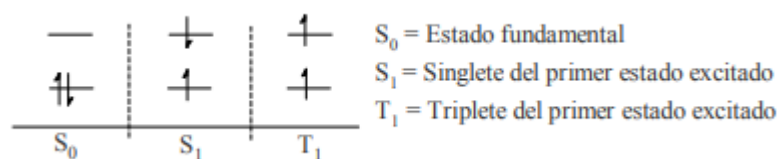


Figura 5. Estados de excitación del electrón [22].

La absorbancia que se presenta durante el fenómeno de la fluorescencia es un proceso por el cual una muestra absorbe radiación de manera selectiva, es decir, a una longitud de onda específica dentro del espectro visible. La intensidad de la absorbancia varía de acuerdo a la composición de la muestra y a la concentración de elementos presentes [48]. Asimismo, se puede calcular en función de la intensidad de la fuente de radiación incidente de acuerdo a la Ley de Lambert–Beer (Ec.1) [48, 49]. Esta ley describe la relación existente entre la radiación incidente  $I_0$  sobre la muestra-y la intensidad transmitida  $I$  por la muestra, en donde cuanto mayor sea el valor de la absorbancia  $A$  menor radiación será transmitida por la muestra [50]. La expresión matemática que representa esta Ley se observa de acuerdo a la Ec. 1.

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \frac{1}{T} \quad \text{Ec. 1}$$

La relación entre la fluorescencia y la Ley de Lambert–Beer radica en su contribución al cálculo de la radiación que es absorbida por el MP antes de que ocurra el fenómeno de la fluorescencia. Esta absorbancia depende de dos supuestos externos, siendo el primero que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración, en este proyecto, del colorante RN empleada. El segundo supuesto es que la absorbancia es directamente proporcional a la longitud del camino de haz de luz [51, 52].

Los compuestos que muestran propiedades fluorescentes cuentan, típicamente, con varios anillos aromáticos y/o con dobles enlaces conjugados, generalmente denominados como fluorocromo o fluoróforo, términos usados indistintamente [43, 45]. Dependiendo de los grupos radicales que contengan los fluoróforos se clasifican en dos tipos: los grupos donantes de electrones, como  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$  y  $-\text{OCH}_3$  que aumentan la fluorescencia, y los grupos aceptores de electrones, como  $\text{COOH}$  y  $-\text{N}=\text{N}-$  que reducen la fluorescencia. Sin embargo, existen algunas excepciones, como es el caso del triptófano y la tirosina, que han mostrado rendimientos cuánticos más bajos de lo esperado [45]. Cuando se experimenta el fenómeno de la fluorescencia, los fluoróforos pueden entrar en ciclos repetitivos de excitación y emisión siempre y cuando no se produzca una destrucción o modificación covalente que interrumpa este proceso de manera irreversible [43].

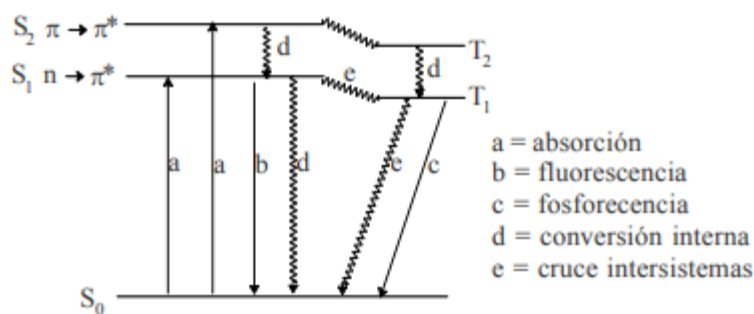


Figura 6. Diagrama de Jablonski o diagrama de energía electrónica [22].

La excitación de los electrones de valencia para la fluorescencia puede ser inducida por una lámpara, un diodo emisor de luz (LED) o una fuente láser. Cuando se utiliza un láser para la excitación, la fluorescencia se denomina fluorescencia inducida por láser (LIF) y cuando se utilizan lámparas convencionales como fuentes de luz la fluorescencia se denomina fluorescencia convencional. En el caso de las fuentes de luz multiespectrales, se utiliza un filtro espectral o un monocromador para seleccionar la longitud de onda de excitación [45]. En general, la elección del tipo de fuente de luz se realiza de acuerdo a la gama de longitudes de onda que se necesite en cada investigación y la aplicación depende de propiedades tales como la monocromaticidad, direccionalidad, y características espaciales y temporales de dicha fuente de luz [45].

### 2.4.1 Características

Algunas de las características y parámetros esenciales de la fluorescencia que se utilizan en la microscopía de fluorescencia son:

- Eficiencia cuántica ( $\eta$ ): es la relación entre el número de fotones emitidos a una longitud de onda mayor durante la excitación y el número de moléculas excitadas, por lo que cuanto mayor sea el rendimiento cuántico, mayor será la fluorescencia [45]. El rendimiento cuántico es sensible a los factores ambientales, como la polarización del disolvente, el pH, la concentración de fluorocromo y la presencia de moléculas que afectan al estado excitado, como el oxígeno molecular [43].
- Tiempo de vida de la fluorescencia ( $\tau$ ): es el tiempo promedio transcurrido en el que el electrón pasa en el estado excitado antes de volver a su estado fundamental. La intensidad de la fluorescencia decae con el tiempo después de una excitación

infinitesimalmente corta, ya que el fluorocromo durante su tiempo de vida de fluorescencia puede sufrir cambios conformacionales, difundirse o interactuar con las moléculas circundantes [43, 45].

- Anisotropía: hace referencia a la cualidad de tener diferentes propiedades a lo largo de diferentes ejes, es decir, en un grupo de fluorocromos orientados aleatoriamente solo se excitarán aquellos fluorocromos con momentos dipolares de transición que están alineados casi de manera paralela a la dirección de polarización del haz de excitación. De manera teórica, la anisotropía máxima se alcanza cuando el momento dipolar de transición de emisión es exactamente paralelo al dipolo de transición de absorción [43].
- Enfriamiento por fluorescencia: es un fenómeno por el cual la interacción entre una molécula conocida como extinguidor con el fluorocromo reduce el rendimiento cuántico o la vida útil. Uno de los extinguidores más frecuentes es el oxígeno molecular, que extingue casi todos los fluoróforos conocidos, sin embargo, existen otros extinguidores, tales como la acrilamida, las aminas y los halógenos. Por otro lado, existen compuestos, como los compuestos heterocíclicos, que no emiten fluorescencia significativa a menos que estén unidos a un anillo aromático [45]. Los fenómenos de enfriamiento se pueden subdividir en: enfriamiento dinámico, enfriamiento estático [43]. El enfriamiento estático ocurre cuando se forma un complejo no fluorescente entre el fluoróforo y el extinguidor. El enfriamiento dinámico, también llamado enfriamiento por colisión, ocurre cuando el enfriador interfiere con el fluoróforo durante la vida útil del estado excitado, por lo que la molécula excitada se desactiva por entrar en contacto con otras moléculas o por interacciones intermoleculares (colisiones) [45].
- Intermitencia de fluorescencia: este fenómeno se produce cuando el fluorocromo alterna aleatoriamente entre un estado fluorescente y oscuro, a pesar de que la iluminación de excitación es continua. Como resultado, al realizar el seguimiento de fluorocromos individuales, un efecto estroboscópico puede interferir con el procedimiento de seguimiento [43].
- Fotoblanqueo: también conocido como desvanecimiento, es un proceso fotoquímico en el que la capacidad del fluorocromo para entrar en ciclos repetitivos de excitación/emisión se ve interrumpida permanentemente por destrucción o modificación

covalente irreversible del fluorocromo por reacción con las moléculas circundantes. Estos procesos fotodestructivos y fotoquímicos ocurren predominantemente cuando el fluorocromo se encuentra en el estado excitado de triplete oscuro, que es más duradero que los estados singlete, y exhibe un alto grado de reactividad química [43].

- Transferencia de energía de resonancia: es aquel proceso fotofísico en el que la energía en estado excitado de un fluorocromo donante se transfiere a través de un mecanismo no radiativo a un cromóforo aceptor de estado fundamental a través de un acoplamiento dipolo-dipolo débil de largo alcance [43].

### 2.4.2 Equipo de medición

Una característica importante del fenómeno de la fluorescencia es que la luz emitida por la muestra es proporcional a la concentración del fluoróforo que se tiene en la solución, por lo que se pueden realizar ensayos cuantitativos de alta sensibilidad y selectividad [53].

En este sentido, existen dos instrumentos generales para medir la fluorescencia, los cuales son los espectrofluorómetros y los fluorómetros.

- Espectrofluorómetro: posee cuatro componentes principales, una fuente de radiación que puede ser una lámpara de Xenón o un láser; un monocromador de excitación que se encarga de seleccionar la longitud de onda adecuada para la excitación de la muestra; un monocromador de emisión que analiza las emisiones producidas por la fluorescencia emitida por la muestra y un fotodetector que recibe las ondas lumínicas y las transforma en una unidad medible proporcional a la intensidad de la luz que recibió.
- Fluorómetro: instrumento que utiliza filtros ópticos para aislar la luz incidente y la luz fluorescente, y mide la capacidad de la muestra para absorber luz a una longitud de onda y emitir luz a una longitud de onda más larga. En estos equipos, una fuente de radiación luminosa emite luz de una longitud de onda de excitación para el compuesto que va a ser medido o analizado. La excitación del compuesto a analizar se produce mediante la utilización de los filtros ópticos, estos funcionan bloqueando otras longitudes de onda y transmite la longitud de onda apropiada para producir excitación del compuesto. La luz generada por la fuente de radiación pasa a través de la muestra a medir, y una cierta

cantidad de longitud de onda es absorbida para ser emitida a una longitud de onda mayor. Esta luz que se emite es medida mediante un detector [54].

### 2.4.3 Factores que afectan la fluorescencia

Los factores que afectan a la fluorescencia son:

- ✖ Rigidez molecular. En las estructuras moleculares rígidas se ha observado que la fluorescencia aumenta, ya que la transición de una molécula no plana a otra similar pero más plana y rígida va acompañada de un aumento del rendimiento cuántico de fluorescencia. Caso contrario ocurre con las estructuras flexibles, ya que estas producirán menos fluorescencia. Se ha observado que espectros de absorción y fluorescencia de moléculas no planares presentan una menor estructuración en comparación con los obtenidos de las moléculas rígidas del grupo de alta simetría, ya que en estos últimos se observan bandas vibracionales bien definidas [55, 56].
- ✖ Disolventes. La fluorescencia de un compuesto puede verse afectada por el disolvente utilizado para la solución del fluoróforo. El efecto disolvente puede observarse como un cambio de la intensidad de la línea o banda espectral y como un cambio de la forma y anchura de la banda. Al aumentar la polaridad del disolvente, generalmente se observan cambios del espectro de emisión a longitudes de onda más largas (desplazamientos al rojo) [45].
- ✖ pH. La estructura de una molécula puede verse alterada por el pH, ya que un compuesto puede convertirse y tomar una forma esférica o lineal en diferentes valores de pH, siendo la ionización de una molécula después de la modificación del pH lo que puede alterar el orbital molecular de los electrones excitables [45].
- ✖ Temperatura. Al aumentar la temperatura se favorece la existencia de colisiones moleculares, provocando que los electrones regresen al estado fundamental mediante transiciones no radiativas, es decir, transiciones sin emitir fotones, dando como resultado una disminución en el rendimiento cuántico [45, 57]. Por ejemplo, se ha encontrado que al disminuir la temperatura de 45 °C a 10 °C la cantidad de materia orgánica disuelta en muestras de agua se ha incrementado en un 48%, lo que ocasiona que sea difícil observar la fluorescencia [45].

- ✖ Fuerza iónica. Afecta a la fluorescencia al cambiar la conformidad y por transferencia de carga [45].

---

## CAPÍTULO 3

### METODOLOGÍA

#### 3.1 Preparación de muestras, MP

Con el objetivo de tener en condiciones óptimas las muestras, se tomaron fracciones de plásticos de objetos de uso común con dimensiones aproximadas de entre 9–10 mm [37]. Una vez cortados, se sometieron a un lavado sencillo con agua y jabón, teniendo en cuenta que el enjuague fue tal que no queden restos de jabón en las muestras. Posteriormente se realizó un segundo proceso de enjuague con agua desionizada [10].

Para evitar cualquier residuo restante de grasa en los MP, se colocaron en una solución de etanol al 50 %, cuyo volumen fue proporcional a la cantidad de MP asegurándose de que éstos queden situados por debajo del menisco de la solución, aproximadamente 20 ml. Enseguida se mantuvieron en agitación magnética constante durante 10 minutos a temperatura ambiente [58]. Se dejaron en reposo durante 5 minutos y posteriormente se retiraron de la solución, teniendo un último enjuague rápido con solución de metanol previo al proceso de tinción.

*Nota: Las muestras de MP empleadas no fueron sometidas a ningún pretratamiento especial, ya que no proceden de muestras ambientales y por lo tanto no contienen materia orgánica que pueda obstruir el proceso de análisis de fluorescencia. Sin embargo, para obtener mejores resultados se realizó un lavado de las muestras con solución de etanol al 50 %.*

#### 3.2 Preparación de la solución stock de RN

Para preparar una solución de RN de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  se pesaron 0.0010 g de colorante por cada 100 ml de solución. Enseguida, aproximadamente de 1 a 2 ml de metanol fueron vertidos en el matraz aforado a emplear y posteriormente se adicionó el colorante previamente pesado. A continuación, se procedió al aforo con metanol y se colocó dentro del matraz una cápsula magnética para realizar agitación magnética durante 5 minutos. De manera inmediata, se llevó a filtración al vacío, Figura 7, empleando un filtro Whatman GF/F de 70 mm de diámetro y de

0.7  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, resaltando que únicamente se realizó una filtración. A continuación, se sometió a un segundo proceso de agitación magnética durante 30 minutos para asegurar una homogeneidad completa [59] Una vez terminada la agitación de la solución de RN, se almacenó en completa oscuridad a una temperatura de 4°C, condiciones que se mantuvieron mientras no fue utilizada la solución [60], [61].

*Nota: Durante el proceso de preparación la solución stock de RN se resguardó de la luz en todo momento.*



Figura 7. Filtrado al vacío de la solución de colorante RN.

*Nota: antes de emplear la solución para el proceso de tinción se agitó durante 30 minutos.*

### 3.3 Tinción de MP

En diferentes matraces aforados cubiertos con papel aluminio se prepararon diversas disoluciones, de concentraciones de 1, 2, 4, 6 y 8  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de colorante RN a partir de la solución stock (ver Figura 8 (a)). Posteriormente, para cada proceso de tinción, se colocó la mitad del total de los MP seleccionados para la experimentación en dos matraces Erlenmeyer de 25 ml sin cubrir, y se vació la disolución preparada. A continuación, se procedió a tapar la boca de los matraces Erlenmeyer con un tapón de tela manta y se sometieron a agitación ultrasónica, por medio de un baño de ultrasonido digital Soner 203 marca ROCKER®, a 60 °C y durante 50 minutos (ver Figura 8 (b)). Cabe mencionar que el baño ultrasónico se mantuvo tapado durante todo el proceso de tinción. Tras terminar el proceso de agitación, se retiraron los matraces del interior del baño, se secaron y se cubrieron con papel aluminio para evitar el contacto directo

de la luz con los MP teñidos. Enseguida, se dejaron en reposo a temperatura ambiente bajo completa oscuridad durante 24 horas [37], [61], [62].



Figura 8. (a) Matrazes Erlenmeyer con MP de soluciones de RN a diversas concentraciones; (b) Proceso de tinción de MP en baño ultrasónico.

#### 3.4 Tratamiento de muestras después de la tinción

En un par de matraz Erlenmeyer de 25 ml limpios y secos se añadieron los MP teñidos, 20 ml de agua grado HPLC y una pequeña cápsula imán. Posteriormente, se realizó una agitación magnética durante 5 minutos, comenzando así el primer lavado (ver Figura 9). A continuación, se eliminó el filtrado obtenido en el matraz y enseguida se resuspendieron los MP, repitiendo el procedimiento dos veces más para completar un total de 3 lavados.

A continuación, los MP lavados se colocaron en diferentes cajas Petri cubiertas por papel aluminio, limpias y secas, y se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas [10].



Figura 9. Proceso de lavado de muestras teñidas mediante agitación magnética.

#### 3.5 Sistema Óptico (SO) para la medición de la fluorescencia de los MP.

Para llevar a cabo los respectivos análisis para la determinación de la afinidad tintórea se diseñó un SO adecuado a las necesidades para la medición de la fluorescencia de los MP mediante el software SolidWorks 2022. Posteriormente, se imprimió en una impresora 3D ENDER con material ácido poliláctico, PLA. Este SO está constituido principalmente por una caja base que garantizó la alineación de todo el sistema y evitó interferencias de luz ambiental al proceso de medición. Esta base, mostrada en la Figura 10, contiene un compartimento para colocar la fuente de radiación, un conjunto de monturas para colocar diversos filtros para el sistema, una cabina especial para colocar un portamuestra y un detector, un fotodiodo, para detectar los voltajes para determinar la fluorescencia, y en la parte posterior se cuenta con una abertura para conectar el fotodiodo a una tarjeta de adquisición de datos que está conectada a una computadora, para para el procesamiento de datos en el programa *LabVIEW*.

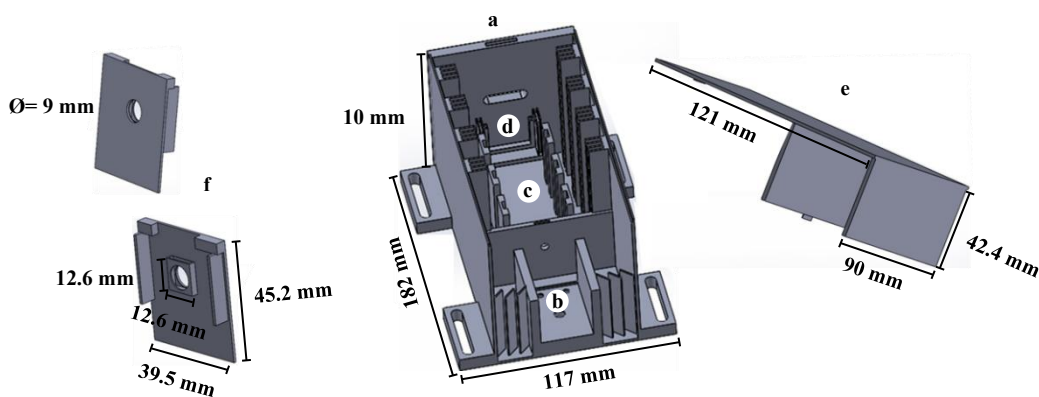


Figura 10 Diseño del Sistema Óptico en SolidWorks. Consta de a) Caja base, b) compartimento para fuente de radiación, c) montura para filtros, d) cabina para fotodiodo y portamuestras, e) tapa de caja base y f) portamuestras.

La fuente de radiación es un láser azul con una longitud de onda de 445 nm, una potencia de 2.5 W de enfoque ajustable de 100 a 240 V. Sin embargo, debido a la alta potencia que presentó el láser fue necesario el uso de un par de atenuadores, para modular la potencia y evitar daños visibles en la muestra y en el SO, tal como se aprecia en la Figura 11. El detector es un fotodiodo monolítico y amplificador de transimpedancia de alimentación única modelo OPT 101. Este fotodiodo, fabricado por *Texas Instruments*, está diseñado para eliminar errores por corriente de

fuga, captación de ruido y picos de ganancia debido a la capacitancia parásita [63]. El fotodiodo se colocó alienado al MP ya que una cierta cantidad de la radiación láser es absorbida por el MP y lo restante es transmitida a través de este para luego incidir en el fotodiodo. La radiación transmitida medida en volts (V) permitirá determinar la afinidad tintórea del MP hacia el colorante. Aunado a esto, también se diseñó e imprimió una tapa para cubrir la caja base del SO y evitar cualquier interferencia de luz ambiental mientras se realizan las mediciones.



Figura 11. Sistema Óptico para realizar lecturas de fluorescencia para la determinación de afinidad tintórea de microplásticos. Consta de a) Láser azul, b) par de atenuadores para potencia de láser c) fotodiodo, d) tarjeta de adquisición de datos.

---

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Tinción de MP

A continuación, se muestran fotografías de los MP teñidos con RN observados con luz blanca y radiación UV con un filtro naranja para observar la fluorescencia de cada uno. En cada una de las fotografías se puede observar una serie de MP, los cuales están organizados de acuerdo a la concentración de colorante con el que fueron teñidos, iniciando con 0 ppm, 2, 4, 6 y 8 ppm de izquierda a derecha respectivamente.

En la Figura 12 se muestran diferentes muestras de PLA teñidas a diferentes concentraciones de RN, en donde la muestra teñida a 4 ppm presentó una tinción más homogénea que la observada en las otras muestras. Por lo tanto, esta muestra presentó una fluorescencia mayor que el resto de las muestras.



Figura 12 Muestras de PLA teñidas con colorante Rojo Nilo a diferentes concentraciones (0, 1, 2, 4, 6 y 8 ppm) observadas bajo (a) luz blanca y (b) radiación ultravioleta con filtro naranja.

Para el PVC, la muestra teñida a 2 ppm presentó una tinción más homogénea en comparación con las otras muestras teñidas con RN, tal como se observa en la Figura 13. Por lo tanto, esta muestra presentó una fluorescencia mayor que el resto de las muestras teñidas

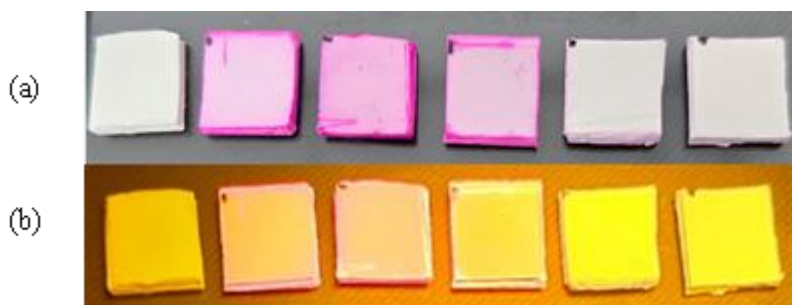


Figura 13 Muestras de PVC teñidas con colorante Rojo Nilo a diferentes concentraciones (0, 1, 2, 4, 6 y 8 ppm) observadas bajo (a) luz blanca y (b) radiación ultravioleta con filtro naranja.

En la Figura 14 se muestran las diferentes muestras de Tygon™ B-44-4X teñidas a diferentes concentraciones de RN, en donde la muestra teñida a 4 ppm presentó una tinción más homogénea que la observada en las otras muestras. Por lo tanto, esta muestra presentó una fluorescencia mayor que el resto de las muestras, pues se aprecia una iluminación de distinto color que la que se alcanza a observar en las otras muestras.

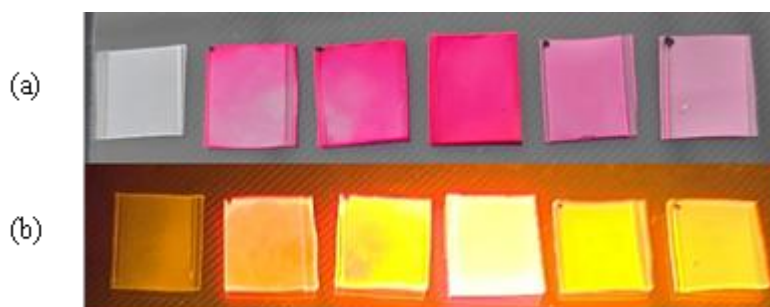


Figura 14 Muestras de Tygon™ B-44-4X teñidas con colorante Rojo Nilo a diferentes concentraciones (0, 1, 2, 4, 6 y 8 ppm) observadas bajo (a) luz ambiental y (b) radiación ultravioleta con filtro naranja.

Para el PET se muestra en la Figura 15 diferentes muestras teñidas a diferentes concentraciones de RN. Aunque el colorante no se aprecia de manera intensa si se alcanza a percibir en las muestras, en donde la muestra teñida a 2 ppm presentó una tinción más acentuada y visible que las otras muestras. Por lo tanto, esta muestra presentó una fluorescencia mayor que el resto de las muestras.

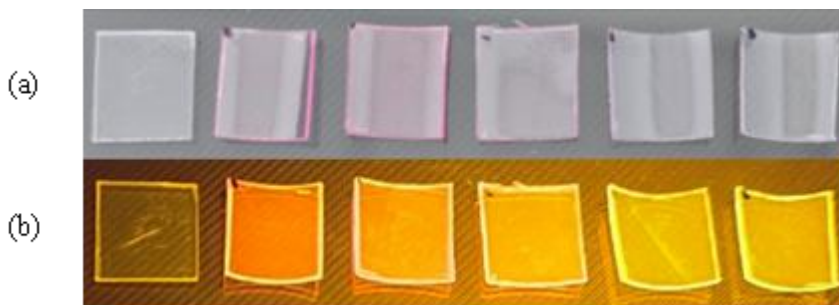


Figura 15 Muestras de PET teñidas con colorante Rojo Nilo a diferentes concentraciones (0, 1, 2, 4, 6 y 8 ppm) observadas bajo (a) luz ambiental y (b) radiación ultravioleta con filtro naranja.

#### 4.2 Voltajes para cuantificar la fluorescencia

Los voltajes promedio del láser azul,  $V_A$ , muestran valores distintos a los voltajes de los plásticos teñidos a diferentes concentraciones de RN,  $V_0$ , y a los voltajes de las muestras sin teñir,  $V_L$ , ver Tabla 2. El voltaje  $V_0$  tiende a incrementarse con la concentración de colorante RN, aunque de forma mínima y sin seguir un patrón gradual, debido a la naturaleza del colorante, ya que el RN es un colorante fluorescente en entornos no polares, como los plásticos, y su emisión depende de la longitud de onda de excitación por su característica solvatocromática [33-34, 36-37]. La longitud de onda utilizada, 445 nm, se encuentra dentro del límite de las longitudes de onda de excitación del RN, ya que dependiendo de la longitud de onda de excitación emite fluorescencia en diferentes longitudes de onda [35]. Cabe resaltar que la fluorescencia del RN no presenta la misma intensidad en todos los polímeros, ya que los valores de los voltajes varían de forma mínima y diferente en cada muestra, lo que indica que la eficiencia cuántica del RN depende del entorno químico del polímero. Es importante mencionar el caso del PVC, donde  $V_0$  y  $V_L$  presentaron un decremento con respecto a  $V_A$ , comportamiento inverso al presentado en los voltajes de los otros polímeros analizados. Este decremento en el voltaje se debe a una mayor absorción de la radiación, la cual podría ser atribuida a interacciones de la luz incidente con la estructura molecular del PVC y/o a los aditivos, además que el espesor de la muestra, 0.2 cm, fue mayor a la del resto de las otras muestras analizadas, espesor que rondaba entre los 0.01 y 0.1 cm.

Tabla 2. Voltaje promedio para cada polímero teñido a distintas concentraciones.

| <b>PLA</b> <span style="float: right;">Espesor: 0.11 cm</span>            |          |          |          |          |          |
|---------------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Concentración RN                                                          | 0 ppm    | 2 ppm    | 4 ppm    | 6 ppm    | 8 ppm    |
| $V_A$                                                                     | 4.248364 | 4.248364 | 4.251995 | 4.244133 | 4.245178 |
| $V_L$                                                                     | 4.254033 | 4.254033 | 4.279238 | 4.279165 | 4.281470 |
| $V_0$                                                                     | 4.254033 | 4.280450 | 4.279370 | 4.278850 | 4.280534 |
| <b>PVC</b> <span style="float: right;">Espesor: 0.2 cm</span>             |          |          |          |          |          |
| Concentración RN                                                          | 0 ppm    | 2 ppm    | 4 ppm    | 6 ppm    | 8 ppm    |
| $V_A$                                                                     | 4.251262 | 4.251262 | 4.253611 | 4.246580 | 4.248338 |
| $V_L$                                                                     | 0.771770 | 0.771770 | 0.498470 | 0.920521 | 0.999578 |
| $V_0$                                                                     | 0.771770 | 0.643653 | 0.412853 | 0.582226 | 0.735153 |
| <b>Tygon™ B-44-4X</b> <span style="float: right;">Espesor: 0.03 cm</span> |          |          |          |          |          |
| Concentración RN                                                          | 0 ppm    | 2 ppm    | 4 ppm    | 6 ppm    | 8 ppm    |
| $V_A$                                                                     | 4.248103 | 4.248103 | 4.252245 | 4.256049 | 4.256450 |
| $V_L$                                                                     | 4.259276 | 4.259276 | 4.268392 | 4.274597 | 4.269722 |
| $V_0$                                                                     | 4.259276 | 4.260868 | 4.272081 | 4.277090 | 4.272517 |
| <b>PET</b> <span style="float: right;">Espesor: 0.03 cm</span>            |          |          |          |          |          |
| Concentración RN                                                          | 0 ppm    | 2 ppm    | 4 ppm    | 6 ppm    | 8 ppm    |
| $V_A$                                                                     | 4.246239 | 4.246239 | 4.243012 | 4.245751 | 4.245293 |
| $V_L$                                                                     | 4.257342 | 4.257342 | 4.258078 | 4.256912 | 4.251037 |
| $V_0$                                                                     | 4.257342 | 4.259145 | 4.258025 | 4.256705 | 4.252209 |

El aumento en  $V_0$  en comparación a  $V_A$ , en los polímeros PLA, PET y Tygon™ B-44-4X puede atribuirse a diversos fenómenos ópticos por el tipo de muestras:

- ◆ *Reflexión interna y redirección de la luz.* Los plásticos, incluso sin teñir, pueden tener propiedades de reflexión interna y dispersión. Al colocar una muestra en el SO es posible que una fracción de la luz láser sea reflejada hacia el sensor, resultando en un ligero incremento en la señal de voltaje reportado en la Tabla 2 [50, 64].
- ◆ *Refracción en el material.* Los polímeros seleccionados podrían estar actuando como una lente débil, enfocando y concentrando la luz en el área del sensor aumentando el  $V_0$ . Sin embargo, estos cambios serían distintos entre cada polímero debido a sus diferentes índices de refracción, aumentando o disminuyendo los  $V_0$  [65-67].
- ◆ *Distribución de la luz debido a la interferencia.* Las superficies delgadas de las muestras pueden originar fenómenos de interferencia o modificar el patrón de propagación de la

luz, lo que podría resultar en una ligera variación en la cantidad de luz que incide directamente sobre el sensor [64].

- ◆ *Contaminación o textura en la superficie del plástico.* Incluso en muestras sin teñir, cualquier irregularidad superficial, pequeños contaminantes o diferencias en la textura del plástico podrían afectar el comportamiento de la luz, aunque sea de forma mínima. Además, se tuvo presencia de superficies rugosas o pequeñas estrías en cada muestra, los cuales pueden dispersar luz fuera del ángulo de detección del sensor.

#### 4.3 Modelado de voltajes de los polímeros teñidos

Los valores de la Tabla 2 indican que la variación del  $V_0$  de cada polímero no es lineal, por lo tanto, para describir su comportamiento se optó por proponer un modelo polinomial de orden 2, Ec.2, ya que este tipo de modelo permite realizar una interpretación física del comportamiento de los datos y por ende de la AT.

$$V_{prom} = P_0 + P_1 \cdot C + P_2 \cdot C^2 \quad \text{Ec. 2}$$

Los valores de las variables  $P_0$ ,  $P_1$  y  $P_2$  se describen en la sección 4.3, así como las representaciones gráficas a las que se hacen alusión.

Para realizar una interpretación física de los resultados y por ende explicar físicamente el fenómeno de la Afinidad Tintórea (AT) de los diversos polímeros y el colorante RN, se consideraron diversos parámetros ópticos como la luz transmitida ( $T$ ), la luz perdida por dispersión ( $S$ ), la luz absorbida ( $A$ ), y la fluorescencia generada ( $F$ ) basada en la eficiencia cuántica ( $\eta_f$ ) del RN. El modelo óptico físico propuesto es el siguiente:

$$V_{opt}(C) = V_0 \cdot T(C) + V_f(C) - V_p(C) \quad \text{Ec. 3}$$

Donde:

$V_{opt}(C)$  es el voltaje a una concentración dada,

$T(C)$  es la transmitancia modelada con la Ley de Lambert–Beer,

$V_f$  es el voltaje de emisión de la fluorescencia basada en la eficiencia cuántica ( $\eta_f$ ) del RN,

$V_p$  es el voltaje que se pierde por la dispersión de luz y la absorbancia.

La definición de los parámetros ópticos utilizados en la Ec. 3 es la siguiente:

Transmitancia  $T(C) \rightarrow$  Ley de Beer–Lambert. La transmitancia indica cuánta luz pasó a través de la muestra sin ser absorbida, lo que se modela como:

$$T(C) = e^{-\alpha CL} \quad \text{Ec. 4}$$

*Donde:*

$T(C)$  es la transmitancia modelada con la Ley de Lambert–Beer,

$\alpha$  es el coeficiente de absorción del colorante en el PLA,

$L$  es el espesor de la muestra.

Pérdidas por Dispersión  $S(C)$ . La dispersión ocurre por imperfecciones en el material y redirección de luz. Cuando aumenta  $C$ , la dispersión puede aumentar o disminuir la luz detectada.

$$S(C) = \beta C^2 \quad \text{Ec. 5}$$

*Donde:*

$S(C)$  son las pérdidas por dispersión, modeladas con un factor de dispersión empírico,

$\beta$  es un coeficiente empírico de dispersión,

$C$  es la concentración del colorante presente en la muestra.

*Nota: si  $\beta$  tiene signo positivo, indica que se trata de una “Dispersión con Efecto Positivo” (DEP) o que el  $V$  incrementa. Si tiene signo negativo indica que se trata de una “Dispersión con Efecto Negativo” (DNE) o que el  $V$  decremента, asociado a que produce un efecto de redirección de luz fuera del detector.*

Pérdidas por Absorción  $A(C)$ . Este término está vinculado directamente con  $T(C)$ , ya que la luz que no se transmite a través de la muestra se absorbe por la misma. En este sentido, la presencia del RN en las muestras reduce la cantidad de luz que llega al detector, sensor.

$$A(C) = 1 - T(C) \quad \text{Ec. 6}$$

Donde:

$A(C)$  son las pérdidas por absorción, relacionadas con  $T(C)$ ,

$T(C)$  es la transmitancia modelada con la Ley de Lambert–Beer.

Fluorescencia  $F(C)$  – Eficiencia Cuántica  $\eta_f$ . Cuando el RN absorbe luz, parte de esa energía es reemitida como fluorescencia, la cual puede sumarse al  $V_0$  del sensor si su longitud de onda se encuentra dentro del rango de detección del sensor:

$$F(C) = A(C) \cdot \eta_f \quad \text{Ec. 7}$$

Donde:

$F(C)$  es la emisión fluorescente basada en la eficiencia cuántica ( $\eta_f$ ) del RN,

$A(C)$  son las pérdidas por absorción, relacionadas con  $T(C)$ ,

$\eta_f$  es la eficiencia cuántica de fluorescencia ( $0 \leq \eta_f \leq 1$ ).

Por lo tanto, sustituyendo los parámetros físicos de Ec.3 con las descripciones anteriores se tiene que:

$$\begin{aligned} V_{opt}(c) &= V_0 \cdot T(C) + F(C) - S(C) \\ V_{opt}(c) &= V_0 \cdot e^{-\alpha CL} + A(C) \cdot \eta_f - \beta C^2 \end{aligned}$$

Expandiendo las perdidas por absorción  $A(C)$  se propone el siguiente modelo óptico ajustado:

$$V_{opt}(C) = V_0 \cdot e^{-\alpha CL} + (1 - e^{-\alpha CL}) \cdot \eta_f - \beta C^2 \quad \text{Ec. 8}$$

La comparación y posterior sustitución de variables entre Ec.2 y Ec.8 se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Variables de los Modelos Polinomial y Óptico Ajustado.

| Modelo Polinomial              | Modelo Óptico Ajustado                                                                                                   |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $P_0$ – Término independiente  | $V_0$ – Voltaje base, sin pérdidas ni absorciones                                                                        |
| $P_1$ – Coeficiente lineal     | $\beta$ – Factor de dispersión, pérdidas por dispersión, el cual afecta linealmente a la concentración                   |
| $P_2$ – Coeficiente cuadrático | $\alpha$ – Coeficiente de absorción de la Ley de Beer-Lambert, el cual influye de manera exponencial en la transmitancia |
|                                | $\eta_f$ – Eficiencia cuántica de la fluorescencia                                                                       |

### 4.3.1 PLA

Los voltajes de las muestras de PLA sin teñir son ligeramente más altos que los voltajes de las muestras teñidas, e incluso entre muestras teñidas se incrementa conforme la concentración de RN va aumentando. Este comportamiento sugiere que la muestra podría estar redirigiendo o concentrando más la luz incidente hacia el sensor. Este fenómeno puede atribuirse al índice de refracción y/o la textura de la muestra, ya que al ser obtenida de material de impresión 3D se alcanzaban a distinguir pequeñas estrías a lo largo de la muestra. En la Figura 16 se muestra una gráfica de los valores de voltaje respecto a la concentración de RN, representados por puntos de color rojo, así como los resultados del modelo de segundo orden. En este sentido, los valores empíricos de los coeficientes para el modelo polinómico de segundo orden, Ec. 2, para el voltaje promedio son:

$$P_0 = 4.283323$$

$$P_1 = -0.00174090$$

$$P_2 = 0.00017275$$

Por lo que sustituyendo estos valores en la Ec. 2 se obtiene la Ec. 9.

$$V_{prom}(C) = 4.283323 - 0.00174090 \cdot C + 0.00017275 \cdot C^2 \quad \text{Ec. 9}$$

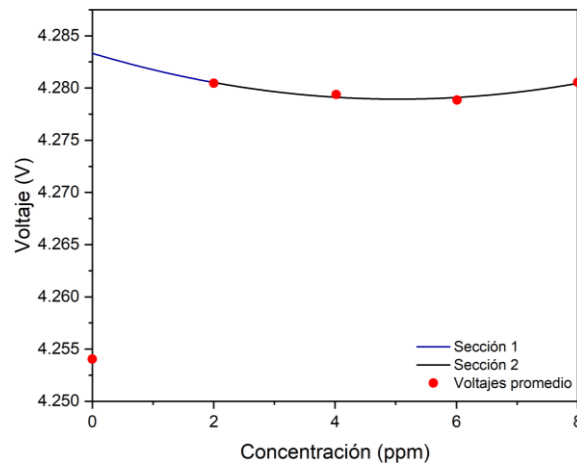


Figura 16. Comportamiento de los valores de voltajes del PLA obtenidos con el modelo polinómico cuadrático.

Sin embargo, debido a que el modelo cuadrático no contempla el comportamiento lineal existente de 0 a 2 ppm, y después de realizar múltiples iteraciones numéricas se encontró que el comportamiento general de los datos se ajustó a un modelo final fraccionado. De acuerdo con Delgado Camón [67], esta aproximación empírica presenta la ventaja de explicar el

comportamiento experimental por completo para las diferentes mediciones de los voltajes de fluorescencia, ya que el efecto de la concentración del analito en la señal de fluorescencia produce una primera sección de respuesta lineal, seguida de una segunda sección en la que el comportamiento ya no es lineal. Este modelo consiste en dos secciones de curvas, Ec. 10, en donde las ecuaciones a sumar se obtienen a partir del modelo óptico ajustado, Ec. 8, encontrando así el modelo óptico final Ec. 11. Este modelo se ajusta gráficamente al orden de los datos, Figura 17. Es importante mencionar que, durante el ajuste empírico de las ecuaciones polinómicas para empatar el modelo óptico, el término adicional de la eficiencia cuántica de la fluorescencia en el modelo óptico,  $\eta_f$ , debía cumplir con  $0 < \eta_f < 1$ , por lo que los valores de los términos del modelo polinómico se emplearon como un punto de partida para establecer los valores finales del modelo óptico resultante. Con base en esta restricción los valores atribuidos a  $\alpha$  y  $\beta$  se ajustaron a la par y se obtuvo la Ec. 10.

$$V_{opt}(C) = Ec(C_1) + Ec(C_2) \quad \text{Ec. 10}$$

Donde:

$$Ec(C_1) \rightarrow V_{opt}(C) = V_0 \cdot e^{-\alpha_1 CL} + (1 - e^{-\alpha_1 CL}) \cdot \eta_{f1} - \beta_1 C^2$$

$$Ec(C_2) \rightarrow V_{opt}(C) = V_0 \cdot e^{-\alpha_2 CL} + (1 - e^{-\alpha_2 CL}) \cdot \eta_{f2} - \beta_2 C^2$$

Sustituyendo los valores numéricos encontrados y realizando la adición de  $Ec(C_1)$  y  $Ec(C_2)$  se obtuvo la Ec. 11.

$$V_{opt}(C) = 4.28335 \{ [e^{-0.0011C} + (1 - e^{-0.0011C})0.99999 + 0.01678C] + [e^{-0.0092741C} + (1 - e^{-0.0092741C})0.08356 + 0.03718C^2] \} \quad \text{Ec. 11}$$

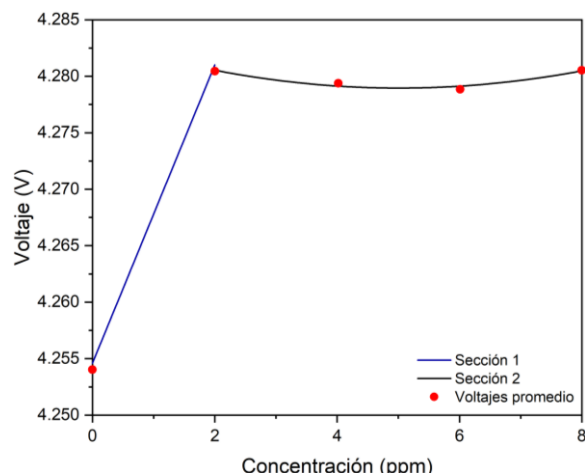


Figura 17. Voltajes obtenidos con el modelo óptico del PLA, Ec. 11.

La Tabla 4 muestra los coeficientes de cada uno de los términos empleados en el modelo óptico final. Para  $n_f$ , la gran diferencia que existe entre los valores ajustados de  $Ec(C_1)$  y  $Ec(C_2)$  se puede atribuir al cambio entre una muestra sin teñir y teñida, y a la variación de concentraciones de las muestras teñidas, ya que la primera sección únicamente describe dos puntos, de 0 y 2 ppm. Por lo que para el cambio tan acentuado entre una muestra sin teñir y teñida, se propuso una eficiencia con un valor muy cercano al límite superior,  $n_f \approx 1$ , ya que la presencia del colorante en la muestra genera una mayor fluorescencia. En este sentido,  $\alpha$  presenta un valor bajo ya que la concentración de RN es baja, lo que refleja una dispersión moderada de la radiación teniendo entonces un valor de  $\beta$  negativo. Por otro lado, para la segunda sección, de 2 a 8 ppm, el valor de  $n_f$  disminuye ya que, aunque se tiene una concentración cada vez más alta de RN el voltaje se mantiene casi de forma constante, por lo que podría considerarse que a pesar del incremento de RN, la  $n_f$  del colorante se mantiene constante en la muestra; por otro lado, y debido al comportamiento de los voltajes, el valor de  $\beta$  es moderado y negativo, por tanto el valor  $\alpha$  no se aleja del valor propuesto para la primera sección.

Tabla 4. Valores de los coeficientes del modelo óptico del PLA.

| Coeficiente | Valor ajustado<br>$Ec (C_1)$ | Valor ajustado<br>$Ec (C_2)$ | Interpretación física                             |
|-------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------------------------------|
| $V_0$       | 4.28335 V                    |                              | Voltaje base muy próximo al experimental de 0 ppm |
| $\beta$     | -0.01678                     | - 0.03718                    | Dispersión moderada                               |
| $\alpha$    | 0.01000                      | 0.08431                      | Baja absorción, esperada en bajas concentraciones |
| $\eta_f$    | 0.99999                      | 0.08356                      | Alta eficiencia cuántica (fluorescencia máxima)   |
| $L$         | 0.11                         |                              | Espesor de la muestra (cm)                        |

#### 4.3.2 PVC

En la Figura 18 se muestra el comportamiento de los voltajes de las muestras de PVC teñidas, en la cual se observa un comportamiento no lineal, pues presenta un mejor ajuste a una geometría de una curva cóncava y con valores menores a la unidad. Esto indica que el comportamiento de las muestras de PVC teñidas se encuentra dominado por una absorción considerable por parte de las muestras teñidas, posiblemente debido a interacciones con la estructura molecular del material, generando así una caída abrupta entre el voltaje  $V_A$  y el voltaje de las muestras [68]. Este comportamiento se puede atribuir a la estructura polar intermedia del PVC y/o a una reorientación óptica, es decir, a altas concentraciones del colorante se forman microagregados que podrían generar una dispersión múltiple de la radiación hacia el sensor [15]. Este fenómeno ya ha sido observado en colorantes orgánicos en medios viscosos o poliméricos, donde la orientación molecular y la auto-agregación alteran la dirección de la luz dispersada [67]. Otra de las razones por las cuales el fenómeno de la fluorescencia disminuye puede atribuirse a la composición del objeto de donde se extrajo la muestra, ya que se trató de una tubería de color blanco, cuya composición puede contener dióxido de titanio, el cual podría disminuir la fluorescencia [69, 70]. Por lo tanto, se puede deducir que el fenómeno que predominó en el comportamiento del RN en el PVC es la absorción, resultado esperado por la naturaleza del polímero. De ahí que los valores empíricos de los coeficientes para el modelo polinómico de segundo orden, Ec. 2, para el voltaje promedio son:

$$P_0 = 4.240918$$

$$P_1 = -0.011864$$

$$P_2 = 0.000987$$

Por lo que sustituyendo estos valores en la Ec. 2 se obtiene la Ec. 12.

$$V_{prom}(C) = 4.240918 - 0.011864 \cdot C + 0.000987 \cdot C^2 \quad \text{Ec. 12}$$

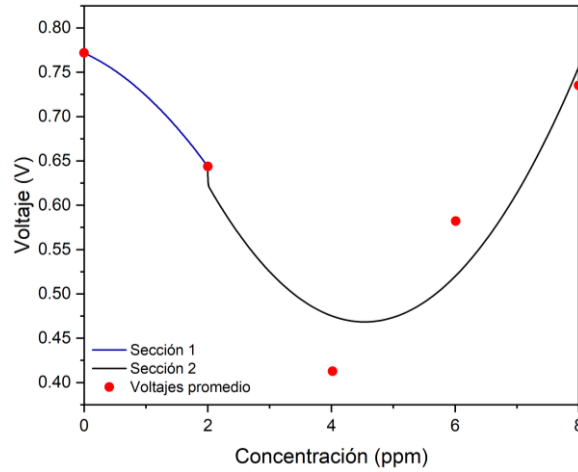


Figura 18. Comportamiento de los valores de voltajes del PVC obtenidos con el modelo polinómico cuadrático.

Cabe resaltar que al momento de realizar la tintura, el PVC absorbió al RN de manera eficiente desde concentraciones bajas, de 0 a 4 ppm; lo anterior se debe a su estructura polar intermedia, generando la divergencia extrema entre los valores de  $V_0$  reportados en la Tabla 2 y reflejando un decremento en la gráfica. Es importante mencionar que la fluorescencia del PVC teñido a diferentes concentraciones fue muy baja e incluso podría considerarse como nula, lo cual podría atribuirse al  $V_0$  que se registró en el sensor sea producto de una DNE. Este cambio en el comportamiento de los  $V_0$  con respecto a la concentración de RN pudo ser debido a la saturación de la absorción óptica de acuerdo con la Ley de Beer–Lambert en términos de  $T$ , Ec.4, la cual podría explicar que a concentraciones bajas el término exponencial crece de manera rápida, provocando una disminución fuerte en la  $T$  y por lo tanto en el  $V_0$ . Sin embargo, para concentraciones más elevadas, a 6 y 8 ppm, el  $V_0$  comienza a aumentar, e incluso pudiera seguir aumentando conforme se incremente la concentración de RN. Este comportamiento inverso al de la primera sección puede ser atribuido a que cuando se emplearon concentraciones más altas el polímero se acercó al régimen de saturación, en donde

$$\lim_{C \rightarrow \infty} T(C) \rightarrow A(C) \rightarrow 1$$

Además de que se sugiere la participación de otros factores ópticos como la dispersión interna positiva o la retrofluorescencia mínima, factores que modifican la cantidad de luz (voltaje) dirigida al fotodiodo.

Y una vez que se alcanzó el régimen de saturación óptica del polímero, el voltaje dejó de disminuir, pues a pesar de que la concentración de RN aumentara no se modificó sustancialmente la absorbancia y efectos ópticos como la dispersión o la redirección de luz o una mínima fluorescencia pudieron contribuir al voltaje detectado.

El comportamiento de los datos se ajustó realizando múltiples iteraciones numéricas, encontrando un modelo final fraccionado en dos secciones de curvas, en donde las ecuaciones a sumar se obtienen a partir del modelo óptico ajustado Ec. 8. Sin embargo, esta segmentación exhibió una transición clara entre dos regímenes ópticos: uno dominado por absorción lineal, en la primera sección, de 0 a 2 ppm, y otro por saturación, dispersión y otros efectos ópticos secundarios como la reorientación óptica o retrofluorescencia, en la segunda sección, de 2 a 8 ppm. Por lo que se optó por modificar el modelo para ajustarlo a cada sección.

Partiendo de la Ec. 2, en la primera sección se presenta una absorción creciente,  $\alpha > 0$ , una dispersión moderadamente negativa,  $\beta < 0$ , y una eficiencia cuántica ligeramente mayor que cero, lo que sugiere que, debido a la baja contribución de fluorescencia en este rango, se considera despreciable y se omite en el modelo, aunque sigue siendo un efecto secundario. Además, para este modelo, un modelo lineal no describe el comportamiento, como sí lo hizo la Ec. 8 empleada para el PLA. Por lo tanto, se eliminó el término de la fluorescencia por ser prácticamente despreciable, se eliminó el término de T que multiplica a  $V_0$  debido al aumento de la absorbancia en el comportamiento de los voltajes, se cambió el signo positivo por un signo negativo porque la pendiente de esta sección de la recta es negativa, ver Figura 19, y se incluyó una dispersión cuadrática para agregar una curvatura cóncava, para finalmente obtener la Ec. 13.

$$V_{opt} = V_0 - (1 - e^{-\alpha CL}) - \beta C^2 \quad \text{Ec. 13}$$

Este modelo es físicamente coherente con el comportamiento de los voltajes promedio del PVC teñido, ya que como se muestra en la Figura 19 se describe cómo el aumento de la concentración de colorante RN produce una absorción creciente de luz, reduciendo el voltaje detectado por el sensor.

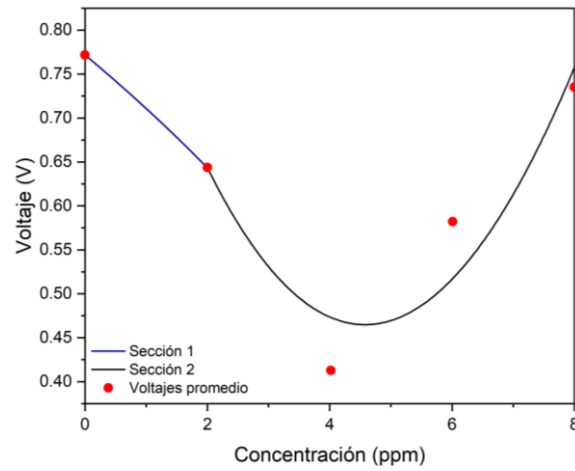


Figura 19. Voltajes obtenidos con el modelo óptico del PVC, Ec. 15.

Para la sección de 2 a 8 ppm, el término  $\eta_f$  se vuelve a incluir, debido a que el voltaje en esta sección va en aumento y la absorbancia va en decremento, por lo que el término de T se agrega en términos de A, Ec. 3 y 5. Cabe señalar que el término cuadrático no se incluyó debido a que el comportamiento de los datos se ajustó a un modelo polinomial lineal, obtenido la Ec. 14.

$$V_{opt} = V_0 - (1 - e^{-\alpha CL}) + (1 - e^{-\alpha CL}) \cdot \eta_f - \beta C^2 \quad \text{Ec. 14}$$

Realizando la adición de las ecuaciones Ec. 13 y Ec. 14 se tiene el modelo óptico propuesto para el PVC, Ec. 15.

$$V_{opt}(C) = 0.7718 - (1 - e^{-0.05792C}) - 0.00469C^2 + 0.6437 - (1 - e^{-0.1414C}) + (1 - e^{-0.1414C})(1 \times 10^{-8}) + 0.0190C^2 \quad \text{Ec. 15}$$

En la Tabla 5 se muestra que los valores de  $\alpha$  presentan una diferencia numérica notable. En la primera sección de la gráfica de la Figura 19, el material teñido se encuentra en el régimen de alta eficiencia de absorción relativa, donde incluso pequeñas concentraciones de RN representa grandes variaciones en el voltaje debido a que el término  $\alpha CL$ , presente en la transmitancia, Ec. 4, fue mínimo y el cambio de la A con respecto a la concentración fue muy pronunciado, por lo que el valor de  $\alpha$  es bajo. Sin embargo, cuando el sistema entra en un régimen de saturación óptica, donde la mayoría de la luz ya ha sido absorbida, el incremento en la absorbancia es mucho menor, siendo  $A \approx 1$  para lo cual se requiere en cada incremento un coeficiente de

absorción mayor para conservar la pendiente apreciable en la Figura 14, pues se tiene una concentración adicional de colorante. Por lo tanto, el ajuste del modelo exige un valor de  $\alpha$  más alto para que el término de A, Ec. 3 y 5 ( $1-e^{-\alpha CL}$ ) conserve sensibilidad y permita un comportamiento adaptable al voltaje observado. Por lo tanto, ambos valores de  $\alpha$  son coherentes con el comportamiento no lineal del polímero y se justifican por la evolución del sistema desde absorción pura hacia efectos de saturación, dispersión y mínima fluorescencia.

Tabla 5. Valores de los coeficientes del modelo óptico del PVC.

| Coeficiente | Valor ajustado Ec. 13 | Valor ajustado Ec. 14 | Interpretación física                                                  |
|-------------|-----------------------|-----------------------|------------------------------------------------------------------------|
| $V_0$       | 0.7718 V              | 0.6437                | Voltaje base muy próximo al experimental de 0 ppm                      |
| $\beta$     | 0.00469               | -0.0190               | Dispersión cuadrática creciente                                        |
| $\eta_f$    | NA                    | $1 \times 10^{-8}$    | Baja eficiencia cuántica, con valor cercano a cero (leve contribución) |
| $\alpha$    | 0.2896                | 0.707                 | Absorción moderada                                                     |
| $L$         | 0.2                   |                       | Espesor de la muestra (cm)                                             |

Por otro lado, ambos coeficientes  $\beta$  tiene valores cercanos a cero, obtenidos de manera empírica, debido a que el modelo óptico del polímero se rige por la absorbancia. Sin embargo, el valor propuesto para la segunda sección presenta un signo negativo, lo que indica que la dispersión de la radiación contribuye a reducir el voltaje conforme aumenta la concentración, lo cual es necesario para explicar la caída del voltaje entre las concentraciones de 2 y 4 ppm. Sin este término cuadrático negativo, el modelo óptico no logra capturar adecuadamente el comportamiento, de forma convexa, que presenta el voltaje en el tramo 2-8 ppm.

### 4.3.3 Tygon™ B-44-4X

Los voltajes de las muestras de Tygon™ B-44-4X teñidas presentan un comportamiento gaussiano, ya que los voltajes aumentan ligeramente con respecto a la concentración de RN debido a la fluorescencia, alcanzando un punto máximo a 6 ppm de RN, presentando un decaimiento a 8 ppm, ver Figura 20. Este polímero patentado es producto modificado derivado del PVC, por lo que presentó una alta absorción del colorante, lo que se puede atribuir a la interacción con la estructura molecular del material [18]. Sin embargo, el comportamiento de los voltajes entre el PVC y el Tygon™ B-44-4X es diferente, ya que mientras el primero no

presentan un comportamiento convexo, el segundo presenta un comportamiento cóncavo, característica que también puede ser atribuible a que las modificaciones de la estructura molecular del PVC para obtener el Tygon™ B-44-4X originen una alta absorbanza y eficiencia cuántica. Por lo tanto, los valores empíricos de los coeficientes para el modelo polinómico de segundo orden, Ec. 2, para el voltaje promedio son:

$$P_0 = 4.240918$$

$$P_1 = 0.011864$$

$$P_2 = 0.000987$$

Por lo que sustituyendo estos valores en la Ec. 2 se obtiene la Ec. 16.

$$V_{prom}(C) = 4.240918 + 0.011864 \cdot C - 0.000987 \cdot C^2 \quad \text{Ec. 16}$$

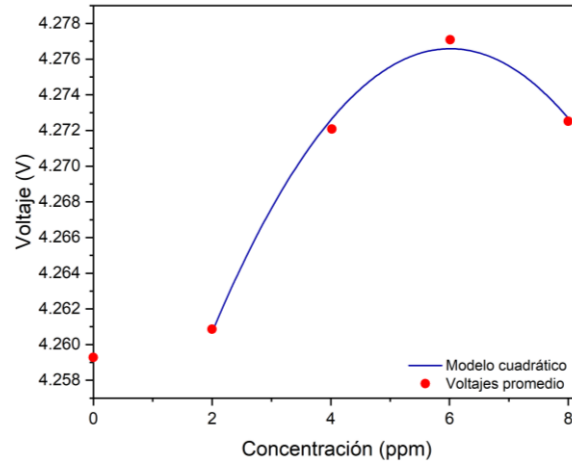


Figura 20. Comportamiento de los valores de voltaje del Tygon™ B-44-4X obtenidos con el modelo polinómico cuadrático.

A pesar de que el espesor de la muestra es de 0.03 mm, menor en comparación con el espesor del PVC, el cambio en la distribución de la luz por interferencia no se presenta de manera significativa. Por lo que, para el modelo óptico propuesto se consideró una ganancia óptica efectiva ( $G$ ) inducida por el material al interactuar con el fluoróforo de la molécula de RN [68]. Para el modelo óptico del Tygon™ B-44-4X se partió de la Ec. 8, sin embargo, tras realizar diferentes iteraciones con valores empíricos y sabiendo que el límite para  $\eta_f$  es la unidad, se observó que el polímero estaba llegando a su punto de saturación, por lo que se decide estructurar el modelo óptico en términos de un voltaje máximo asociado a la fluorescencia ( $V_f$ ),

ya que en la Figura 20 se puede apreciar que en la concentración 6 ppm se tiene un voltaje máximo. Por consiguiente, se opta por expresar el modelo óptico en términos del parámetro de  $G$ , el cual puede ser una constante empírica o calibrada en el sistema. En este sentido, se expresó  $V_f$  en términos de  $G$  de acuerdo a la Ec. 17

$$V_f = V_0 + \eta_f \cdot G \quad \text{Ec. 17}$$

Por lo que al sustituir el término de  $G$  y  $V_f$  en la Ec. 8 se obtiene la siguiente ecuación:

$$V_{opt} = V_0 + (V_f - V_0)(1 - e^{-\alpha CL}) \cdot \eta_f - \beta C^2 \quad \text{Ec. 18}$$

Al realizar la sustitución de  $V_f$  y simplificando los términos semejantes de la ecuación, el modelo óptico para la primera sección se describe con la siguiente ecuación dependiente de la concentración:

$$V(C) = V_0 + (\eta_f \cdot G) \cdot (1 - e^{-\alpha CL}) - \beta C^2 \quad \text{Ec. 19}$$

Cabe mencionar que el término cuadrático de Ec. 19 se incluyó un término cuadrático en  $C$  para ajustar la curvatura observada experimentalmente, tal como se realizó para el modelo óptico del PVC, Ec.15.

De manera física, el término  $G$  refleja la cantidad de voltaje adicional que puede generar el polímero teñido debido a efectos ópticos internos como la AT, la orientación y distribución molecular del RN dentro de la matriz polimérica, la permisividad óptica del Tygon™ B-44-4X, su transparencia o dispersión interna, posibles sitios activos o efectos estructurales que influyen en la eficiencia de emisión, que amplifican o limitan la fluorescencia [6, 67, 69, 70]. Por lo tanto,  $G$  puede entenderse como una propiedad estructural y óptica del polímero que amplifica absorbe o restringe la señal fluorescente; incluyendo aspectos como la transparencia interna, los posibles sitios de interacción con el RN, la orientación molecular del colorante, la permeabilidad óptica y otros factores propios de la matriz polimérica. Por lo que con lo anterior se explicaría por qué el Tygon™ B-44-4X, a pesar de presentar una alta absorbancia,  $V_0$  aumenta ligeramente hasta saturarse y a su vez se incluya la eficiencia cuántica como propiedad del fluoróforo del colorante.

Por lo tanto, el modelo óptico final consta de una suma de la Ec. 19 con los valores de las variables representativas de cada sección de la gráfica, ver Figura 21, siguiendo entonces la Ec. 20.

$$V_{opt}(C) = Ec_1 + Ec_2 \quad \text{Ec.20}$$

Donde:

$$Ec_1 \rightarrow V_{opt}(C) = V_0 + (\eta_{f_1} \cdot G) \cdot (1 - e^{-\alpha_1 CL}) - \beta_1 C^2$$

$$Ec_2 \rightarrow V_{opt}(C) = V_0 + (\eta_{f_2} \cdot G) \cdot (1 - e^{-\alpha_2 CL}) - \beta_2 C^2$$

Sustituyendo entonces los valores numéricos encontrados y realizando la adición de  $Ec_1$  y  $Ec_2$  se tiene el modelo óptico propuesto para el Tygon™ B-44-4X en la Ec. 21

$$V_{opt}(C) = 8.453294 + (0.55922067)(1 - e^{-0.42473979C}) - 0.00020734C^2 + (1.332609292 \times 10^{-3})(1 - e^{-0.42473979C}) + 0.00020733C^2 \quad \text{Ec. 21}$$

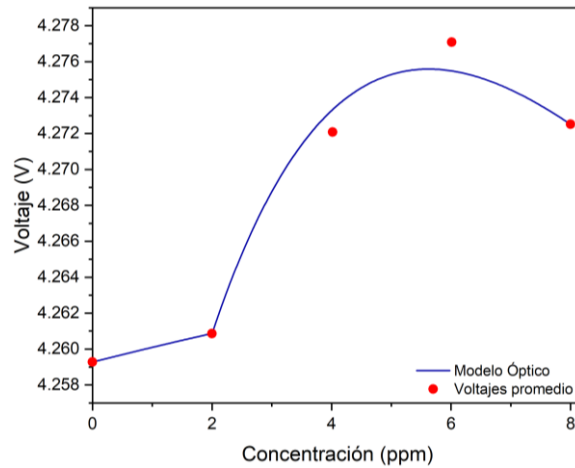


Figura 21. Voltajes obtenidos con el modelo óptico del Tygon™ B-44-4X, Ec.21.

En la Tabla 6 se exponen los coeficientes empleados para el modelo óptico de la Ec. 21, en donde se aprecia que los valores de  $\alpha$  son cifras pequeñas, las cuales presentan un comportamiento similar a los valores de PVC descritos en la Tabla 5. Sin embargo, a pesar de tener un comportamiento similar, el que el Tygon™ B-44-4X presente una alta absorbancia y que a su vez se presente una  $\eta_f$  en todos los voltajes registrados, puede deberse a los aditivos que se agregan al PVC para crear este polímero.

Tabla 6. Valores de los coeficientes del modelo óptico del Tygon™ B-44-4X

| Coeficiente | Valor ajustado<br>$Ec_1$ | Valor ajustado<br>$Ec_2$ | Interpretación física                                                                |
|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| $V_0$       | 4.226647                 |                          | Voltaje base muy próximo al experimental de 0 ppm                                    |
| G           | 1.744253                 | 1.596405                 | Ganancia efectiva del sistema (V)                                                    |
| $\beta$     | -0.00020734              | 0.00020733               | Dispersión cuadrática asociado a pérdidas por scattering o perdidas no fluorescentes |
| $\alpha$    | 14.157993                |                          | Coefficiente de absorción en la Ley de Beer-Lambert                                  |
| $\eta_f$    | 0.000764                 | 0.03503                  | Eficiencia cuántica de fluorescencia                                                 |
| $L$         | 0.03                     |                          | Espesor de la muestra (cm)                                                           |

Por otro lado, en los valores de los coeficientes  $\beta$  se puede observar que existe un cambio de signo, esto refleja un cambio en el régimen óptico del sistema: de una fluorescencia incipiente en la primera sección, a una respuesta saturada y dominada por pérdidas no lineales en la segunda sección. Este comportamiento no solo es consistente con los datos experimentales, sino también con la teoría óptica aplicada a sistemas fluorescentes bajo concentraciones crecientes [67]. En la primera sección de las concentraciones,  $Ec_1$ , el valor negativo de  $\beta$  implica una leve disminución del voltaje con el cuadrado de la concentración de la Ec. 21. Esto es consistente con un régimen donde las pérdidas ópticas por dispersión o absorbanza son mínimas y amortiguan ligeramente el inicio del efecto fluorescente. Es decir, la señal de fluorescencia crece, pero no de manera lineal debido a las condiciones físicas del sistema. Para la segunda sección,  $Ec_2$ ,  $\beta$  es positivo, lo que implica una reducción del voltaje a medida que se incrementa el término de la concentración cuadrada. Este comportamiento indica una saturación óptica, donde las pérdidas no fluorescentes como la dispersión de la luz del láser, la auto absorción o la reabsorción dominan a concentraciones medias y altas [67].

#### 4.3.4 PET

En la Figura 22 se muestra el comportamiento de los voltajes de las muestras teñidas de PET semejante a una curva cóncava, en donde se presenta una fluorescencia inicial mínima pero detectable, la cual se representa adecuadamente con un modelo exponencial moderado, sin evidencia de dispersión óptica significativa. El valor del voltaje de fluorescencia medido se mantiene prácticamente constante con una leve tendencia ascendente. En la segunda sección de

concentraciones, de 2 a 8 ppm, se observa un comportamiento levemente decreciente, atribuible a un incremento en las pérdidas ópticas por dispersión o redirección de luz, cuando  $\beta > 0$ , y posiblemente a una saturación de RN en el polímero, llegando a su AT máxima y por ende observar un comportamiento decreciente en los voltajes de la fluorescencia, aunque es importante aclarar que la absorción sigue existiendo. Este comportamiento se ajusta adecuadamente a un modelo matemático de segundo orden, similar al modelo empleado para el Tygon™ B-44-4X, en donde se puede observar una curvatura y comportamiento similar a lo observado en la Figura 20. En este sentido, los valores empíricos de los coeficientes para el modelo polinómico de segundo orden, Ec. 2, para el voltaje promedio se obtuvieron como resultado de una serie iteraciones de, los cuales son:

$$P_0 = 4.25739811$$

$$P_1 = 0.00119299$$

$$P_2 = 0.00022854$$

Por lo que sustituyendo estos valores en la Ec. 2 se obtiene la Ec. 22.

$$V_{prom}(C) = 4.25739811 + 0.00119299 \cdot C - 0.00022854 \cdot C^2 \quad \text{Ec. 22}$$

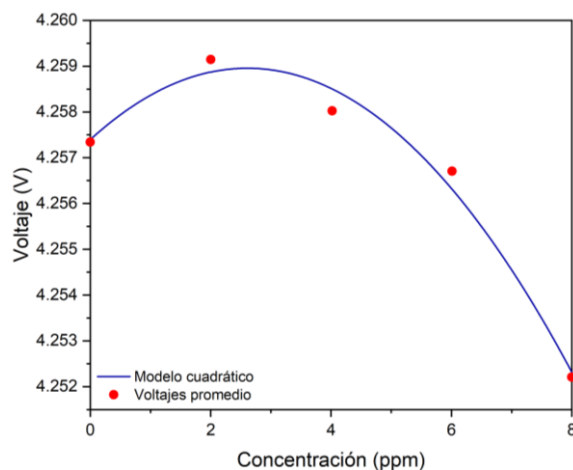


Figura 22. Comportamiento de los valores de voltaje del PET obtenidos con el modelo polinómico cuadrático.

El comportamiento cóncavo de los voltajes a diferentes concentraciones de RN de las muestras de PET teñidas sugiere una posible saturación o competencia entre una ganancia fluorescente y una dispersión óptica. Sin embargo, para proponer el modelo óptico de este polímero, el término de ganancia no aplica para este material, ya que presenta una estructura molecular diferente al

Tygon™ B-44-4X, ya que la molécula del PET contiene un anillo aromático, mientras que el Tygon™ B-44-4X contiene un átomo de cloro. Además, la curva de los voltajes del PET sugiere una continuidad y una geometría constante en la que no existe una transición marcada entre regímenes ópticos, como sí ocurre en otros materiales más absorbentes o dispersivos como el PVC o el Tygon™ B-44-4X. No obstante, la fluorescencia inducida por RN es débil, por lo que el parámetro  $G$  no representa un comportamiento físico consistente, como sí lo hacía para el Tygon™ B-44-4X. Debido a lo anterior, la ecuación base para modelar el comportamiento de este polímero fue la Ec. 8, pero para este polímero no fue necesario evaluar los voltajes mediante dos secciones de la curva ya que, como se muestra en la Figura 23, un solo modelo describe el ajuste de los voltajes. Por lo que se obtiene el modelo óptico para el PET, Ec. 23, en donde los coeficientes de las variables se encuentran expresados en la Tabla 7 y el comportamiento se muestra en la Figura 23.

$$V_{opt}(C) = (4.257825)(e^{-0.03000081C}) + (1 - e^{-0.03000081C})(0.033707) - 0.000198C^2$$

Ec.23

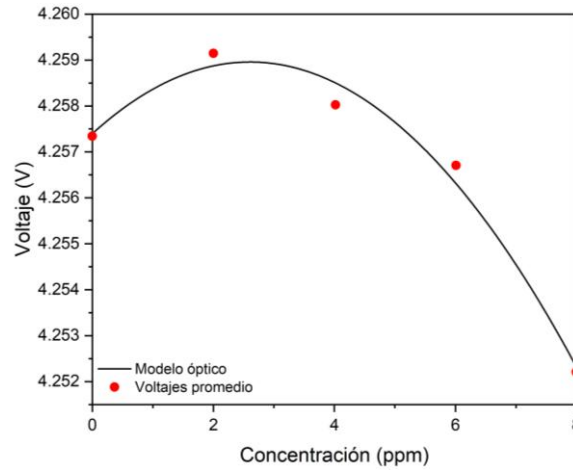


Figura 23. Voltajes obtenidos con el modelo óptico del PET, Ec. 23

En la Tabla 7 se tiene una parametrización que muestra una respuesta fluorescente tenue, por la baja  $\eta_f$  del RN en PET, de acuerdo con lo discutido por García y Delgado Camón [65], [67]. Como se muestra en la Figura 23, existe una ligera emisión de fluorescencia o redirección óptica, además de que no se aprecia una dispersión negativa significativa, lo que justifica el por qué solo existe un valor para cada variable del modelo óptico. No obstante, podría haber una

contribución mínima del Rojo de Nilo compatible con un régimen inicial de baja concentración, sin saturación. En este sentido, con base a los valores de la Tabla 7 y a la Figura 23 el PET se comportó ópticamente como un material de poca fluorescencia, poco absorbente del RN y mostró una dispersión mínima, lo que convierte a este polímero en un candidato apropiado para ser modelado mediante funciones matemáticas de baja complejidad.

Tabla 7. Valores de los coeficientes del modelo óptico del PET.

| Coeficiente | Valor ajustado<br>Ec. 23 | Interpretación física                                                                                            |
|-------------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $V_0$       | 4.257825V                | Voltaje base                                                                                                     |
| $\beta$     | 0.000198                 | Dispersión cuadrática asociada a pérdidas (dispersión leve)                                                      |
| $\alpha$    | 1.000027                 | Baja absorción (esperada en bajas concentraciones)                                                               |
| $\eta_f$    | 0.033707                 | Actúa como el término de intensidad máxima fluorescente, en este caso como: una eficiencia fluorescente muy baja |
| $L$         | 0.03                     | Espesor de la muestra (cm)                                                                                       |

#### 4.4 Análisis con técnica espectroscópica Raman

Las muestras de plásticos teñidos y sin teñir fueron caracterizados por espectroscopia Raman únicamente para corroborar que el fenómeno de la fluorescencia estuviera presente.

En la Figura 25 se muestra el espectro Raman, en donde se muestra la presencia de fluorescencia en cada una de las muestras teñidas, la cual se incrementa y provoca un desplazamiento de la línea base conforme se incrementa la concentración de RN [73]. Cabe resaltar que el polímero teñido no mostró dicho comportamiento de manera constante, ya que llega a un máximo de voltaje de fluorescencia en 4 ppm, lo cual indicaría que a esta concentración de RN el PLA llega a su máxima AT, ya que se puede observar un decaimiento en la fluorescencia cuando la concentración es más alta. Por lo que al comparar con los voltajes promedio del PLA de la Tabla

2, se puede observar que el voltaje más alto es a 2 ppm, valor que únicamente difiere en una milésima del voltaje medido para 4 ppm.

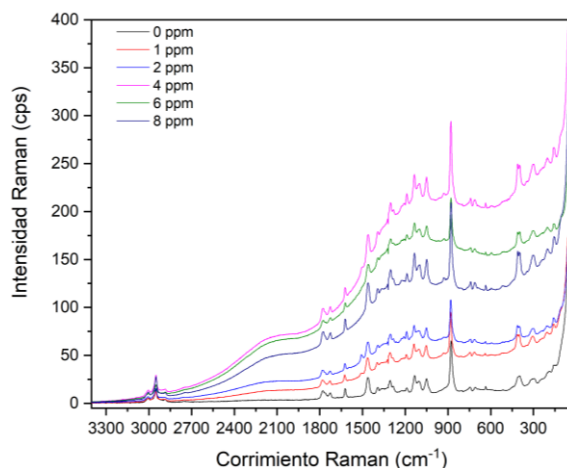


Figura 24. Espectro Raman del polímero PLA teñido con RN a diferentes concentraciones.

Para el PVC teñido se muestran en la Figura 26 los espectros Raman en los cuales se observa el comportamiento referente a la presencia de fluorescencia en cada muestra teñida a diferentes concentraciones, ya que se presenta un desplazamiento de la línea base del espectro [73]. Sin embargo, los picos característicos de este polímero no se aprecian en los espectros debido a que la fluorescencia enmascara los picos Raman del PVC, debido a la presencia del RN en las muestras teñidas, así como a la presencia de los aditivos en la muestra sin teñir. En este sentido, cuando la muestra teñida con RN a 2 ppm presentó una fluorescencia mayor que las demás concentraciones, lo que indicaría que a esta concentración el PVC alcanza su AT máxima y por ende la fluorescencia es mayor. Sin embargo, la concentración de 6 ppm también muestra una mayor fluorescencia. Por lo que al comparar con los voltajes promedio del PVC de la Tabla 2, se puede observar que el voltaje más alto se alcanza en las concentraciones de 2, 6 y 8 ppm, lo que concuerda con el comportamiento de los espectros Raman de la Figura 24, pues se presentan

valores altos de voltajes a concentraciones bajas, llegando al punto mínimo en 4 ppm para después volver a incrementar el voltaje para determinar la fluorescencia.

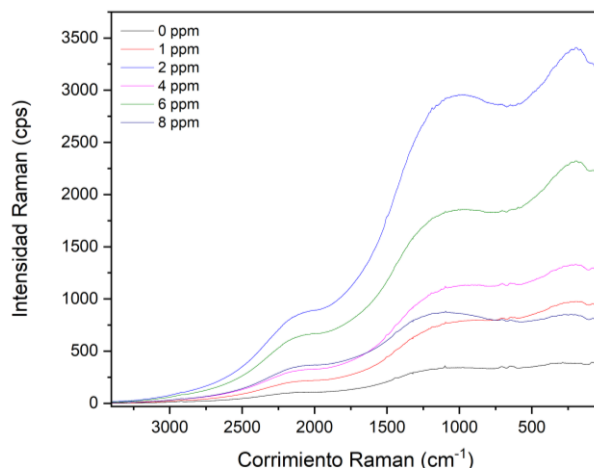


Figura 25. Espectro Raman del polímero PVC teñido con RN a diferentes concentraciones.

En la Figura 27 se muestran los espectros Raman del polímero Tygon™ B-44-4X, donde se observa que, al igual que en los otros polímeros, se presenta un desplazamiento de la línea base del espectro, lo que indica la presencia de fluorescencia [73]. Cabe resaltar que el polímero teñido mostró una fluorescencia en incremento conforme la concentración de colorante aumentaba, hasta llegar a un máximo entre las concentraciones 4 y 6 ppm, lo cual indicaría que en este rango de concentraciones de RN el Tygon™ B-44-4X llega a su máxima AT, ya que se puede observar un decaimiento en la fluorescencia cuando la concentración es más alta. Por lo que al comparar con los voltajes promedio del Tygon™ B-44-4X de la Tabla 2, se puede

observar que el voltaje más alto es a 6 ppm, valor que únicamente difiere en cinco milésimas del voltaje medido para 4 ppm.

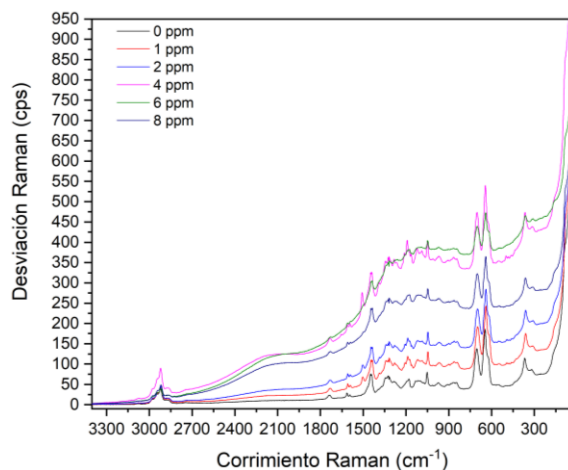


Figura 26. Espectro Raman del polímero Tygon™ B-44-4X teñido con RN a diferentes concentraciones

En cada uno de los espectros Raman, ver Figura 28, se presenta un desplazamiento de la línea base del espectro, lo que indica la presencia de fluorescencia en la muestra [73]. Cabe resaltar que el polímero teñido mostró una fluorescencia en decremento con la concentración de RN, por lo tanto la muestra teñida mostró un máximo de fluorescencia entre 4 y 0 ppm, lo cual indicaría que en este rango de concentraciones de RN el PET llega a su AT máxima, ya que a concentraciones mayores se observa un decaimiento en la fluorescencia. Por lo que al comparar

con los voltajes promedio del PET de la Tabla 2, se puede observar que el voltaje más alto es a 2 ppm, valor que se encuentra en el rango anteriormente descrito.

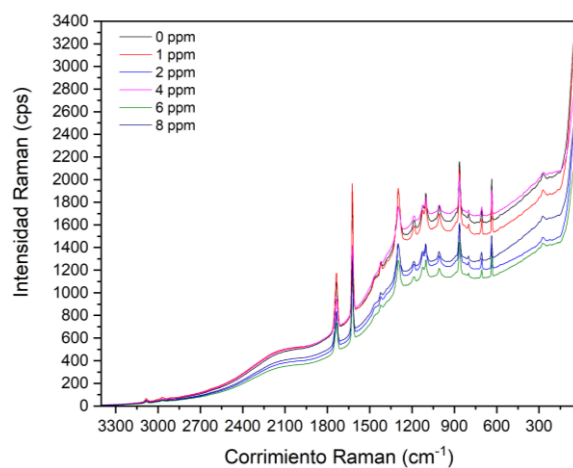


Figura 27. Espectro Raman del polímero PET teñido con RN a diferentes concentraciones.

---

## CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO

### Conclusiones

La afinidad tintórea, cantidad de pigmento que absorbe cada polímero, depende de su constitución química y/o aditivos. Aunque en este trabajo se utilizó el colorante Rojo Nilo y se realizó el mismo proceso de tinción, y se utilizó la misma fuente de radiación en los distintos experimentos que se llevaron a cabo para la medición de la fluorescencia, los resultados obtenidos muestran que la afinidad tintórea al Rojo Nilo varía significativamente entre los diferentes polímeros, en función de su polaridad, morfología superficial, estructura molecular y aditivos.

La determinación de la afinidad tintórea se realizó utilizando el fenómeno de la fluorescencia, que se determinó midiendo los voltajes de la radiación transmitida de cada una de las muestras, teñidas y sin teñir, utilizando un Sistema Óptico diseñado y construido específicamente para el desarrollo de los experimentos realizados en este trabajo. Los diversos voltajes de los diferentes polímeros medidos fueron correlacionados con modelos ópticos descriptivos del comportamiento de los polímeros y, en el sentido de la medición de fluorescencia, fueron congruentes con las mediciones que se obtuvieron de equipos robustos como el espectrofotómetro Raman, pues los valores de los voltajes de las muestras variaron conforme a la concentración de Rojo Nilo. Por lo que, aun cuando en el mercado existen diferentes equipos específicos para medir la fluorescencia, el Sistema Óptico diseñado y construido es una opción viable y asequible para obtener resultados concluyentes.

Para los polímeros analizados, PLA, PVC, del Tygon™ B-44-4X y PET, no se observó una tendencia proporcional entre los voltajes  $V_0$  de los polímeros teñidos con las diferentes concentraciones el colorante Rojo Nilo, lo cual indicaría que el comportamiento de la señal detectada no evidencia un dominio del fenómeno de la fluorescencia, lo que sugiere que otros mecanismos ópticos, como absorción o dispersión, son predominantes. El PET presenta ligeras diferencias en el voltaje entre muestras teñidas y sin teñir, lo que podría indicar una menor afinidad tintórea del polímero por el Rojo Nilo bajo estas condiciones experimentales y por consecuencia se presenta una fluorescencia mínima, aunque también influyen factores como los

cambios en el modo en que la luz incidente es redirigida o dispersada dentro del volumen de la muestra, en función de su microestructura y propiedades ópticas.

En algunas muestras teñidas, como en el PET, PLA y Tygon™ B-44-4X el voltaje de salida del sensor aumenta, lo cual puede explicarse por las propiedades fluorescentes del propio colorante, ya que es fluorescente en entornos no polares, como los plásticos, y su longitud de onda de emisión depende de la longitud de onda de excitación y del medio en el que se encuentra. El voltaje de salida del sensor se ve afectado por múltiples interacciones ópticas en el sistema, incluyendo dispersión de la luz, absorción óptica y la fluorescencia inducida por el RN.

El modelo matemático presentado en la Ec. 8 describe el comportamiento general del PLA y del PET, los cuales presentan baja absorción de luz, ya que muestran un ligero aumento en el voltaje de salida de las diferentes concentraciones de colorante, lo que sugiere que están afectando la dirección de la luz incidente haciendo que una mayor cantidad de fotones incidan en el detector, pues la luz transmitida es mayor que la luz absorbida. Por otro lado, para los polímeros Tygon™ B-44-4X y PVC, se realizaron diversas modificaciones de la Ec. 8, ya que estos polímeros tuvieron un comportamiento distinto al PLA y al PET, ya que la absorción de luz incidente fue considerable, posiblemente debido a interacciones de la radiación incidente con la molécula del polímero y/o a los aditivos.

La presencia de la fluorescencia, y por lo tanto la AT, en las muestras teñidas fue comprobada por espectroscopia Raman, cuyos espectros presentaron un desplazamiento de la línea base, que es un indicativo de la presencia de la fluorescencia, y cuya intensidad fue similar al comportamiento de los voltajes de cada polímero con respecto a cada concentración.

### **Trabajo a futuro**

Los resultados obtenidos con el Sistema Óptico, diseñado y construido para el desarrollo de este trabajo, establecen las bases para realizar futuras investigaciones orientadas a su optimización y ampliación funcional. Específicamente, este Sistema Óptico podría ser modificado para permitir no solo el análisis de muestras en estado seco, sino también la caracterización de microplásticos mediante fluorescencia en matrices acuosas u otros medios complejos, lo que incrementaría significativamente su campo de aplicación.

El modelo óptico fundamental presentado en la Ec. 8 puede extrapolarse como marco teórico para el estudio de otros polímeros no considerados en esta investigación. La generación de dichos modelos contribuiría al desarrollo de metodologías estandarizadas para la detección de microplásticos en diversos sistemas, proporcionando así herramientas valiosas para la creación e implementación de políticas ambientales.

Adicionalmente, los modelos ópticos desarrollados para describir el comportamiento fluorescente de los microplásticos estudiados pueden constituir a la elaboración de una base de datos de referencia para la identificación de polímeros desconocidos en muestras ambientales. Este enfoque permitiría no solo detectar y clasificar el tipo de material polimérico presente, sino también fundamentar estrategias de monitoreo y/o prevención ambiental.

---

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] E. Rojo-Nieto y T. Montoto, “Basuras marinas, plásticos y microplásticos: orígenes, impactos y consecuencias de una amenaza global”, *Ecologistas en Acción*, Enero 2017. Disponible en: <https://www.ecologistasenaccion.org/wp-content/uploads/adjuntos-spip/pdf/informe-basuras-marinas.pdf>
- [2] Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), “Inventario Nacional de Fuentes de Contaminación Plástica (INFCP)” CDMX, México, 2023. Último acceso: 19 de Enero de 2025. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/817333/INFCP\\_RE\\_\\_2023.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/817333/INFCP_RE__2023.pdf)
- [3] S. S. Celi-Simbaña, D. S. Andrade-Mora, S. J. Loza-Pavón y T. I. Bermeo-Sierra, “Microplásticos, un problema de salud pública emergente”, *Revista Información Científica*, vol. 102, Julio 2023, doi: 10.5281/zenodo.8105111.
- [4] S. Calvo Anglada y E. B. Morales, “Detección y caracterización por tamaños de micro y nanoplásticos en muestras de interés ambiental”, Trabajo de fin de grado, Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España, 2020. Disponible en: <https://zaguan.unizar.es/record/97987/files/TAZ-TFG-2020-3200.pdf?version=1F>
- [5] G. Castañeta, A. F. Gutiérrez, F. Nacaratte y Carlos A. Manzano, “Microplastics: a contaminant that grows in all environmental areas, its characteristics and possible risks to public health from exposure”, *Revista Boliviana de Química*, vol. 37, no. 3, Agosto 2020, doi: 10.34098/2078-3949.37.3.4.
- [6] T. Maes, R. Jessop, N. Wellner, K. Haupt y A. G. Mayes, “A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red”, *Scientific Reports*, vol. 7, Marzo 2017, doi: 10.1038/srep44501.
- [7] J. C. Prata, V. Reis, J. T. V. Matos, J. P. da Costa, A. C. Duarte y T. Rocha-Santos, “A new approach for routine quantification of microplastics using Nile Red and automated software (MP-VAT)”, *Science of the Total Environment*, vol. 690, pp. 1277–1283, Noviembre 2019, doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.07.060.

- [8] C. Bollaín Pastor y D. V. Agulló, “Presencia de Microplásticos en aguas y su potencial impacto en la salud pública”, *Revista Española de Salud Pública*, vol. 93, pp. 28–29, Agosto 2019, <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=17066277062>
- [9] M. Elena Páez-Hernández, I. S. Ibarra Ortega, R. L. Camacho-Mendoza y I. P. Silva, “Microplásticos (MP): Clasificación, aplicación y remoción”, *CienciAcierta*, Universidad Autónoma de Coahuila, vol. 75, pp. 6–21, Julio 2023. Disponible en: <http://www.cienciacierta.uadec.mx/articulos/cc75/317.-%20microplasticos.pdf>
- [10] A. Areanely, C. Salas, J. Carlos, A. Zeferino y A. Vazquez, “Técnica de tinción de fluorescencia con Rojo Nilo y Safranina para la identificación de microfibras plásticas”, *Encuentro de Expertos en Residuos Sólidos*, vol. 15, no. 1, pp. 1–15, Octubre 2022. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/374946940>
- [11] C. F. Quintero Blandón y J. D. Mahecha Rico, “Propiedades mecánicas de un concreto reforzado con fibras de PET reciclado”, Tesis de titulación, Facultad de Ingeniería, Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, Colombia, 2015. Disponible en: <https://repository.unimilitar.edu.co/bitstream/handle/10654/15477/MahechaRicoJeisson2016%20.pdf?sequence=1>
- [12] Universidad de Costa Rica, “Acerca del PET”. Último acceso: 09 de noviembre de 2023. Disponible en: <https://kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/15405/ANEXO%201-PET.pdf?sequence=2>
- [13] J. Weber, D. Petrović, B. Strodel, S. H. J. Smits, S. Kolkenbrock, C. Leggewie y K. E. Jaeger, “Interaction of carbohydrate-binding modules with poly(ethylene terephthalate)”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 103, no. 12, pp. 4801–4812, Junio 2019, doi: 10.1007/s00253-019-09760-9.
- [14] V. Moll, K. B. Beć, J. Grabska y C. W. Huck, “Investigation of Water Interaction with Polymer Matrices by Near-Infrared (NIR) Spectroscopy”, *Molecules*, vol. 27, no. 18, Septiembre 2022, doi: 10.3390/molecules27185882.
- [15] A. Turner y M. Filella, “Polyvinyl chloride in consumer and environmental plastics, with a particular focus on metal-based additives”, *Environmental Science: Processes and Impacts*, vol. 23, no. 9, pp. 1376–1384, Septiembre 2021, doi: 10.1039/d1em00213a.

- [16] J. Van Turnhout, “Poly(vinyl chloride) (Dielectric Properties)”, The Polymeric Materials Encyclopedia, Delft University of Technology, Delft, Países Bajos. Octubre 2019. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/336171057>
- [17] knowde Marketplace, “TygonTM B-44-4X”, Saint-Gobain. Último acceso: 30 de marzo de 2025. Disponible en: <https://www.knowde.com/stores/saint-gobain/products/tygon-b-44-4x>
- [18] United States Plastic Corporation, “Material Safety data sheet of TygonTM B-44-4X”, Hoja de seguridad, Sain-Gobain Performance Plastics, 2022. Disponible en: <https://www.usplastic.com/catalog/files/msdss/MSDSB444X.pdf>
- [19] BCN3D Technologies, “Ficha de datos de seguridad BCN3D Filaments PLA”, 2019. Último acceso: 15 de Agosto de 2024. Disponible en: [www.bcn3dtechnologies.com](http://www.bcn3dtechnologies.com)
- [20] S. Farah, D. G. Anderson y R. Langer, “Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications - A comprehensive review”, Advanced Drug Delivery Reviews, 15 de Diciembre de 2016, Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.addr.2016.06.012.
- [21] I. G. Garrido Fariña, M. Á. Cornejo Cortés y V. M. López Pérez, “Colorantes para laboratorios de ciencias básicas”, Cuautitlán, México: Ediciones Cuautitlán, 2021, pp. 23–30. Disponible en: [https://portal.cuautitlan.unam.mx/manuales/Manual\\_Colorantes.pdf](https://portal.cuautitlan.unam.mx/manuales/Manual_Colorantes.pdf)
- [22] D. Marcano, “Introducción a la Química de los Colorantes”, Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales, Caracas, Venezuela, 2018. Disponible en: <https://acfiman.org/wp-content/uploads/2023/01/introduccion-a-la-quimica-de-los-colorantes.pdf>
- [23] Isidoro Sanvicente Velasco, “El pintado de los elementos plásticos”, Interempresas. Último acceso: 04 de Marzo de 2025. Disponible en: <https://www.interempresas.net/Industria-Pintura/Articulos/4222-El-pintado-de-los-elementos-plasticos.html>
- [24] K. H. R. Jensen y R. W. Berg, “CLARITY-compatible lipophilic dyes for electrode marking and neuronal tracing”, Scientific Reports, vol. 6, Septiembre 2016, doi: 10.1038/srep32674.
- [25] L. C. Corrales Ramírez y L. Caycedo Lozano, “Principios fisicoquímicos de los colorantes utilizados en microbiología,” Nova, vol. 18, no. 33, Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Cundinamarca, Colombia, pp. 73–96, Feb. 10, 2020. doi: 10.22490/24629448.3701.

- [26] J. T. Cirulis, B. C. Strasser, J. A. Scott y G. M. Ross, “Optimization of staining conditions for microalgae with three lipophilic dyes to reduce precipitation and fluorescence variability”, *International Society for Advancement of Cytometry*, vol. 81 A, no. 7, pp. 618–626, Julio 2012, doi: 10.1002/cyto.a.22066.
- [27] J. Murube, “Rose Bengal: The Second Most Commonly Used Surfacular Vital Stain,” *The Ocular Surface*, vol. 12, no. 1, pp. 14–22, Enero 2014, doi: 10.1016/J.JTOS.2013.10.003.
- [28] S. Demartis, A. Obinu, E. Gavini, P. Giunchedi y G. Rassa, “Nanotechnology-based rose Bengal: A broad-spectrum biomedical tool”, *Dyes and Pigments*, Elsevier Ltd., 01 de Abril de 2021, doi: 10.1016/j.dyepig.2021.109236.
- [29] T. W. L. Lam, H. T. Ho, A. T. H. Ma y L. Fok, “Microplastic contamination of surfacewater-sourced tap water in hong kong-A preliminary study”, *Applied Sciences (Switzerland)*, vol. 10, no. 10, Mayo 2020, doi: 10.3390/app10103463.
- [30] S. Mondal, B. Doloi y S. Ghosh, “Spectroscopic studies of interaction of safranin T with ionic surfactants”, *Fluid Phase Equilibria*, vol. 360, pp. 180–187, Diciembre 2013, doi: 10.1016/J.FLUID.2013.09.049.
- [31] Q. Yang, X. Qin, C. Yan y X. Zhu, “A novel fluorescent chemosensor for safranin T based on calixarene-1,3-diacyl hydrazone”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 212, pp. 183–189, Junio 2015, doi: 10.1016/J.SNB.2015.02.020.
- [32] Química industrial Chile, “Rodamina B,” Química industrial Chile. Último acceso: 17 de Noviembre de 2023. Disponible en: <https://quimicaindustrial.cl/producto/rodamina-b/>
- [33] W. J. Shim, Y. K. Song, S. H. Hong y M. Jang, “Identification and quantification of microplastics using Nile Red staining”, *Marine Pollution Bulletin*, vol. 113, no. 1–2, pp. 469–476, Diciembre 2016, doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.10.049.
- [34] P. Greenspan y S. D. Fowler, “Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile Red”, *Journal of Lipid Research*, vol. 26, no. 7, pp. 781–789, 1985, doi: 10.1016/s0022-2275(20)34307-8.
- [35] P. Greenspan, E. P. Mayer y S. D. Fowler, “Nile Red” A Selective Fluorescent Stain for Intracellular Lipid Droplets”, *The Journal of Cell Biology*, vol. 100, pp. 965–973, Marzo 1985, Disponible en: <http://rupress.org/jcb/article-pdf/100/3/965/1051509/965.pdf>

- [36] A. I. de la Jara Valido, “Determinación del contenido lipídico en ‘*Cryptocodinium cohnii*’ por citometría de flujo”, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 2003. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10553/11633>
- [37] V. C. Shruti, F. Pérez-Guevara, P. D. Roy y G. Kutralam-Muniasamy, “Analyzing microplastics with Nile Red: Emerging trends, challenges, and prospects”, *Journal of Hazardous Materials*, 05 de Febrero de 2022, Elsevier B.V., doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.127171.
- [38] T. Stanton, M. Johnson, P. Nathanail, R. L. Gomes, T. Needham y A. Burson, “Exploring the Efficacy of Nile Red in Microplastic Quantification: A Costaining Approach”, *Environmental Science and Technology Letters*, vol. 6, no. 10, pp. 606–611, Octubre 2019, doi: 10.1021/acs.estlett.9b00499.
- [39] M. Cobos Ruiz, J. Carlos Castro Gómez, y L. A. Cerdeira Gutierrez, “Potencial biotecnológico para la producción sustentable de biodiesel de microalgas oleaginosas aisladas del río Itaya, Loreto, Perú,” *Ecología Aplicada*, vol. 13, no. 2, Lima, Perú, pp. 169–74, 22 de Septiembre de 2014. doi: 10.21704/rea.v13i1-2.467.
- [40] J. Cegarra, P. Puente, M. Pepió y J. Azuaga, “El factor de afinidad y su aplicación a la tintura optimizada en foulard”, *Biol. Intextar*, vol. 91, pp. 45–61, 1987, Disponible en: <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/6256/Article04.pdf?sequence=1>
- [41] G. E. Pallo Cuichán, “Análisis comparativo de la Afinidad Tintórea de colorantes reactivos amarillo, azul y rojo en tejidos de fibras celulósicas”, Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador, 2020. Disponible en: <https://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/10669>
- [42] J. Cegarra, P. Puente y J. Valldeperas, “Fundamentos científicos y aplicados de la tintura de materias textiles”, Universidad Politécnica de Barcelona, Barcelona, España, 1981.
- [43] H. C. Ishikawa-Ankerhold, R. Ankerhold y G. P. C. Drummen, “Advanced fluorescence microscopy techniques-FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM”, *Molecules*, vol. 17, no. 4, pp. 4047–4132, Abril 2012, doi: 10.3390/molecules17044047.
- [44] Departamento de Biología Aplicada, “Espectroscopía de fluorescencia,” Universidad Miguel Hernández de Elche. Último acceso: 04 de Marzo de 2025. Disponible en: [https://repositorio.innovacionumh.es/Proyectos/P\\_22CursoMateriales/Miguel\\_Angel\\_Sogorb/Wimba/Espectroscopia\\_06.htm](https://repositorio.innovacionumh.es/Proyectos/P_22CursoMateriales/Miguel_Angel_Sogorb/Wimba/Espectroscopia_06.htm)

- [45] D. E. Zacharioudaki, I. Fitis, y M. Kotti, “Review of Fluorescence Spectroscopy in Environmental Quality Applications”, *Molecules*, vol. 27, no. 15, Agosto 2022, doi: 10.3390/molecules27154801.
- [46] J. Marshall y S. Johnsen, “Fluorescence as a means of colour signal enhancement”, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 372, no. 1724, 2017, doi: 10.1098/rstb.2016.0335.
- [47] M. de J. Perea Flores y A. Peña Barrientos, “Fundamentos y aplicaciones de la microscopía de fluorescencia”, Centro de nanociencias y micro y nanotecnologías del Instituto Politécnico Nacional, México, [Webinar], 23 de Junio de 2022.
- [48] L. V. Salgado y C. Vargas Hernández, “Medición de la absorbancia óptica de soluciones acuosas mediante la instrumentación virtual y el control”, *Scientia et Technica Año XIX*, vol. 19, no. 1, Marzo 2014. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4693922.pdf>
- [49] I. J. Orlando-Guerrero, C. H. Bravo-Delgado, Z. J. Hernández-Paxtán y A. A. Aguilar-Felipe, “Microscope as absorbance reader with utility in clinical analysis”, *Revista Mexicana de Ingeniería Biomedica*, vol. 40, no. 1, Enero 2019, doi: 10.17488/RMIB.40.1.10.
- [50] G. D. Christian, “Cálculos cuantitativos”, *Química Analítica*, Sexta Edición, México: McGraw-Hill/interamericana Editores, S.A. de C.V., 2009, cap. 16, pp. 474–476.
- [51] M. Barzan y F. Hajiesmaeilbaigi, “Investigation the concentration effect on the absorption and fluorescence properties of Rhodamine 6G dye”, *Optik (Stuttg)*, vol. 159, 2018, doi: 10.1016/j.ijleo.2018.01.075.
- [52] A. Shapiro, “Can Beer Lambert law be applied to fluorescence based detection of enzyme activity?”, ResearchGate GmbH. Último acceso: 04 de Marzo de 2025. Disponible en: [https://www.researchgate.net/post/Can\\_Beer\\_Lambert\\_law\\_be\\_applied\\_to\\_fluorescence\\_based\\_detection\\_of\\_enzyme\\_activity/56e36ba648954cd3b5441943/citation/download](https://www.researchgate.net/post/Can_Beer_Lambert_law_be_applied_to_fluorescence_based_detection_of_enzyme_activity/56e36ba648954cd3b5441943/citation/download)
- [53] Equipo de Datamed, “La fluorimetría y sus aplicaciones”, Datamed. Último acceso: 04 de Marzo de 2024. Disponible en: <https://datamedweb.com.br/2022/09/a-fluorimetria-e-suas-aplicacoes/>
- [54] Kalstein France-SIREN, “¿Cuáles son las diferencias entre fluorómetros y espectrofluorómetros?”, Kalstein. Último acceso: 28 de junio de 2025. Disponible en: <https://kalstein.net/es/cuales-son-las-diferencias-entre-fluorometros-y-espectrofluorometros/>

- [55] NutanKaushik, M. Amir y MymoonaAkhtar, “Analytical Chemistry / Instrumentation Atomic - Spectroscopy Factor Affecting Fluorescence and Phosphorescence”, e-PG Pathshala, National Mission on Education through ICT, Gandhinagar, Gujarat, India, Abril 2025. Disponible en: [https://epgp.inflibnet.ac.in/epgpdata/uploads/epgp\\_content/S000944AC/P001632/M028148/ET/1520579143Q1M11.pdf](https://epgp.inflibnet.ac.in/epgpdata/uploads/epgp_content/S000944AC/P001632/M028148/ET/1520579143Q1M11.pdf)
- [56] A. Bose, I. Thomas y E. Abraham, “Fluorescence spectroscopy and its applications: A Review”, International Journal of Advances in Pharmaceutical Analysis, 2018, doi: <https://doi.org/10.7439/ijapa.v8i1.4578>.
- [57] E. De Gerónimo y L. J. Falomir-Lockhart, “Fluorescencia”, Análisis estructural y funcional de macromoléculas, Buenos Aires, Argentina, Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP), 2013, cap. 2, pp. 43–45. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/153906>
- [58] N. Kaile, M. Lindivat, J. Elio, G. Thuestad, Q. G. Crowley y I. A. Hoell, “Preliminary Results From Detection of Microplastics in Liquid Samples Using Flow Cytometry”, Frontiers in Marine Science, vol. 7, Octubre 2020, doi: 10.3389/fmars.2020.552688.
- [59] G. Erni-Cassola, M. I. Gibson, R. C. Thompson y J. A. Christie-Oleza, “Lost, but Found with Nile Red: A Novel Method for Detecting and Quantifying Small Microplastics (1 mm to 20 µm) in Environmental Samples”, Environmental Science & Technology, vol. 51, no. 23, pp. 13641–13648, 2017, doi: 10.1021/acs.est.7b04512.
- [60] W. J. Shim, Y. K. Song, S. H. Hong y M. Jang, “Identification and quantification of microplastics using Nile Red staining”, Marine Pollution Bulletin, vol. 113, no. 1–2, pp. 469–476, 2016, doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.10.049.
- [61] S. A. Mason, V. G. Welch y J. Neratko, “Synthetic Polymer Contamination in Bottled Water”, Frontiers in Chemistry, vol. 6, 2018, doi: 10.3389/fchem.2018.00407.
- [62] T. Maes, R. Jessop, N. Wellner, K. Haupt y A. G. Mayes, “A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red”, Scientific Reports, vol. 7, no. February, pp. 1–10, 2017, doi: 10.1038/srep44501.

- [63] Texas Instruments, “OPT101 - Monolithic Photodiode and Single-Supply Transimpedance Amplifier”, Texas Instruments. Último acceso: 27 de Mayo de 2025. Disponible en: <https://www.ti.com/product/OPT101>
- [64] D. A. Skoog, Fj. Holler, and S. R. Crouch, “Espectroscopia molecular”, Principios de análisis instrumental, Sexta Edición, México: CENEGAGE Learning, 2008, cap. 13, pp. 336–339.
- [65] A. García-Suárez, “Determinación de rendimientos cuánticos de fluorescencia por métodos indirectos”, Trabajo de fin de Máster, Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas, Universidad de Oviedo, Oviedo, España, 2015. Disponible en: [https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/32363/TFM\\_Andrea%20Garc%C3%ADa.pdf?isAllowed=y&sequence=6](https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/32363/TFM_Andrea%20Garc%C3%ADa.pdf?isAllowed=y&sequence=6)
- [66] R. Brieva-García, “Determinación del rendimiento cuántico y tiempos de vida media de fluorescencia en sustancias colorantes con aplicaciones como fuentes láser”, Tesis de titulación, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia, 2011. Disponible en: <https://noesis.uis.edu.co/server/api/core/bitstreams/3a94f824-d1a8-482d-a3a4-a74815a8c093/content>
- [67] A. Delgado-Camón, “El efecto del entorno en la emisión de fluorescencia. Modelos teóricos y aplicaciones analíticas”, Tesis Doctoral, Departamento de Química Analítica, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España, 2012. Disponible en: <https://digital.csic.es/bitstream/10261/64871/1/Delgado%20Cam%C3%B3n%20MA.pdf>
- [68] C. A. Briones-Vázquez y A. Álvarez-Hernández, “Sondas fluorescentes, una revisión general: propiedades, diseño y aplicaciones”, Padi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI, vol. 9, no. 17, pp. 9–16, Julio 2021, doi: 10.29057/icbi.v9i17.7143.
- [69] N. Samat, R. Burford, A. Whittle y M. Hoffman, “The effects of frequency on fatigue threshold and crack propagation rate in modified and unmodified polyvinyl chloride”, Polymer Engineering and Science, vol. 49, no. 7, pp. 1299–1310, 2009, doi: 10.1002/pen.21369.
- [70] S. Konde, S. Brackmann, J. Prume, M. Gerhard y M. Koch, “Nile Red staining for the detection of microplastics: a comprehensive study on the emission spectra”, ResearchGate GmbH, 16 de Febrero de 2023. doi: 10.21203/rs.3.rs-2579237/v1.

- [71] N. Meyers, A. I. Catarino, A. M. Declercq, A. Brennan, L. Devriese, M. Vandegheuchte, B. De Witte, C. Janssen y G. Everaert, “Microplastic detection and identification by Nile red staining: Towards a semi-automated, cost- and time-effective technique”, *Science of The Total Environment*, vol. 823, p. 153441, Junio. 2022, doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2022.153441.
- [72] E. Nicolai, R. Pizzoferrato, Y. Li, S. Frattegiani, A. Nucara y G. Costa, “A New Optical Method for Quantitative Detection of Microplastics in Water Based on Real-Time Fluorescence Analysis”, *Water (Switzerland)*, vol. 14, no. 20, Octubre 2022, doi: 10.3390/w14203235.
- [73] E. Smith y G. Dent, “Resonance Raman Scattering”, *Modern Raman Spectroscopy-A Practical Approach*, Primera Edición, Inglaterra: John Wiley & Sons, Ltd, 2005, cap. 4, pp. 93–100. Disponible en: <https://bbhegdecollge.com/assets/uploads/storage/1177/154043919-Modern-Raman-Spectroscopy-A-Practical-Approach.pdf>